

Institut National Agronomique El- Harrach – Alger
Thèse Doctorat d'Etat
Spécialité : Sciences Agronomiques

***EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET
THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE
CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)***

Par OUNANE Sidi Mohamed

Pr SALSAC L. Directeur de thèse Pr AZZOUT B. Codirecteur de thèse
Soutenue le 12 Decembre 2004

devant le jury composé de : MM Pr BOUZNAD Z. Président Pr SABAOU S. Examineur Pr AIDAOU
A. Examineur Pr BELLAL M.M. Examineur

Table des matières

RESUME . . .	5
INTRODUCTION . . .	6
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	9
I. la nutrition azotée chez les légumineuses . . .	9
1. Assimilation du nitrate . . .	9
2. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique . . .	12
3. La glutamine synthétase (GS) . . .	16
4- La glutamate déshydrogénase (GDH) . . .	17
II - Effet du stress hydrique sur la nutrition azotée . . .	18
1. Effet du stress hydrique sur la nodulation . . .	18
2. Effet du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote . . .	19
III. Effet de stress thermique sur la nutrition azotée . . .	22
1. Les basses températures . . .	22
2. Les hautes températures . . .	23
Matériel et méthodes . . .	24
1. Matériel végétal et bactérien . . .	24
2. Mise en place des essais . . .	24
3. Préparation de l'inoculum et inoculation . . .	24
4. Isolement et purification des souches . . .	24
5. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) . . .	25
6. Mesure de l'activité nitrate réductase (ANR) . . .	26
7. Mesure de l'activité glutamine synthétase (AGS) . . .	27
8. Mesure de l'activité glutamate déshydrogénase (AGDH) . . .	28
9. Mesure de l'activité saccharose synthétase . . .	28
10. Dosage des protéines et des uréides . . .	28
11. Dosage des nitrates . . .	29
12. Dosage de l'azote total . . .	29
13. Dosage des chlorophylles . . .	29
14. Le stress hydrique . . .	29
15. Le potentiel hydrique . . .	29
16. La teneur en eau relative . . .	30
17. Le stress thermique . . .	30
RESULTATS ET DISCUSSION . . .	31
CHAPITRE I : Evolution et distribution des activités nitrate réductase, glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase . . .	31
I . Introduction . . .	31
II . Résultats . . .	33
III . Discussion . . .	47
IV. Conclusion . . .	50
Chapitre II Effet de la nodulation et du nitrate sur la croissance et les principales activités enzymatiques du métabolisme azoté . . .	52

I. Introduction . . .	52
II. Résultats . . .	55
III. Conclusion . . .	60
Chapitre III Effet du stress hydrique sur la nodulation, la fixation et l'assimilation de l'azote . . .	62
I. Introduction . . .	62
II. Résultats . . .	64
III. Discussion . . .	69
Chapitre IV Réponse de différentes souches de <i>Rhizobium</i> nodulant le pois chiche sous contrainte hydrique . . .	70
I. Introduction . . .	70
II. Résultats et discussion . . .	72
III. Conclusion . . .	77
Chapitre V Effet du stress hydrique sur la formation et la croissance des nodules . . .	80
I Introduction . . .	80
II Résultats . . .	81
III. Discussion . . .	85
Chapitre VI Effet des nitrates sur la nodulation et la fixation de l'azote . . .	87
I. Introduction . . .	87
II. Résultats . . .	89
III. Discussion . . .	95
Chapitre VII Effet du manganèse sur la tolérance à la sécheresse de la fixation N₂ . . .	96
I. Introduction . . .	96
II. Résultats . . .	100
III. Discussion . . .	101
IV. Conclusion . . .	102
Chapitre VIII Effet du stress thermique sur l'assimilation et la fixation de l'azote . . .	102
I. Introduction . . .	102
II. Résultats et discussion . . .	103
III. Conclusion . . .	111
Discussion générale et synthèse . . .	113
Conclusion . . .	119
LISTE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	123

RESUME

La distribution des activités enzymatiques varie en fonction de l'âge et de la position des feuilles sur la plante. Les étages foliaires présentent une analogie avec le développement d'une feuille. Le sommet représente les organes en développement, le milieu les feuilles en pleine maturité et la base de la plante les feuilles sénescents. Chaque étage foliaire peut donc être associé à une phase de l'ontogénie foliaire.

L'effet du nitrate sur la nutrition azotée se traduit par une stimulation de la fixation N_2 aux faibles concentrations et une inhibition aux fortes concentrations. Ce mode d'action s'observe dans la plupart des paramètres étudiés notamment la nodulation, l'ARA et l'ASS.

Les contraintes hydriques modérées affectent moins l'ARA pendant la floraison et la formation des gousses. La présence de gros nodules permet une meilleure résistance à la déshydratation et le maintien d'une bonne activité nitrogénase. L'assimilation des nitrates est moins déprimée que la fixation N_2 par le stress hydrique, tout au moins pour les contraintes faibles ou modérées. Mais la plante réajuste sa nutrition par une augmentation de l'ANR au moment où la fixation diminue sous l'effet du stress hydrique. Une fois la contrainte levée les activités nitrogénase et nitrate réductase reprennent une activité normale quand le stress est faible ou modéré et sont irréversiblement inhibées par les stress sévères.

La supériorité de la souche native C2260 pour la production de matière sèche des feuilles, des tiges et des gousses pendant une contrainte hydrique a été mise en relation avec la formation du rendement et la productivité du pois chiche.

Le cultivar FLIP87-7C se distingue par sa capacité à conserver le maximum de matière sèche nodulaire sous contrainte hydrique. Il semblerait que la réduction du nombre de nodules soit compensée par l'apparition de nodules plus gros, capables de mieux surmonter le stress hydrique.

Chez le pois chiche, l'accumulation des uréides dans les feuilles, suite à un stress hydrique, se traduit par leur retour dans les nodules (feedback) et leur accumulation serait responsable de l'inhibition de l'activité nitrogénase.

Les températures comprises entre 2°C et 10°C limitent fortement le fonctionnement de la nitrogénase qui ne représente plus que 10 à 20 % de sa capacité optimale. Les fortes températures affectent de même la fixation de façon brutale et à partir de 35°C, il est probable d'atteindre une inhibition complète de cette enzyme. Par contre, les basses températures ont un effet favorable sur la nitrate réductase en protégeant cette enzyme contre sa dégradation naturelle. C'est un avantage qui conforte le décalage du semis de printemps vers l'hiver, souvent recommandé pour améliorer les rendements du pois chiche.

INTRODUCTION

L'azote est l'élément essentiel de l'alimentation minérale des plantes. Sa disponibilité est souvent limitée bien que sous sa forme gazeuse, il représente environ 80% de l'atmosphère, soit 10^{15} tonnes de gaz N_2 . Il peut être incorporé aux agrosystèmes par la voie industrielle (engrais), mais surtout par la voie biologique grâce à certaines bactéries capables de fixer l'azote de l'air. Le cycle de l'azote nécessite la transformation de quelques 3×10^9 tonnes de N_2 par année dont une partie revient à l'atmosphère (**Postgate**, 1982)

L'augmentation de la production végétale au cours de ces dernières décennies est due en grande partie à un accroissement de la fertilisation minérale azotée. La consommation mondiale est passée de 4 à 60 millions de tonnes par an (**Sprent et Sprent**, 1990). Toutefois, l'utilisation intensive des engrais azotés présente des inconvénients majeurs qui sont leur prix élevé et leur effet néfaste sur l'environnement par la pollution des eaux souterraines, des sols et des cultures (Hennin, 1980). Par ailleurs, l'azote minéral représente approximativement la moitié du coût de production (Barriere et Beranger, 1982). Indispensable, l'azote minéral doit être économisé bien qu'en Algérie, la situation est plutôt caractérisée par une faible utilisation des engrais en général. Il est cependant reconnu que plus de la moitié des engrais azotés sont lessivés avec pour conséquence la pollution de la nappe phréatique (**Sprent et Sprent**, 1990).

La source principale de l'azote du sol provient directement ou indirectement de l'atmosphère. La quantité d'azote total dans la couche arable des sols cultivés varie de 0,02 à 0,4% (HENIN, 1980). Il se trouve essentiellement sous forme organique dans la matière organique laissée après les récoltes ou apportée par le fumier. Son utilisation par les plantes ne peut se faire qu'après minéralisation de la matière organique qui aboutit à l'ammonium (ammonification) et au nitrate (nitrification).

Le nitrate est préférentiellement absorbé par les plantes (Mengel et Kirkby, 1982), mais l'absorption de l'une ou de l'autre de ces deux formes d'azote dépend de l'espèce végétale et de certaines conditions de l'environnement comme la température, le pH et les conditions de culture (Demolon, 1968; Mengel et Kirkby, 1982).

Les légumineuses cultivées se développent sur un milieu contenant naturellement de l'azote minéral (nitrate et/ou ammonium) et peuvent bénéficier simultanément de deux sources d'azote lorsqu'elles sont nodulées: l'azote combiné du sol et l'azote gazeux de l'air. L'absorption de ces deux formes implique le fonctionnement de deux mécanismes complémentaires mais qui peuvent aussi entrer en concurrence à certains stades du développement de la plante ou à certaines conditions du milieu.

Une des approches de l'étude du métabolisme azoté chez une légumineuse peut consister à mesurer les activités enzymatiques intervenant dans l'incorporation de l'azote inorganique et/ou moléculaire. C'est ce but que nous avons poursuivi en étudiant des enzymes « marqueurs » de l'assimilation de l'azote. L'assimilation du nitrate est appréciée par la mesure de l'activité nitrate réductase qui ouvre la voie du métabolisme azoté et constitue par ailleurs l'étape limitante de la synthèse protéique et donc de la productivité. La nitrogénase qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique est évaluée par la mesure

de l'activité réductrice de l'acétylène. L'incorporation de l'ammonium dans de squelettes carbonés est évaluée par la mesure des activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase.

L'établissement et l'activité de la symbiose légumineuse-rhizobium peuvent permettre la fixation et l'assimilation de grandes quantités d'azote atmosphérique. Le soja peut fixer plus de 200 kg N /ha/an (Smith et Hume 1987), soit la quantité nécessaire pour satisfaire une grande partie des besoins de cette espèce.

Mais cette symbiose est généralement très sensible au stress hydrique. Par ailleurs, la productivité de cette association peut être déprimée soit par une sécheresse intermittente qui peut se produire pendant la croissance soit par une sécheresse terminale qui se produit quand l'humidité du sol est épuisée. Plusieurs études ont montré que la fixation N₂ est plus sensible au stress hydrique que les autres métabolismes (photosynthèse, assimilation du nitrate du sol et accumulation de la matière sèche).

Les effets du stress hydrique sur la fixation N₂ ont été perçus pendant les années 70 et 80 comme un processus physiologique simple impliquant le métabolisme du carbone et la perméabilité du nodule à l'oxygène. Ce n'est que plus tard que l'hypothèse du feedback des composés azotés a été avancée, pour expliquer la régulation de la fixation N₂.

La baisse dans la fixation N₂ sous contrainte hydrique a été associée avec un ou une combinaison de trois mécanismes (Serraj et *al.*, 1999a ; Sinclair et *al.*, 2003):

- Baisse de l'approvisionnement en oxygène des nodules.
- Baisse de l'approvisionnement en carbone des nodules.
- Retour par feedback des uréides aux nodules.

Comme les nodules sont alimentés presque exclusivement par la sève élaborée, ces mécanismes sont tous affectés indirectement par les variations du flux volumique du phloème (Serraj et *al.*, 1999b).

Le déficit hydrique provoque une baisse du flux phloémique de la plante qui à son tour modifie la perméabilité du nodule à l'oxygène (Po) par suite d'une augmentation de la barrière de diffusion du cortex externe du nodule (Sinclair et *al.*, 2003).

Un facteur commun qui lie ces trois mécanismes est la sensibilité du flux du phloème au stress hydrique. Il est possible que la baisse de ce flux, qui se produit assez tôt pendant la progression du stress hydrique, provoque une réduction précoce de l'activité des nodules.

L'une des solutions qui a été proposée pour améliorer la productivité du pois chiche est le semis d'hiver au lieu du semis traditionnel de printemps. Ce décalage du cycle soumet la plante aux basses températures de la saison froide et provoque certainement des modifications plus ou moins importantes du métabolisme en général et du métabolisme azoté en particulier.

Les effets du stress thermique (basses températures) ou chimique (nitrates) sur la fixation et l'assimilation de l'azote déclenchent généralement les mêmes mécanismes en réponse à ces contraintes.

Notre objectif est :

D'étudier le comportement des enzymes clés impliquées dans la nutrition azotée et de suivre les modifications de leur activité pendant une contrainte hydrique, thermique ou chimique.

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

De rechercher les paramètres physiologiques liés à la tolérance à ces contraintes et pouvant servir de base à des critères de sélection.

De rechercher aussi la variabilité dans la réponse de l'association plante-rhizobium à ces contraintes dans le but d'améliorer la nutrition azotée du pois chiche et par conséquent la productivité de cette espèce.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. la nutrition azotée chez les légumineuses

L'assimilation des composés minéraux de l'azote est une caractéristique fondamentale des végétaux (et de nombreux genres bactériens). L'ammonium et le nitrate constituent les deux substrats possibles de la nutrition azotée ; ceci est également vrai pour les plantes dites "fixatrices" d'azote qui en plus, sont capables de fixer l'azote de l'air grâce à la réduction de l'azote moléculaire par des bactéries qui leur sont associées en symbiose.

1. Assimilation du nitrate

Le nitrate absorbé par les racines peut être stocké dans les vacuoles et contribuer au maintien de la pression osmotique et de la pression de la turgescence des tissus. Il peut aussi être réduit en acides aminés, dans la mesure où le pouvoir réducteur et les enzymes sont présents, ou bien, excrété dans les vaisseaux du xylème et transporté par la sève brute vers les parties aériennes. Le nitrate dans la partie aérienne peut être soit, accumulé, en particulier dans les organes métaboliquement peu actifs, soit directement réduit (Robin et *al.*, 1983 ; Foyer et *al.*, 2003).

D'une façon générale, lorsque l'ion nitrate pénètre dans la cellule racinaire ou foliaire, il doit être réduit en ammonium avant d'être incorporé dans les squelettes carbonés. L'assimilation de l'ammonium par la plante est assurée par les voies "GDH" et "GS/GOGAT", séquences de réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation du glutamate (Mifflin et Lea, 1976). Cet acide aminé ainsi que son amide, la glutamine vont fournir l'azote à la totalité des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique (Bryan, 1976; Mifflin, 1980).

Dans les différentes étapes de cette chaîne métabolique, la nitrate réductase (NR)qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite, est souvent considérée comme l'enzyme-clé de l'assimilation du nitrate (Hageman, 1979). Plusieurs arguments biochimiques ont permis de soutenir que la NR est l'enzyme limitante de cette chaîne métabolique :

-L'activité in vitro de la NR est inférieure aux activités de la NiR, de la GS ou de la GOGAT (Harel et *al.*, 1977).

-L'affinité de la NR pour son substrat ($K_m = 0,2 \text{ mM}$) est la plus faible de la chaîne (Stewart et *al.*, 1980; Guerrero et *al.*, 1981) .

-Enfin, cette enzyme, inductible par le nitrate, a une demi-vie relativement brève (quelques heures) (Hageman et Reed, 1980).

Ce concept d'étape limitante a conduit de nombreux auteurs à émettre l'hypothèse que la mesure de l'activité in-vitro ou in-vivo de la NR pouvait être un moyen d'apprécier l'intensité de la fonction d'assimilation du nitrate et donc, chez une plante qui ne fixe pas l'azote atmosphérique, la capacité à accumuler de l'azote réduit (Croy et Hageman, 1970; Boyat et Robin, 1977; Hageman, 1979; Chatterjee et *al.*, 1981; Naick et *al.*, 1982). les corrélations positives, observées chez le blé au stade plantule, entre l'estimation de l'azote réduit à partir de l'activité NR et l'azote réduit effectivement accumulé, appuient cette

hypothèse (Brunetti et Hageman, 1976). Enfin, le contrôle de l'assimilation du nitrate par la première étape a une signification physiologique (Hageman, 1979) ; il permet d'éviter l'accumulation du nitrite et de l'ammonium, toxiques pour le végétal et favorise le stockage du nitrate, osmoticum essentiel pour la plante (Chaillou et *al.*, 1986; Arrese-Igor et *al.* 1997)).

-1.1 La nitrate réductase (NR)

La nitrate réductase est présente aussi bien chez les végétaux que chez les bactéries. Sa structure est maintenant, assez bien connue. Chez la Courge la NADH-nitrate réductase (E.C. 1.6.6.1) est une molybdo-flavoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 220 000 daltons, constituée de deux sous-unités identiques (Redinbaugh et Campbell, 1985).

Elle contient plusieurs groupements prosthétiques: FAD, Cyt b₅₅₇, Mo (associé à un noyau ptérine) qui en font une véritable chaîne de transport d'électrons du NADH au nitrate.

Chez le Soja, NADH et NADPH sont ensemble, donneurs d'électrons de la NR (Evans et Nason, 1953).

La nitrate réductase est une enzyme, directement ou indirectement, induite par son substrat (Beevers et Hageman, 1980; Guerrero et *al.*, 1981). C'est le flux de l'anion entrant dans un organe qui semble réguler la quantité de l'enzyme active (Shaner et Boyer, 1976). Cette induction est aussi dépendante de la lumière (Beevers et Hageman, 1972) qui, en accroissant les polyribosomes, stimule la synthèse protéique (Trevis et Key, 1971 ; Polcyn et Lucinski, 2001), et intervient dans la synthèse d'un cofacteur, le cytochrome b₅₅₇ (Nasrulhaq-Bayce et Johns, 1977). En augmentant les perméabilités membranaires par l'intermédiaire du phytochrome (Jones et Sheard, 1975), la lumière rendrait le nitrate vacuolaire plus disponible pour l'induction (Aslam et *al.*, 1976). Enfin, la lumière pourrait par l'intermédiaire des chloroplastes activer l'enzyme qui serait présente sous forme réduite inactive (Maldonado et *al.*, 1980 ;Campbell, 1999).

Ces différents facteurs, joints à la brève demi-vie (2 à 4 heures) qui implique une dégradation rapide de l'enzyme par des protéases (Schrader et *al.*, 1972 et 1974), contribuent aux variations nyctémérales (Duke et *al.*, 1978) ainsi qu'aux variations observées au cours de la culture en fonction des conditions d'éclairement, de température, d'alimentation en eau et en azote, et lors des traitements phytosanitaires (Boyat et Robin, 1977). Par ailleurs, l'activité nitrate réductase pourrait être régulée in situ par des mécanismes d'activation-inactivation (Beevers et Hageman, 1980; Guerrero et *al.*, 1981; Remler et Campbell, 1986). Les principaux inactivateurs supposés sont l'ammonium ou les produits de son assimilation, l'excès de NADH, le cyanure et les températures élevées. Le nitrate et les faibles températures auraient par contre un rôle protecteur (Deane-Drummond et *al.* 1980 ; Macduff et *al.*, 1994).

-1.2 Répartition de l'activité nitrate réductase dans la plante

D'une manière générale, les feuilles ont une activité nitrate réductase plus élevée que celle des racines (Hewitt et *al.*, 1976) qui sont éloignées de la source de substrats carbonés et plus riches en activités protéolytiques.

L'analyse des différentes formes azotées de la sève du xylème a permis de distinguer des espèces à faible assimilation et des espèces à forte assimilation du nitrate dans les racines (Pate, 1973 ;Chamber-Perez et Serrano, 1991). Mais dans tous les cas ou presque, on peut affirmer que le système racinaire est capable de réduire le nitrate en nitrite.

Ainsi, pour les faibles concentrations en nitrate dans le milieu l'activité nitrate réductase (mesurée par la méthode *in vitro*) des racines de plantules de maïs représente 2 à 7% de l'activité totale, alors qu'à haute concentration de nitrate dans le milieu (15 meq/l) l'activité nitrate réductase racinaire représente 20% de l'activité totale (Robin *et al.*, 1983). La capacité de réduction de la racine mesurée *in-vivo* paraît relativement plus élevée aux faibles concentrations qu'aux fortes concentrations (Reed et Hageman, 1980). Cette répartition varie avec les espèces, en fonction de l'intensité ou de la nature de la nutrition azotée, au cours du nyctémère ou de l'ontogénie (Pate, 1973; Robin *et al.* 1983).

Chez le Pois chiche, l'activité nitrate réductase peut se rencontrer dans les feuilles, dans les racines et dans les nodosités mais cette activité est inégalement répartie dans ces différents organes. L'activité nitrate réductase racinaire (mesurée par la méthode *in-vivo*) représente 10% de l'activité totale (Radin, 1978), alors que les racines contiennent 60% du nitrate de la plante entière. Donc, moins de la moitié du nitrate est transmise vers les tiges et les feuilles. Or, l'addition de nitrates dans le milieu d'incubation ne modifie pas l'activité nitrate réductase racinaire, mais multiplie par cinq l'activité nitrate réductase foliaire. Ceci suggère que la disponibilité du nitrate est un facteur limitant pour l'assimilation de l'azote nitrique dans les feuilles et non dans les racines (Radin, 1978).

L'activité nitrate réductase spécifique des racines reste faible par rapport à celle mesurée dans les nodosités (Hunter, 1983).

L'activité nitrate réductase des nodosités est essentiellement d'origine bactérienne. La part de l'activité nitrate réductase provenant des bactéroïdes représente 90% de l'activité des nodosités (Chamber-Perez, 1997).

-1.3 Coût énergétique de l'assimilation du nitrate

La réduction d'une mole de nitrate en nitrite exige une mole de NAD(P)H ($2e^-$); la réduction du nitrite en ammonium utilise six électrons provenant de la ferrédoxine. Les deux étapes qui conduisent à la transformation de nitrate en ammonium peuvent être résumées par l'équation suivante (SALSAC *et al.*, 1984):



Or dans la chaîne respiratoire, l'oxydation d'une mole de NADH conduit à la synthèse de 3 moles d'ATP et selon Atkinson (1970) un NADPH est équivalent à 4 ATP et égal à la quantité d'énergie libérée par 2 molécules de ferrédoxine réduite:

L'équation précédente indique alors que le coût énergétique de la réduction du nitrate est de 15 à 16 ATP par molécule d'ammoniac formé, 16 ATP lorsque le NADPH est le donneur d'électrons pour la nitrate réductase.

A cette valeur il faudrait ajouter l'énergie nécessaire à l'absorption du nitrate qui est un processus actif. Dans les cellules végétales, où la concentration de nitrate pourrait être 50 à 100 fois plus élevée que la concentration du milieu externe et où la différence du potentiel électrique transmembranaire pourrait être de -100 mV, la différence de potentiel électrochimique entre le nitrate externe et interne n'est que de 5 Kcal/mol; l'hydrolyse de l'ATP donne donc l'énergie nécessaire pour ce transport actif (Salsac *et al.*, 1984).

Il est donc clair qu'une plante qui assure sa nutrition azotée à partir du nitrate supporte une dépense énergétique très importante (16 ATP). Seule la réduction de CO_2 exige une dépense énergétique du même ordre de grandeur (Robin et Salsac, 1985).

2. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote est une propriété de quelques plantes supérieures, grâce à la présence des bactéries qui leur sont associées. Parmi celles-ci, les légumineuses sont les plantes les plus importantes du point de vue agronomique. En 1886, le botaniste allemand Hellriegel indique pour la première fois que les légumineuses fixent l'azote atmosphérique lorsqu'elles sont nodulées. En effet la capacité fixatrice est due à une association symbiotique entre une plante hôte et une bactérie de la famille des Rhizobiaceae. Cette symbiose se caractérise par l'apparition, sur les racines de ces plantes, de nodosités qui assurent la fixation et la réduction de l'azote moléculaire grâce à la nitrogénase présente dans le microsymbiote. L'efficacité de cette symbiose dépend des deux partenaires et des facteurs du milieu.

-2.1 La nitrogénase

La nitrogénase est l'enzyme qui assure la fixation biologique de l'azote. Elle est présente chez les bactéries fixatrices libres, anaérobies ou aérobies, chez les cyanobactéries, bactéries photosynthétiques et chez les bactéroïdes des bactéries symbiotiques (Postgate, 1982). La structure de cette enzyme est la même chez tous les organismes fixateurs. Quelle que soit son origine, la nitrogénase, est constituée de deux protéines distinctes, inactives isolément (Bergensen, 1971). Le composant I est une grosse molécule tétramérique (200-300 kilodaltons), qui contient 32 atomes de fer et de soufre et 2 atomes de molybdène et qui a été désigné sous le nom de MoFe protéine ou dinitrogénase (Mortensen, et *al.*, 1967; Hardy et Burns, 1973; Hageman et Burris, 1978). Le composant II est un dimère, plus petit que le composant I (50-70 kilodaltons), contenant quatre atomes de fer et de soufre; il est désigné par Fe-protéine ou dinitrogénase réductase (Eady et *al.*, 1972; Postgate, 1974; Yates, 1980).

-2.2 Fonctionnement de la nitrogénase

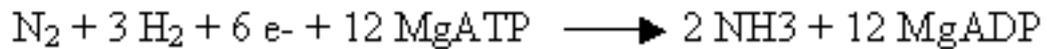
Les deux protéines de la nitrogénase et notamment le composant II sont irréversiblement inactivées par l'oxygène; une protection de l'enzyme contre l'oxygène est alors nécessaire. C'est pourquoi, dans les manipulations in-vitro, les milieux d'incubation de l'enzyme contiennent un puissant réducteur, le dithionite, qui permet de piéger l'oxygène dissout. Chez les micro-organismes aérobies le système de protection contre l'oxygène est très complexe et peut aller de la présence de cellules spécialisées, les hétérocystes des cyanobactéries à l'intense respiration des *Azotobacter* (Eady et Py, 1974).

Les léghémoglobines, protéines nodulaires longtemps considérées comme le système de protection de la nitrogénase, fonctionneraient au contraire comme des transporteurs d'oxygène qui approvisionneraient la chaîne respiratoire des rhizobium (Bergensen, 1981). On observe au cours d'un cycle végétatif des légumineuses une bonne corrélation entre l'activité nitrogénase et la quantité de léghémoglobines présente dans les nodosités (Bergensen, 1961; Serres, 1983). La protection de l'enzyme contre l'oxygène serait assurée par les barrières de diffusion à l'oxygène localisées dans le cortex des nodosités (Sinclair et Goudrian, 1981).

En exposant des nodules de Soja dans une atmosphère de $^{15}\text{N}_2$, Bergensen avait montré dès 1966 que 99% de l'azote fixé se trouvait sous forme de NH_3 une minute après le début de l'exposition. Il en déduisit donc, que l'ammoniac est le premier produit stable de la réduction de N_2 par la nitrogénase (Bergensen, 1966).

La nitrogénase catalyse la transformation de la molécule d'azote N_2 en deux molécules d'ammoniac (NH_3).

La réaction globale de la réduction de l'azote en ammoniac peut être écrite comme suit:



L'ATP et le pouvoir réducteur, sources d'électrons et de protons sont fournis par le catabolisme respiratoire de la plante-hôte. L'hydrolyse de 4 MgATP est nécessaire pour le transfert de deux électrons par la nitrogénase, soit 12 ATP par molécule de N_2 réduite (Bullen *et al.*, 1965; Winter et Burris, 1968). Pour la réduction de l'azote, six électrons doivent être transférés. Chez le genre *Rhizobium*, le pouvoir réducteur est le NADPH (Wong *et al.*, 1971).

Le transport des électrons entre le NADPH et le composant II (dinitrogénase réductase) est assuré par des transporteurs intermédiaires, la ferrédoxine (Fd) ou la flavodoxine (Fid). Le transfert des électrons se fait ensuite du composant II au composant I de la nitrogénase qui réduit à son tour le substrat (Minchin, 1997).

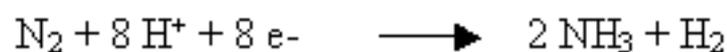
-2.3 Coût énergétique de la fixation de N_2

Si l'on admet que le transfert de deux électrons de la dinitrogénase réductase à la dinitrogénase nécessite l'hydrolyse de 4 molécules de MgATP et que les électrons sont apportés par la ferrédoxine réduite, la réaction de la nitrogénase serait (Salsac *et al.*, 1984):



D'où un coût total de 24 ATP hydrolysés par molécule de N_2 réduite ou de 12 ATP par molécule de NH_4^+ formé. Ce coût est inférieur à celui de la réduction du nitrate qui est de 15 ATP par molécule de NH_4^+ synthétisée (Salsac *et al.*, 1984).

Par contre la réduction de N_2 , par la nitrogénase se produit en même temps que la réduction de l'hydrogène. Cette production d'hydrogène, dite ATP-dépendante parce qu'elle n'a lieu qu'en présence d'ATP, a été mise en évidence pour la première fois par Hadfield et Bulen(1969). Dans les conditions optimales du fonctionnement de l'enzyme, une molécule d'hydrogène est formée pour une molécule d'azote réduit. La réaction catalysée par la nitrogénase peut s'écrire alors :



L'équation de la formation de l'hydrogène H_2 par la nitrogénase est (Robin et Salsac, 1985):



La réduction biologique de l'azote moléculaire peut donc être résumée par la somme des équations de réduction de N_2 et H^+ . Soit un bilan de 32 à 48 ATP consommés par molécule de N_2 réduite ou 16 à 24 ATP consommés par molécule d'ammonium formée (Robin et Salsac, 1985).

D'autres fonctions, liées à la fixation symbiotique de l'azote moléculaire, alourdissent le bilan énergétique :

- l'énergie dépensée dans la réduction de l'azote.
- l'énergie dépensée dans la réduction de l'hydrogène et qui n'est jamais totalement récupérée, même chez les bactéries pourvues d'une hydrogénase membranaire (Hup^+)
- l'énergie nécessaire au maintien de la léghémoglobine sous forme active réduite (Puppo et Rigaud, 1979),
- le coût d'entretien des nodosités, etc...

Il n'en demeure pas moins que la réduction de N_2 semble être la réaction la plus coûteuse en énergie, avec l'émission d'hydrogène qui représente vraisemblablement la majeure partie de cette perte globale d'énergie. Il est manifeste que c'est la production inévitable d'hydrogène qui grève le plus lourdement le bilan énergétique de la réduction biologique de l'azote moléculaire (Robin et Salsac, 1985).

-2.4 Assimilation et transport de l'azote fixé

L'ammonium produit par la réduction de N_2 est excrété par le bactéroïde dans le cytosol des cellules végétales infectées (Bergensen et Turner, 1967 ; Lang et *al.*, 1993). Les travaux de Kennedy (1966) avec le $^{15}N_2$ ainsi que ceux de Meek et *al.* (1978) et de Schubert et Coker (1981) avec le $^{13}N_2$ ont montré que la glutamine et le glutamate sont les premiers produits de l'assimilation de NH_4^+ dans les nodosités des légumineuses. Les deux voies connues de synthèse de ces composés sont présentes dans le cytosol (Kennedy, 1966) et dans les bactéroïdes (Brown et Dilworth, 1975; Robertson et *al.*, 1975), mais l'assimilation de NH_4^+ est plus intense dans la cellule végétale (Dunn et Klucas, 1973; Drevon, 1995). C'est donc la plante-hôte qui assure les transformations ultérieures de cette molécule qui n'est pas véhiculée telle quelle vers les autres parties de la plante.

La glutamine, premier composé synthétisé, peut être directement exportée mais elle ne représente que 8 à 9% de l'azote véhiculé sous cette forme chez *Vicia* et 3,3% chez le Soja (Pate et *al.*, 1969; McClure et Israël, 1979). Elle est donc en grande partie transformée pour assurer le transport et la mise en réserve de l'azote fixé (Kaiser et Huber, 2001).

La composition azotée de la sève xylémique de plusieurs légumineuses, révèle la présence de plusieurs molécules qui assurent la fonction de transport et de stockage de l'azote fixé (Matsumaoto et *al.*, 1977 b; Pate, et *al.*, 1980; Coker et Schubert, 1981). Celles-ci varient suivant l'espèce, le stade végétatif de la plante et les conditions de culture. Elles sont caractérisées par un rapport C/N et un poids moléculaire faibles. Les molécules qui sont particulièrement abondantes dans la sève des légumineuses sont l'asparagine et la glutamine d'une part, l'allantoïne et l'acide allantoïque d'autre part.

Ces deux catégories de composés, les uréides d'une part, les amides et les acides aminés d'autre part, coexistent dans la sève des légumineuses, mais dans des proportions qui varient avec l'espèce : chez le Pois (une plante à amides), 10% de l'azote soluble de la tige se trouve sous forme uréidique et chez le soja nodulé (plante à uréides) une partie de l'azote fixé est transporté sous forme d'asparagine et de glutamine (Pate, 1973; Streeter, 1979).

Chez les *Phaseoleae*, l'azote uréidique représente près de 80% de l'azote de la sève xylémique à la floraison, et au début de la formation des gousses. A ce stade, leur accumulation dans la plante est également maximale, mais les proportions varient selon les parties de la plante. C'est la tige qui accumule la plus forte quantité d'uréides (Matsumoto et al., 1977 a).

Les uréides sont produits dans les nodosités (Matsumoto et al., 1978) par la dégradation de bases puriques qui proviennent d'une biosynthèse de novo utilisant l'azote fixé (Schubert, 1981). La contribution du catabolisme des acides nucléiques à la synthèse des uréides transportés dans la sève ne serait importante dans les nodosités qu'en fin de cycle végétatif (Zengbe et al., 1982). Dans les parties aériennes les uréides sont dégradées en urée et en acide glyoxylique par l'allantoïnase et l'allantoïcose. Les plantes à uréides n'auraient pas d'allantoïcose dans leur organes souterrains à l'inverse des plantes à amides (Zengbe et al., 1984).

Chez les *Phaseoleae*, la prédominance des uréides comme forme principale de transport de l'azote fixé serait une forme d'économie du carbone grâce à leur faible rapport C/N (1/1). Ces molécules assurent un transport plus économique que les amides. De plus leur synthèse ne coûte globalement que 2 ATP contre 7 ATP pour la synthèse de l'asparagine (Schubert, 1981). Les uréides pourraient en outre, constituer un moyen d'allocation privilégié de l'azote fixé à des organes aériens (Parsons, 1993).

-2.5 Assimilation de l'ammonium

L'ammonium en provenance du milieu, de la réduction du nitrate ou de l'azote atmosphérique peut être assimilé par deux voies différentes (Miflin et Lea, 1976). La voie glutamine synthétase/glutamate synthase (GS/GOGAT), ou la voie glutamate déshydrogénase (GDH)(schéma 1).

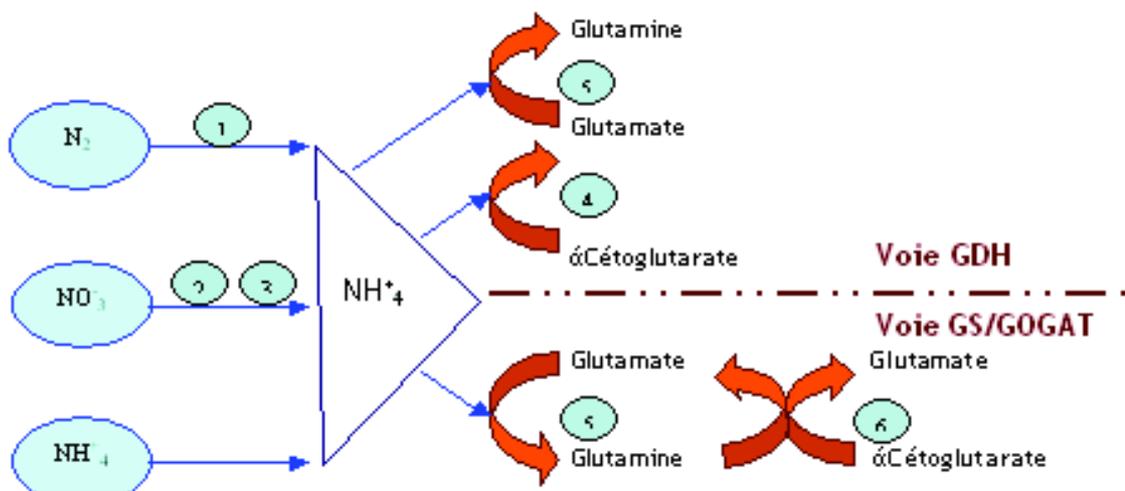


Schéma 1 Voies de l'assimilation de l'azote chez les végétaux supérieurs.

1: nitrogénase; 2: nitrate réductase; 3: nitrite réductase; 4: glutamate déshydrogénase; 5: glutamine synthétase; 6: glutamate synthétase.

3. La glutamine synthétase (GS)

La glutamine synthétase est présente dans tous les organes tels que les graines, les feuilles, les racines, les nodosités et les fruits (McNally et Hirel, 1983). Son poids moléculaire varie de 330 à 520 kilodaltons . Elle est constituée de 8 sous-unités de l'ordre de 43 à 47 kilodaltons (O'Neal et Joy, 1973; Lara et *al.*, 1984). Contrairement aux études approfondies qui ont été effectuées chez les bactéries , les données qui concernent la régulation de la glutamine synthétase chez les végétaux sont contradictoires (Stewart et Rhodes, 1977; Kanamori et Matsumoto, 1972). La rétroinhibition de cette enzyme par les acides aminés a été signalée par différents auteurs (Seethalakshmi et Apaji-Rao, 1979), certains suggèrent qu'elle pourrait être contrôlée par la glutamine (Wessiman, 1972; Rhodes et *al.*, 1976; Ratajczak et *al.*, 1981).

De nombreuses études ont montré au cours du verdissement des feuilles étiolées, une augmentation de l'activité glutamine synthétase (Evstigneeva et *al.*, 1982 ; Temple et *al.*, 1994). Cette augmentation de l'activité est attribuée à la synthèse d'une isoforme chloroplastique distincte d'une autre, cytoplasmique. A l'aide d'inhibiteurs de la synthèse protéique, Hirel et *al.* (1983) ont suggéré que cette forme chloroplastique pourrait être synthétisée dans le cytoplasme.

-3.1 Les isoformes de la glutamine synthétase

Des isoformes de la GS ont été identifiées dans les différents organes de plantes supérieures. Deux isoformes de GS ont été séparées par chromatographie d'échange d'ions dans l'hypocotyle de soja (Guiz et *al.*, 1979 ; Temple et *al.*, 1998), dans les feuilles d'orge (Mann et *al.*, 1979), dans les feuilles de riz (Guiz et *al.*, 1979), ainsi que dans les feuilles, pétioles, tiges, hypocotyle et gousses de Haricot (Guiz et *al.*, 1979). Une troisième forme de GS a été caractérisée dans les racines (Mann, et *al.*, 1979). Par ailleurs, deux isoformes de GS ont été mises en évidence dans les nodosités de *Phaseolus* (Lara et *al.*, 1983 ; Temple et *al.*, 1998.)

En utilisant les techniques chromatographiques et électrophorétiques, combinées avec les études de localisation subcellulaire, la présence de deux isoformes foliaires différentes de la glutamine synthétase a pu être généralisée à un grand nombre de plantes supérieures (Mann et *al.*, 1979; Mann et *al.*, 1980; Kretovich et *al.*, 1981; McNally et *al.*, 1983). Une isoforme, appelée GS₁, est localisée dans le cytosol, la seconde appelée GS₂, se trouve dans les chloroplastes. Ces deux isoformes présentent des poids moléculaires similaires. Cependant, on trouve pour les feuilles de pois et pour les graines germées d'arachide , un poids moléculaire plus élevé pour la GS₂ que pour la GS₁. Elles se distinguent par leur pH optimum , leur stabilité et leur Km pour le glutamate. En général, la GS₁ a un pH optimal plus faible que celui de la GS₂ .Le plus souvent, la GS₂ est moins stable que la GS₁. Les Km apparents pour l'ammonium et l'ATP sont similaires chez les deux isoformes. Par contre, la GS₂ a une faible affinité pour le glutamate. La proportion relative des deux isoformes foliaires de GS permet de distinguer quatre groupes de plantes. Dans le premier groupe, la GS est localisée uniquement dans le cytoplasme (GS₁). Celui-ci est représenté par les plantes parasites (non chlorophylliennes). Le deuxième groupe est caractérisé par la seule

présence de la GS chloroplastique (GS₂). L'absence apparente de la GS₁ a été confirmée chez l'épinard, la tomate et le tabac. Le troisième groupe de plantes possède les deux isoformes mais la GS cytosolique (GS₁) est minoritaire (5-30% de l'activité enzymatique foliaire totale). Cette distribution de l'activité GS est caractéristique d'un grand nombre de plantes C₃ et de quelques légumineuses tempérées ainsi que de certaines espèces de plantes halophytes. Le quatrième groupe de plantes possède aussi les deux isoformes de GS mais dans ce cas, la GS₁ est plus élevée que dans le troisième groupe et elle peut être majoritaire (40-80% de l'activité enzymatique foliaire totale). Cette distribution des isoformes de GS est observée dans un nombre important de plantes C₄ et chez quelques légumineuses tropicales (McNally et al., 1983).

4- La glutamate déshydrogénase (GDH)

La GDH a été trouvée dans la presque totalité des organismes vivants étudiés (Stewart et al., 1980). Chez les plantes supérieures la GDH semble exister dans tous les organes, chlorophylliens ou non: hypocotyles, épicotyles, feuilles, racines, nodosités, graines, cotylédons et pollen (Stewart et al., 1980; Barash et al., 1973, Brown et Dilworth, 1975; Davies et Teixeira, 1975; De Vienne, 1980; De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983). Son poids moléculaire varie de 210 à 350 kilodaltons (Davies et Teixeira, 1975; McKenzie et Lees, 1981). Elle est constituée de 6 sous-unités de l'ordre de 51 kilodaltons (Fawole, 1977). Chez les végétaux supérieurs, elle est considérée comme une métaloprotéine.

L'activité GDH pourrait être contrôlée par l'état énergétique de la cellule (Joy, 1973). En effet, plusieurs auteurs ont indiqué une inhibition par l'ATP (Davies et Teixeira, 1975; Stewart et Rhodes, 1977). La direction de la réaction pourrait être contrôlée par le rapport NAD/NADH dans les mitochondries (Davies et Teixeira, 1975).

Chez la plupart des plantes supérieures étudiées, la GDH est principalement localisée dans les mitochondries (Stewart et al., 1980). L'activité GDH observée dans la fraction soluble a été généralement attribuée à une contamination provenant de la rupture de ces organites. Les deux enzymes, soluble et mitochondriale, possèdent les mêmes propriétés physiques et cinétiques. (Davies et Teixeira, 1975; Nauen et Hartmann, 1980).

Cependant, la présence de GDH dans le cytoplasme a été mise en évidence dans les cotylédons de potiron (Chou et Splittstoesser, 1972), les feuilles de luzerne (Vance et al. 1995) et les feuilles d'orge (Calle et al., 1986). Cette enzyme cytoplasmique présente une plus grande activité que l'enzyme mitochondriale et en diffère par certaines propriétés cinétiques. Une autre observation qui distingue ces deux fractions chez le potiron est le nombre d'isoformes de GDH identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide : une dans les mitochondries et de 1 à 7 dans le cytoplasme (Chou et Splittstoesser, 1972).

La GDH a été aussi caractérisée dans les chloroplastes de pois (Tsenova, 1972) et de ricin (Lees et Dennis, 1981). L'enzyme chloroplastique possède des valeurs de Km et une mobilité électrophorétique différentes de celles de l'enzyme mitochondriale (Stewart et al., 1980; Ferrario-Mery et al., 2002). En outre, si les deux enzymes possèdent la double spécificité en NAD et en NADP, le maximum d'activité GDH dans les mitochondries est observé avec le NAD et l'activité de l'enzyme chloroplastique est prépondérante avec le NADP (Leech et Kirk, 1968; Talley et al., 1972; Gayler et Morgan, 1977; Ehmke et Hartmann, 1976).

-4.1 Les isoformes de la glutamate déshydrogénase

La GDH chez les végétaux supérieurs se caractérise en fait, par l'existence de plusieurs isoformes qui ont été mises en évidence, en particulier par les techniques d'électrophorèse (Postius et al., 1976; Fawole, 1977; De Vienne, 1980; Cammaerts et Jacobs, 1983; Becker et al., 2000).

Chez la luzerne (De Vienne, 1983) et chez *Arabidopsis thaliana* (Cammaerts et Jacobs, 1983), la distribution des isoformes varie plus ou moins selon l'organe. Chez la luzerne, si la bande la plus anodale semble présente dans tous les organes, le nombre total de bandes peut varier d'une bande dans les carpelles sans ovules à sept dans la graine ou les ovules (De Vienne, 1983). L'*Arabidopsis thaliana* (Cammaerts et Jacobs, 1983) présente sept isoformes de mobilité électrophorétique différente. Si le nombre se maintient constant, par contre l'intensité des bandes varie suivant les organes.

En fait, le nombre de sept isoformes semble général chez les plantes supérieures (chou et Splittstoesser, 1972; Postius et al., 1976; Fawole, 1977; Nauen et Hartmann, 1980; De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983). Elles ont un même poids moléculaire mais diffèrent par leur charge (De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983). Chez la luzerne, elles possèdent toutes la double spécificité pour la coenzyme (NAD et NADP) et sont localisées dans les mitochondries (De Vienne, 1983). D'autre part, la distribution de ces isoformes est indépendante du génotype analysé (De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983).

Une structure hexamère a été proposée pour la GDH des végétaux supérieurs (De Vienne 1980). L'association de deux types de sous-unités de charges différentes dans un complexe hexamérique produit sept isoformes, dont les deux extrêmes sont homo-hexamères (De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983). Les rapports de concentration entre les deux sous-unités expliqueraient les dissymétries dans le nombre et l'intensité des bandes selon les organes (De Vienne, 1983; Cammaerts et Jacobs, 1983).

II - Effet du stress hydrique sur la nutrition azotée

La plupart des travaux sur la sécheresse ont abordé ce problème par l'étude des mécanismes qui interviennent lors de la réponse du végétal à la contrainte hydrique. La photosynthèse demeure le phénomène le plus étudié dans ces conditions et souvent, il a été proposé comme critère de sélection pour la résistance à la sécheresse des plantes. Il n'en demeure pas moins que d'autres mécanismes peuvent jouer un rôle important dans l'adaptation des plantes aux contraintes hydriques. Il est actuellement admis que le stress hydrique affecte l'ensemble des phénomènes biologiques qui peuvent conduire à la mort de la plante. Le métabolisme général des plantes est lui aussi concerné par cette réaction, notamment le métabolisme azoté qui présente la particularité d'être alimenté par deux voies, l'assimilation de l'azote combiné du sol et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. Moins de travaux sont consacrés à l'effet du stress hydrique sur la nutrition azotée des légumineuses malgré leur importance économique et agronomique.

1. Effet du stress hydrique sur la nodulation

Considérant l'importance des effets de la sécheresse sur la fixation de l'azote et son impact sur la production, il est surprenant de constater que seulement quelques études sont

consacrées à la formation du nodule et sa croissance sous stress hydrique. La relation entre humidité du sol et nodulation a été reconnue depuis longtemps. Masefield (1961) a rapporté des baisses importantes dans le nombre et la masse de nodules pour quatre espèces de légumineuse soumises à une contrainte hydrique.

Lors d'un déficit hydrique dans le sol, la survie des bactéries (*Rhizobium*) est perturbée. On observe une grande mortalité ainsi qu'une entrave au déplacement des bactéries qui provoqueraient une baisse de l'infection des racines et par conséquent une faible production de nodules (Chatel et Parker, 1973).

Chez la plupart des légumineuses, le nombre et la taille des nodules diminuent sous une contrainte hydrique (Sprent, 1971 ; Bouniols, 1986 ; Kirda et *al.*, 1989). Smith et *al.* (1988) ont rapporté des baisses substantielles dans la masse du nodule de la fève et du soja soumis à la sécheresse. Comparant les effets de la sécheresse sur la nodulation, la fixation, et la croissance de la plante, Kirda et *al.* (1989) ont montré que la fixation était le paramètre le plus sensible, bien que la croissance du nodule fût aussi fortement affectée. Chez le soja, Sinclair et *al.* (1988) ont trouvé que le nombre de nodules et le poids sec ont diminué seulement après une sécheresse sévère. Quelques travaux ont rapporté l'existence d'une variabilité génétique parmi les cultivars de soja pour le nombre et le poids sec des nodules en condition bien irriguée (Sinclair et *al.*, 1991 ; Pazdernik et *al.*, 1996, 1997).

Pratiquement peu d'informations sont disponibles sur la variabilité génétique de la nodulation sous sécheresse, à l'exception d'une comparaison de deux cultivars de soja faite par Purcell et *al.* (1997). Ils ont comparé le modèle de la nodulation chez deux cultivars, (Jackson et SCEB2-303) et montré des réponses contradictoires au déficit de l'eau, en ce qui concerne le nombre et la masse des nodules. Toutefois, ces variations ont eu une tendance vers une augmentation de la masse du nodule chez Jackson et une diminution chez SCEB2-303. Purcell et *al.* (1997) ont conclu que Jackson a alloué plus de photosynthétats aux nodules, en réponse au déficit hydrique.

Après l'étude de la fixation où ils ont pu mettre en évidence une variabilité génétique, Serraj et Sinclair (1997), ont continué avec le même protocole pour étudier la nodulation. Ils ont montré aussi une variabilité génétique pour le nombre, la masse et le poids sec des nodules sous contrainte hydrique au champ et en serre (Serraj et Sinclair, 1998).

2. Effet du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote

La fixation symbiotique de l'azote mesurée par la réduction de l'acétylène *in situ* est extrêmement sensible au stress hydrique provoqué par un dessèchement du sol (Weisz et *al.*, 1985). La fixation est plus sensible à la déshydratation du sol que les autres fonctions physiologiques tel que la photosynthèse (Durand et *al.*, 1987), la transpiration (Sall et Sinclair, 1991), ou l'assimilation du nitrate (Obaton et *al.*, 1982). La grande sensibilité de la fixation à la sécheresse, comparée avec les échanges gazeux de la feuille, a été observée sous des conditions contrôlées (Sinclair, 1986; Durand et *al.*, 1987) et sous des conditions de champs (Sinclair et *al.*, 1987). La perte de l'activité de la fixation est précédée par une réduction des échanges gazeux de la feuille et une baisse du contenu relatif en eau, ce qui constitue une contrainte importante pour l'accumulation de l'azote et le rendement potentiel des récoltes même dans un sol modérément desséché.

Sall et Sinclair (1991) ont rapporté l'existence de différences génotypiques parmi des cultivars de soja en ce qui concerne la sensibilité de la fixation en conditions de sécheresse. Ils ont comparé huit cultivars dans une expérience au champ et montré que l'accumulation

de l'azote sous conditions sèches était moindre par rapport aux plantes bien irriguées, chez tous les cultivars. Cependant, la baisse chez le cultivar Jackson était plus faible. De plus, les cultivars sensibles, cultivés en serre, présentent une plus grande sensibilité dans la réduction de l'acétylène que dans la transpiration, alors que chez Jackson il y avait peu de différence dans la réponse au stress hydrique que ce soit au niveau de l'ARA que de la transpiration (Sall et Sinclair, 1991).

Les mécanismes par lesquels le stress hydrique affecte la fixation ne sont pas encore complètement connus. Pankhurst et Sprent (1975) ont montré que l'effet fondamental du stress de la sécheresse sur l'activité nitrogénase était une diminution de la perméabilité du nodule à la diffusion de l'oxygène. Leur travail qui a été réalisé sur des nodules excisés de soja a été confirmé aussi bien au champs qu'en serre par plusieurs auteurs (Weisz et *al.*, 1985; Durand et *al.*, 1987; Guerin et *al.*, 1990). D'autres résultats mettent en évidence aussi un effet négatif du stress hydrique sur la barrière de diffusion localisée dans le cortex du nodule (Hunt et *al.*, 1987; Serraj et *al.*, 1995).

Le fait que la fixation du cultivar Jackson répond différemment au stress hydrique, comparé aux autres cultivars, ouvre la possibilité d'une variabilité dans la régulation physiologique de la fixation.

Deux hypothèses potentielles pour expliquer la régulation unique de la fixation chez Jackson :

Une limitation de la diffusion de l'oxygène dans le nodule

Une modification dans le métabolisme azoté de la plante.

L'une et l'autre hypothèse peuvent avoir pour résultat, une altération des signaux chimiques dans les nodules de Jackson. Un signal transportable qui pourrait être des composés azotés (Parsons et *al.*, 1993). Les Uréides sont les constituants majeurs des composés azotés exportés après la fixation de l'azote des nodules de soja, bien que les acides aminés soient aussi présents (Herridge et *al.*, 1994).

DeSilva et *al.* (1996) ont montré une augmentation des concentrations en uréides en fonction de l'intensité du stress hydrique chez le cultivar de soja Hutcheson. Cependant, moins d'information sont disponibles sur les concentrations des uréides et des acides aminés chez Jackson sous contrainte hydrique. Toutefois l'existence d'un signal chimique qui influence la tolérance à la sécheresse peut être montré en greffant la tige de Jackson sur des racines d'un cultivar sensible à la sécheresse.

Le cultivar Jackson a été identifié comme le plus tolérant à la sécheresse pour la fixation N_2 parmi plusieurs cultivars de soja cultivés en plein champ (Sall et Sinclair, 1991), et confirmé en serre (Serraj et Sinclair, 1996,1997; Purcell et *al.*, 1997).

La baisse dans la fixation N_2 pendant la sécheresse a été associée avec un ou une combinaison de trois mécanismes (Serraj et *al.*, 1999a):

- Baisse de l'approvisionnement en oxygène des nodules.
- Baisse de l'approvisionnement en carbone des nodules.
- Retour par feedback des uréides aux nodules.

Comme les nodules sont alimentés presque exclusivement par la sève élaborée, ces mécanismes sont tous affectés indirectement par les variations du flux volumique du phloème (Serraj et *al.*, 1999b).

Le déficit hydrique provoque une baisse du flux phloémique de la plante qui à son tour modifie la perméabilité du nodule à l'oxygène (P_o) par suite d'une augmentation de la barrière de diffusion du cortex externe du nodule (Pankhurst et Sprent, 1975).

Purcell et Sinclair (1995) ont montré que la baisse du contenu relatif en eau (RWC) se traduit par une accumulation de solutés dans l'apoplaste du cortex du nodule et pourrait causer la submersion des espaces intercellulaires et par conséquent la diminution de la P_o . Cette hypothèse n'est pas vérifiée dans tous les cas. En effet, les travaux de Del Diaz Castillo et Layzell (1995) et de Purcell et Sinclair (1995) ont montré que la nitrogénase et la respiration des bactéroïdes ont diminués avant la baisse de la P_o en réponse à un déficit hydrique. Serraj et Sinclair (1996) ont indiqué aussi que chez Jackson (tolérant) et Biloxi (sensible) cultivés sous contrainte hydrique, l'activité de la fixation N_2 a été restaurée complètement en doublant la concentration en oxygène ambiant. Par ailleurs, l'activité du nodule de Jackson a été stimulée de 50% par l'augmentation de la concentration en O_2 sous conditions bien arrosées, alors qu'il n'y avait aucun effet sur Biloxi. Ils ont suggéré que la P_o aurait moins d'effet chez Jackson et que sa tolérance serait due à un autre mécanisme.

Les différences dans l'allocation des photosynthétats et la provision en eau des nodules pendant un déficit hydrique, par suite de variations dans le flux volumétrique du phloème peuvent contribuer à la sensibilité de la fixation N_2 au stress hydrique des génotypes. Un grand flux assure une distribution plus grande en eau et assimilés, ce qui procure une plus grande croissance du nodule. En effet, les grands nodules reçoivent plus d'eau et de sucre que les petits nodules (Purcell et al., 1997). A l'appui de cette hypothèse, la tolérance relative de la fixation N_2 du cultivar Jackson a été associée avec la grande masse individuelle de ses nodules (Purcell et al., 1997, 2000; Serraj et Sinclair, 1998). Pendant un stress hydrique modéré, Jackson avait quatre fois plus de ^{14}C dans les nodules que KS4895 (sensible à la sécheresse), après exposition des feuilles au $^{14}CO_2$ et une activité fixatrice (ARA) deux fois plus grande (Purcell et al., 1997).

Les grands nodules, qui sont alimentés par un flux phloémique plus important, consacrent une plus grande partie de leur tissu à la fixation N_2 . Dans un nodule de 2 mm, le tissu infecté (fixateur) occupe 25% du volume total alors qu'il occupe 60% dans un nodule plus grand de 4 mm (Weisz et Sinclair, 1988).

Un autre mécanisme potentiel pouvant être associé avec la baisse de la fixation N_2 pendant le déficit hydrique est une réponse déclenchée par les niveaux élevés des composés azotés dans la plante. Il a été proposé que l'inhibition par feedback de la fixation N_2 peut être une réponse directe aux concentrations élevées des uréides (produits de la fixation N_2 dans le nodule (Streeter, 1993). En effet, une diminution du flux volumétrique du phloème aux nodules réduit l'exportation par le xylème vers les feuilles des produits de la fixation. Une accumulation des uréides se produit alors dans le nodule et provoque l'inhibition de la nitrogénase. (Purcell et Sinclair, 1995; Serraj et al., 1999b).

Les autres composés qui peuvent causer l'inhibition par feedback de l'activité de la nitrogénase sont les acides aminés, telle que l'asparagine (Oti-boateng et Silsbury, 1993; Serraj et al., 1999b), ou la glutamine (Neo et Layzell, 1997).

Serraj et al. (1999a) ont proposé que l'accumulation de l'asparagine pendant un stress hydrique affecte le catabolisme des uréides dans les feuilles. Dans ces conditions

l'asparagine est transportée vers les racines et son accumulation dans les nodules s'ajoute à celle des uréides provoquant ainsi une inhibition de la nitrogénase.

Malgré ces difficultés, la concentration en uréides dans les feuilles a été utilisée comme un critère de sélection pour identifier les génotypes de soja tolérant à la sécheresse pour la fixation N₂ (Sinclair et *al.*, 2000). Chez Jackson, le niveau des uréides dans les feuilles est faible aussi bien dans les plantes arrosées que les plantes soumises à une contrainte hydrique (Serraj et Sinclair, 1996 ; Serraj et Sinclair, 1997; Serraj et *al.*, 1997; Purcell et *al.*, 1998, 2000). Ce résultat confirme l'hypothèse de l'inhibition de la fixation par feedback des uréides. Il est vraisemblable que les uréides ou d'autres composés azotés dans les racines et/ou les feuilles contribuent largement à la régulation de la fixation N₂.

La recherche de caractères de tolérance de la fixation N₂ à la sécheresse peut donc constituer un objectif important pour améliorer la productivité des légumineuses fixatrices d'azote. Trois raisons à cet impératif :

- La fixation N₂ est affectée par le stress hydrique avant beaucoup d'autres processus physiologiques y compris les échanges gazeux de la feuille (Durand et *al.*, 1987; Sall et Sinclair, 1991), l'accumulation des photosynthétats (Sinclair et *al.*, 1987; Serraj et *al.*, 1997), et l'accumulation de l'azote du sol (Purcell et King, 1996).

- Le rendement en grain augmente avec un apport d'engrais N sous contrainte hydrique mais il n'y a aucune réponse dans le traitement irrigué ; de ce fait l'amélioration de la fixation sous contrainte hydrique peut augmenter les rendements (Purcell et King, 1996).

- la production de graines de pois chiche riches en protéines exige une grande quantité d'azote qui, dans la plupart des cas et en grande partie, provient de la fixation N₂ (Saxena, 1990).

III. Effet de stress thermique sur la nutrition azotée

1. Les basses températures

Le semis d'hiver du pois-chiche, traditionnellement cultivé au printemps, soumet la plante à une nouvelle contrainte due aux basses températures enregistrées pendant cette saison et qui se manifeste par des modifications plus ou moins importantes au niveau des deux partenaires de la symbiose plante-rhizobium.

Les souches de rhizobium s'expriment mieux quand elles se trouvent dans un environnement semblable à celui où elles ont été isolées. Lipsanen et Lindstrom (1986) ont pu mettre en évidence une relation entre l'ARA, l'origine géographique et la croissance en milieux de cultures pures à basse température. Prévost et *al.* (1987) ont trouvé que les activités nitrogénase de cinq rhizobia arctiques étaient plus fortes à basses températures que celles isolées de milieux tempérés quand elles forment une symbiose avec le sainfoin. Hume et Shelp (1990) ont trouvé que l'inoculation du soja avec *B. japonicum* souche 532C

Hup— a donné les meilleurs rendements dans les conditions canadiennes que l'inoculation avec USDA110, USDA142, et USDA 143 utilisées dans les régions tempérées des USA. Le soja est une légumineuse qui exige des températures dans la rhizosphère comprises entre 25 et 30°C pour exprimer une activité fixatrice optimale de l'azote (Dard et Day, 1971).

La souche TA1 isolé d'un milieu froid nodule le trèfle souterrain à 7°C alors que la souche SU297 originaire d'un milieu plus chaud n'a pas pu le faire (Lipsanen et Lindstrom, 1986).

Aux basses températures, l'expression du gène *node* est suboptimale et se traduit par un retard de la nodulation (Zhang et *al.*, 1996; Zhang et Smith, 1996). L'addition de genistein serait un moyen efficace pour améliorer la fixation et augmenter les rendements (Zhang et Smith, 1996). Ils ont montré que l'application de cette molécule à deux souches de *B. japonicum* (USDA110 et 532C) a provoqué une augmentation du rendement du soja inoculé avec la souche USDA 110 alors qu'elle n'a aucun effet sur la souche 532C. Benafalvi et *al.* (1988) ont montré que quelques souches de *B. japonicum* pouvaient exprimer le gène *nod* en l'absence de genistein ou de composés apparentés.

A partir de ces données nous pouvons formuler l'hypothèse suivante : (i) il existerait une variabilité chez les rhizobium pour la nodulation et le rendement des légumineuses cultivées sous contraintes thermiques, (ii) les souches de rhizobium sélectionnées pour leur capacité à croître aux basses températures peuvent surmonter l'inhibition de la nodulation et former une symbiose efficace avec la plante hôte.

2. Les hautes températures

Les hautes températures sont particulièrement néfastes, parce qu'elles affectent indirectement les rendements et directement les processus physiologiques notamment le statut hydrique de la plante (Paulsen, 1994). L'effet des hautes températures sur la croissance est bien connu chez les légumineuses (Hall, 1993; Udomprasert et *al.*, 1995). La température optimum pour la croissance végétative du pois est comprise entre 15-20°C (Mahoney, 1991) ; au-delà de 30°C des réductions importantes peuvent se produire (Stanfield et *al.*, 1991). Les plantes sont particulièrement sensibles aux hautes températures pendant la floraison. Ridge et Pye (1985), par exemple, ont constaté que chez de nombreux cultivars le rendement diminue de 0,6 t/ha pour chaque 1 °C d'augmentation de la température pendant la floraison.

Les déficits hydriques et les hautes températures se produisent en même temps dans beaucoup d'environnements et ces deux facteurs conjuguent leur effet pour réduire les rendements. La photosynthèse est très sensible aux hautes températures chez la plupart des espèces (Berry et Bjbrkman, 1980). Les hautes températures peuvent exacerber les effets du stress hydrique en réduisant la production de photosynthétats et en limitant l'ajustement osmotique vis-à-vis du stress hydrique (Paulsen, 1994).

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal et bactérien

Nous avons utilisé dans la plupart des cas la variété de pois chiche ILC 3279. C'est une variété tardive, d'origine Russe, de type cabuli. Elle a été introduite en Algérie par l'ICARDA et s'est répandue dans toutes les zones de culture de cette espèce. D'autres cultivars ont été utilisés pour rechercher la variabilité génétique (ILC3279, ILC482, FLIP87-7 C, FLIP86-88 C, FLIP86-93 C, FLIP87-54 C, FLIP87-86 C, FLIP86-96 C). Pour les essais en serre les graines de pois chiche sont désinfectées à l'hypochlorite de calcium (3g/l pendant 5mn) avant le semis.

Les souches de *Rhizobium ciceri* utilisées proviennent soit de laboratoires étrangers (ICRISAT et INRAF) soit d'isollements, que nous avons effectués, de plusieurs régions du pays.

2. Mise en place des essais

Les essais sont réalisés soit sous serre en conditions semi contrôlées soit dans un phytotron en conditions contrôlées soit en plein champ pour les conditions naturelles.

En serre, les plantes sont cultivées en pots de 5 litres remplis d'un mélange équivalent de terre, de sable et de terreau stérilisés.

En plein champ, les essais ont été installés sur les parcelles de l'INA et la station de l'ITGC.

3. Préparation de l'inoculum et inoculation

La préparation de l'inoculum à partir d'une souche purifiée se fait dans un milieu YEM liquide (Yeast Extract Mannitol). Ce dernier est agité pendant 24 h à 28°C. Pour atteindre une concentration de 10^9 bactéries par ml, la solution bactérienne est diluée de façon à obtenir une $DO_{620} = 0,08$ (Bhuvaneswari et al., 1980).

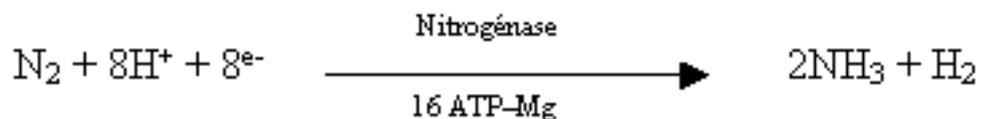
L'inoculation se fait avec 5 ml d'inoculum apportés après germination dans les pots ou par enrobage des graines dans le cas du semis de plein champ (Vincent, 1970).

4. Isolement et purification des souches

Les nodules récoltés au champ sont conservés dans des tubes remplis à moitié de chlorure de calcium pour obtenir une déshydratation uniforme des tissus nodulaires. Au laboratoire chaque nodule est réhydraté, désinfecté, puis broyé dans l'eau physiologique pour pratiquer l'isolement et la purification des souches en boîte de pétri avec le milieu YEM gélosé (Vincent, 1970).

5. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA)

La fixation de l'azote se fait suivant la réaction :



La mesure de la fixation de l'azote se fait par une méthode indirecte en utilisant la propriété de la nitrogénase de réduire aussi l'acétylène en éthylène (Dilworth, 1966). L'activité réductrice d'acétylène (ARA), mise au point par Balandreau et Dommergues (1971), est jusqu'à l'heure actuelle la méthode la plus utilisée pour mesurer la fixation N_2 . Nous avons apporté des modifications pour pouvoir faire des mesures dans des pots. Un couvercle en bois fendu sur un rayon et de même diamètre que le pot, permet d'isoler le système racinaire de la partie aérienne. L'application de mastic assure l'étanchéité du dispositif. Une ouverture dans le couvercle, fermée avec un bouchon en caoutchouc, permet d'introduire et de retirer les gaz à l'aide d'une seringue.

Les échantillons d'éthylène sont conservés dans des tubes venojects puis dosés en chromatographie phase gaz (Colonne porapak T de 1,5 m de long, four à ionisation de flamme à 80°C, gaz vecteur N_2 à 30ml/mn).

Les résultats sont exprimés en μM de C_2H_4 / heure / plante, selon l'expression suivante :

$$\text{ARA} = \frac{S_1 \times V_1 \times V_2 \times 60}{22400 \times S_2 \times V_3 \times t}$$

S_1 : Surface du pic d'éthylène de l'échantillon cm^2

S_2 : Surface du pic d'éthylène de l'étalon cm^2

V_1 : Volume de C_2H_4 injecté dans la fiole étalon ml

V_2 : Volume du conteneur ml

V_3 : Volume réel de la fiole étalon ml

t : Temps d'incubation mn

22400 :Volume de la molécule gramme d'un gaz à 0°C.

6. Mesure de l'activité nitrate réductase (ANR)

Cette activité a été mesurée par la méthode in situ de Robin (1983) basée sur le dosage du nitrite formé par la réduction du nitrate par la nitrate réductase suivant le schéma 2.

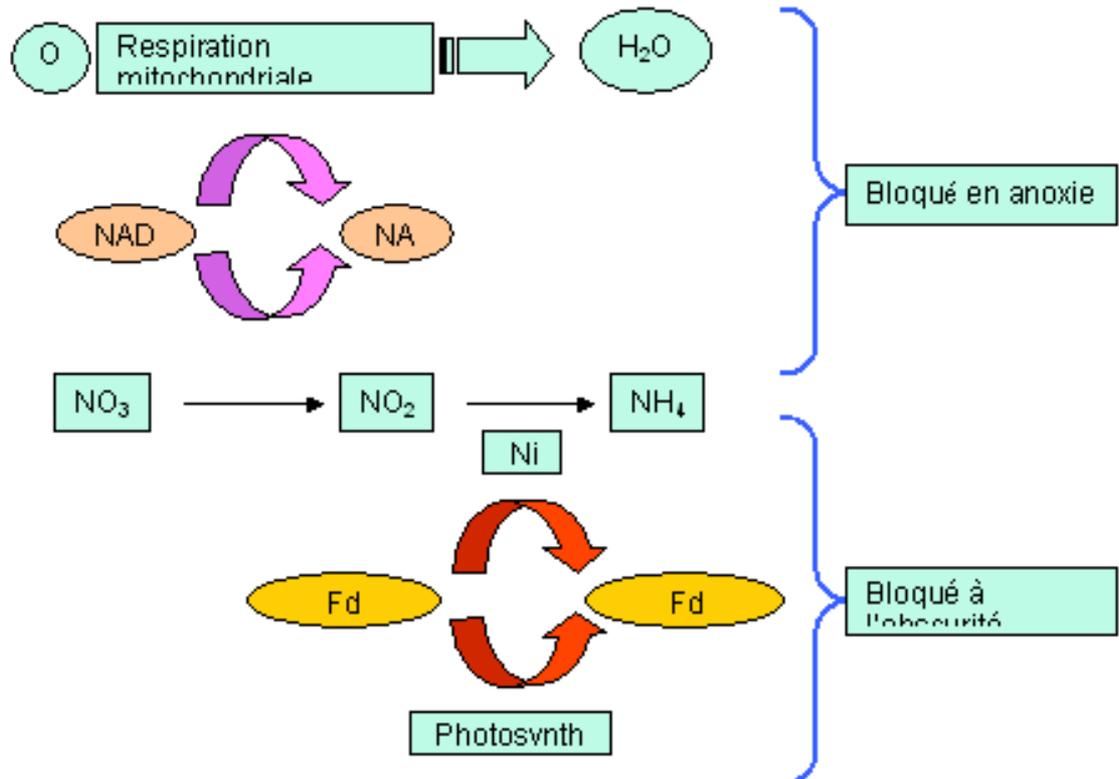


Schéma 2 Principe de la mesure de l'activité nitrate réductase in situ (Robin (1983))

La mesure d'ANR est effectuée sur la dernière feuille entièrement formée. La feuille coupée est immédiatement pesée puis introduite dans un tube venoject de 13ml contenant 0,1ml de KNO_3 à 0,1M. Le tube est fermé hermétiquement avec un bouchon en caoutchouc traversé par deux aiguilles de seringue creuses.

L'anoxie est réalisée en injectant par une des aiguilles de l'azote gazeux sous pression (1,5 bar), la deuxième aiguille permet la sortie de l'air.

Le balayage est interrompu après 1 minute par retrait simultané des deux aiguilles. Le tube est immédiatement enveloppé par une feuille d'aluminium pour obtenir l'obscurité.

Après 20 minutes d'incubation, l'extraction du nitrite est réalisée par addition de 5ml d'eau distillée bouillante et passage au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes.

Le nitrite formé est alors révélé par ajout de 2ml de sulfanilamide (10g / l dans HCl 1,5N) et de 2ml de N-Naphtyl-Ethylène Diamine-Dichlorure (0,2g / l). Après 10 minutes de réaction, la coloration rose est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm.

Un échantillon témoin laissé à l'air et à la lumière permet de retrancher de la densité optique des échantillons, la part due aux pigments végétaux et à la faible quantité de nitrite présente dans les tissus avant incubation.

L'activité de la nitrate réductase est exprimée par $\mu\text{M NO}_2^-$ / heure /g MF, selon la formule suivante:

$$\text{ANR} = \frac{A_{\text{ech}} - A_{\text{témoin}} \times 60 \times V}{E \times t \times \text{MF}}$$

Avec : A_{ech} : Absorbance de l'échantillon

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance du témoin

t : Temps d'incubation en minutes

E : Coefficient d'absorption molaire pour le nitrite = 47.8×10^3

MF : Matière fraîche en g

V : Volume d'extraction en ml

7. Mesure de l'activité glutamine synthétase (AGS)

La glutamine synthétase catalyse la réaction suivante :



Pour éviter certaines interférences le NH_3 est remplacé par hydroxylamine et la formation du glutamyl hydroxamate est dosée suivant la technique de O'Neal et Joy (1973). Le glutamyl hydroxamate produit par la réaction donne en présence de FeCl_3 un complexe coloré brun qu'on mesure à 540 nm par spectrophotométrie.

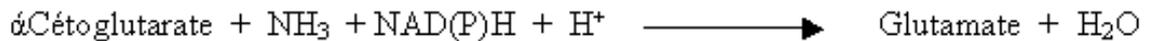
L'échantillon de la feuille est pesé puis broyé dans un mortier en présence d'un tampon TPK (pH 7,4) à raison de 10ml par g de matière fraîche. Le broyat est filtré sur une toile (vileda mop) et conservé dans la glace jusqu'au dosage. Le milieu réactionnel est composé du tampon TPK (0,1M), du MgSO_4 (40mM), de l'ATP (8mM), de l'hydroxylamine (9mM) et du glutamate (80mM).

La réaction est démarrée par addition de l'extrait végétal à 30°C pendant 30 mn. Elle est arrêtée par addition d'une solution (FeCl_3 0,37M, acide trichloracétique 0,2M, HCl 0,67N). Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation.

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M/h/gMF}$

8. Mesure de l'activité glutamate déshydrogénase (AGDH)

La glutamate déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



L'activité glutamate déshydrogénase est mesurée d'après la méthode O'Neal et Joy (1973) mise au point pour le soja par Tirado (1987). Cette méthode utilise le Tris-HCl 0,1 M à pH 7,6 avec le mercaptoéthanol 10 mM comme tampon d'extraction. Le milieu réactionnel contient en plus du tampon du NAD(P)H 0,2mM, du (NH₄)₂SO₄ 100 mM, et du cétooglutarate 10mM.

L'activité est mesurée par la disparition du NAD(P)H du milieu réactionnel à 340 nm par rapport à un témoin contenant tous les réactifs sauf l'ammonium.

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M/h/gMF}$.

9. Mesure de l'activité saccharose synthétase

Les nodules sont broyés à froid et homogénéisés dans un mortier avec du Mops-KOH 50 mM, à pH 7, du 2-mercaptoéthanol 10 mM, du MgCl₂ 4 mM. Le broyat est centrifugé pendant 30 min à 20000 g. Une partie du surnageant est dessalée, centrifugée à 180g pendant une mn puis passée dans une colonne Bio-Gel P6DG (Bio-Rad) équilibrée avec un tampon Mops-KOH 50 mM (pH 7) et MgCl₂ 4 mM. L'extrait récupéré est utilisé pour mesurer l'activité saccharose synthétase (ASS) (Gonzalez et *al.*, 1995). Elle est exprimée en $\mu\text{M/mn/mg}$ protéines

10. Dosage des protéines et des uréides

Les protéines sont dosées sur le culot de centrifugation obtenu après précipitation de 1 ml d'extrait végétal (provenant du broyage d'un gramme de feuille dans 10 ml du tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,4) avec 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% pendant une nuit à 4°C. Ce culot est remis en suspension par 1 ml NaOH (N). Les protéines solubles sont dosées sur une aliquote par la méthode de Lowry et *al.*, (1951). La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum d'albumine bovine.

Les uréides sont extraits à partir d'un disque foliaire avec 1 ml de NaOH 0.2 M dans un bain marie bouillant pendant 30 min. L'extrait est ensuite centrifugé et le surnageant est entreposé à 4°C en attendant le dosage selon la méthode colorimétrique de Trijbel et Vogel (1966). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M/g MS}$

11. Dosage des nitrates

Les échantillons sont séchés à 105°C pendant 24 heures, pesés, puis mis dans des piluliers avec 10 ml d'acide chlorhydrique 0,1N. Le nitrate est extrait au bout de 12 heures. Après filtration une aliquote est passée à travers une colonne réductrice de cadmium et le nitrite formé est dosé par diazotation sur une chaîne automatique (Treguer et Lecorre, 1975).

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/gMS}$

12. Dosage de l'azote total

Le matériel végétal séché est minéralisé dans 10 ml de H_2SO_4 concentré et 0,1 g de catalyseur (55g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 100 g K_2SO_4 + 10g de CuSO_4 + 1 g de Se). L'azote minéralisé est dosé par la méthode Kjeldhal

Les résultats sont exprimés en mg/gMS .

13. Dosage des chlorophylles

Les chlorophylles sont extraites dans une solution d'acétone à 80% (Arnon, 1949). La densité optique de la fraction soluble est mesurée à 645 et 663 nm. La concentration en chlorophylles est exprimée en mg/ml par la formule suivante :

$$\text{VT/V} (2,02 \text{ DO } 645 + 8,02 \text{ DO } 663) = \text{mg/ ml de chlorophylle}$$

V = volume de l'extrait foliaire , VT = volume total, DO = densité optique

14. Le stress hydrique

Le stress hydrique est obtenu soit par arrêt de l'arrosage pendant un temps donné soit par réduction de la réserve utile du sol (RU).

Dans le deuxième cas les stress hydriques sont provoqués par un tarissement en eau du sol (arrêt de l'arrosage) de façon à obtenir une contrainte en pourcent de la réserve utile. La mesure du taux de tarissement se fait par pesée. Pour chaque pot nous avons calculé la réserve totale (RT) et la RU ($\text{RU} = 1/2 \text{ RT}$). La réserve totale est mesurée à partir de quatre échantillons du substrat utilisé qui sont ramenés à la capacité au champs, pesés, séchés à 105°C pendant 48 heures, puis repesés. La différence entre le poids frais et le poids sec nous donne la réserve totale (Ducroq, 1990). Les stress hydriques sont appliqués aux trois stades phénologiques critiques (stade végétatif, stade floraison et stade gousse).

15. Le potentiel hydrique

Le potentiel hydrique est mesuré sur la dernière feuille du sommet entièrement formée entre 10h et 12h par la technique de la chambre à pression (Scholander et *al.*, 1964). Le potentiel hydrique nodulaire est mesuré par la même technique que le potentiel osmotique. Dix à quinze nodules sont prélevés au hasard sur le système racinaire puis coupés en deux avant d'être placés dans la chambre psychrométrique Wescor (Durand et *al.*, 1987). Le temps d'équilibre thermique est de 30 à 60 mn selon l'intensité du stress hydrique.

16. La teneur en eau relative

La teneur en eau relative est calculée d'après trois mesures : le poids de matière fraîche (MF), le poids de matière à la saturation hydrique (MSH) et le poids de matière sèche (Turner, 1981).

17. Le stress thermique

Les températures appliquées ont été choisies sur la base d'expériences préliminaires : 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C.

Les différentes températures sont appliquées dans un phytotron où les plantes subissent les différents traitements pendant 24 heures, entre 19h et 7h, avec une photopériode de 10h le jour et 14h la nuit. Ensuite les plantes sont retirées pour subir des mesures à la température ambiante (environ 23 °C) de l'ARA et de l'ANR.

La tolérance aux basses températures des souches de rhizobium est évaluée par leur capacité à se développer à deux températures contrastées (15 et 25°C). Cette évaluation est réalisée dans des boîtes de Pétri avec des stries sur milieu YEM (Vincent, 1970). Les souches capables de croître à 15°C sont réévaluées par leur taux de croissance dans un milieu liquide. Les isolats sont placés dans des tubes à essai de 20ml contenant 5ml de milieu YEM liquide agité. La densité optique à 620 nm est observée après 1, 3, 5, et 7 jours, et la croissance relative est calculée par la formule $[\ln (DO_{620})_{7^{eme}} \text{ jour} - \ln (DO_{620})_{1^{er}} \text{ jour}] / 7 \text{ jours}$ (Lynch et Smith, 1993).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : Evolution et distribution des activités nitrate réductase, glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase

I . Introduction

Le développement morphologique et la spécialisation fonctionnelle d'un organe multicellulaire s'accompagnent de l'apparition de caractéristiques biochimiques et entre autres, d'enzymes spécifiques dont l'activité peut varier qualitativement et quantitativement (Scandalios, 1974).

Le déclenchement d'une activité enzymatique nouvelle ou son accroissement dans un organe en développement peut résulter soit, d'une synthèse de novo de la molécule enzymatique, soit de l'activation d'un précurseur préexistant de l'enzyme. Le mécanisme exact par lequel les cellules des organismes supérieurs multicellulaires peuvent réguler l'expression différentielle de macromolécules pendant leur cycle de développement n'est pas suffisamment connu. Mais ce problème, peut être contourné par une approche métabolique préliminaire qui consiste à étudier l'ontogénie des enzymes qui caractérisent cette voie et qui reflètent les changements fondamentaux qui se succèdent pendant la différenciation (Lauriere, 1983 ; Foissner et *al.*, 2000).

La recherche de modifications spécifiques et leur universalité dans le fonctionnement d'une enzyme peut constituer un marqueur du développement foliaire. Savoir, si une activité enzymatique peut constituer un marqueur de développement foliaire a conduit à rechercher une modification spécifique et son universalité. En dehors de situations pathologiques, aucune enzyme n'a pu être définie isolément comme un marqueur du développement. En fait, un certain nombre de changements enzymatiques sont associés à ces processus. Certaines enzymes comme les catalases et les pyrophosphatases alcalines diminuent leur activité avec l'âge ; par contre les pyrophosphatases acides, cellulases et certaines nucléases et peptides hydrolases deviennent plus actives pendant la sénescence (lauriere, 1983). Des expériences faites sur la sénescence foliaire (thomas et stoddart, 1980; lauriere, 1983) ont montré des modifications enzymatiques associées à cette phase, chez certaines espèces végétales. L'évolution et la régulation de quelques enzymes apparaissent ainsi caractéristiques de la sénescence (lauriere, 1983 ; Weiner et Kaiser, 2000).

Les enzymes de l'assimilation de l'azote, au cours du développement et de la sénescence de la feuille ont fait l'objet de nombreuses études. Les modèles expérimentaux utilisés incluent des feuilles intactes (Storey et Beevers, 1978; Kang et Titus, 1980; Simpson et Dalging, 1981; Streit et Feller, 1982) ou des feuilles excisées (Delledonne et *al.*, 2001).

De même, l'étude comparée de l'activité de ces enzymes a été entreprise chez de nombreuses espèces comme le pois (storey et beevers, 1978), le sorgho (kang et titus, 1980), le pommier (simpson et dalling, 1981) et le haricot (streit et feller, 1982). La distribution de ces activités dans les différents étages foliaires n'a été faite que pour la nitrate

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

réductase chez le soja (Cotelle et *al.*, 2000) et chez la tomate (doddema et *al.*, 1986). Par contre, la distribution des activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase n'est connue que chez très peu d'espèces.

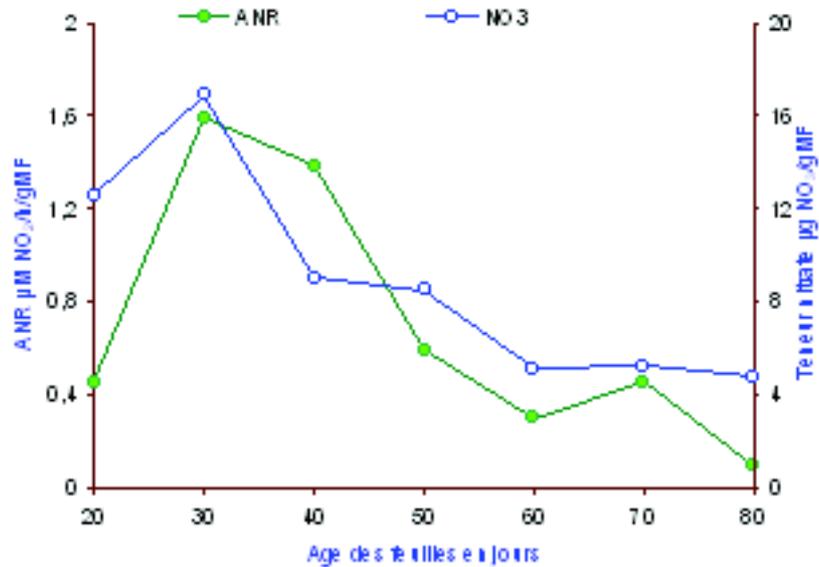


Figure 1 Evolution de l'ANR et de la teneur en nitrates en fonction de l'âge des feuilles

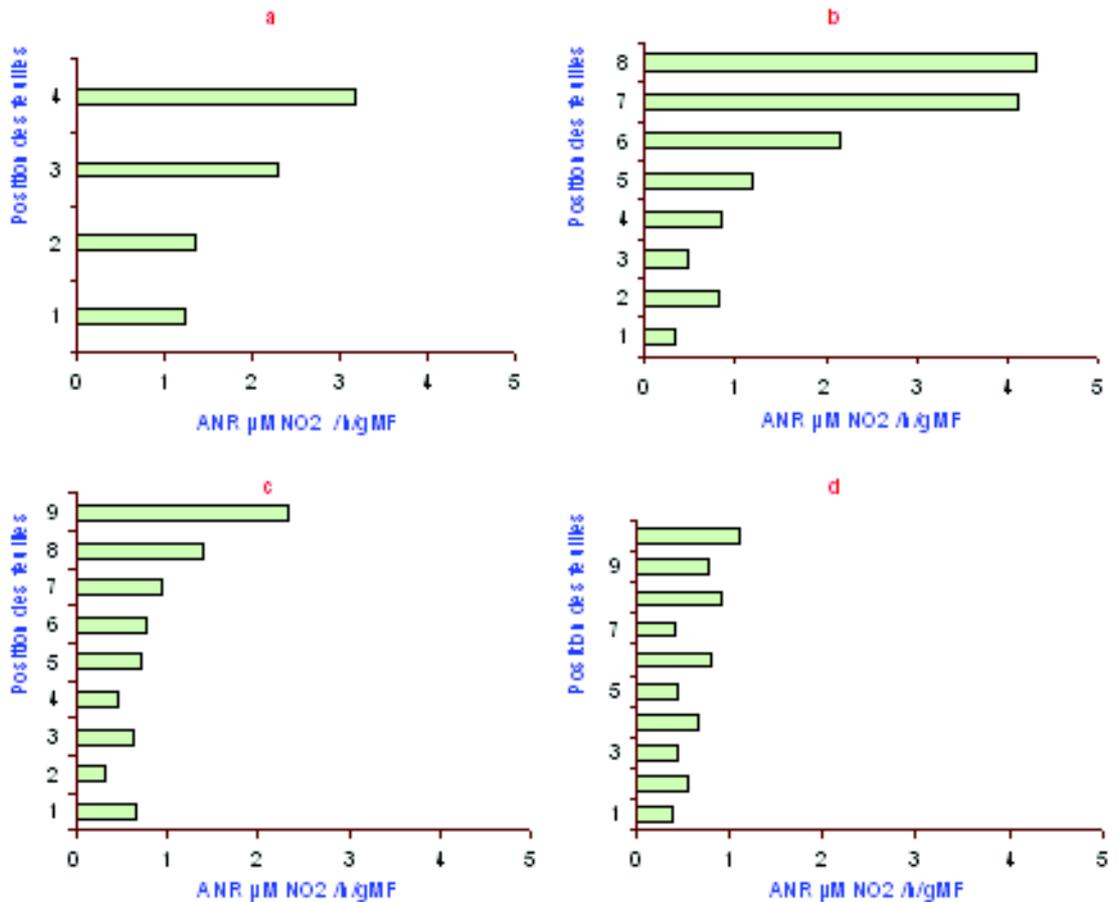


Figure 2 Activité nitrate réductase dans les différents étages foliaires aux stades, végétatif floraison (b), gousses (c), et maturité (d)

Chez le pois chiche, l'évolution comparée des activités nitrate réductase, glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase au cours du développement et de leur distribution dans les différents étages foliaires devrait aider à mieux comprendre leurs fonctions respectives et permettre ainsi leur intégration dans la plante entière.

II . Résultats

1. La nitrate réductase

1.1. Activité nitrate réductase (ANR) en fonction de l'âge des feuilles

L'activité NR des feuilles de pois chiche, provenant d'une culture en serre dans un milieu contenant du nitrate et de l'ammonium, augmente pendant l'expansion foliaire. Le maximum d'activité est observé au 30^{ème} jour après leur apparition. La NR atteint l'activité maximale après la complète expansion foliaire; puis elle diminue très rapidement et elle est très faible dans les feuilles sénescents (fig. 1).

1.2. Activité nitrate réductase des feuilles en fonction des étages foliaires

L'activité NR mesurée à différents stades phénologiques (4 feuilles, début floraison, plein floraison, début gousses et maturité) varie selon la position des feuilles sur la tige (fig.2). La majeure partie de l'activité NR du couvert végétal se trouve dans les trois ou quatre jeunes feuilles les plus récemment développées qui représentent 80% de l'activité totale au début de la floraison (fig. 2b) et 70% au début du remplissage des gousses (fig. 2c). Elle diminue progressivement et ne représente plus que le quart de l'activité totale au stade de remplissage des gousses (fig. 2c). Au stade maturité, l'activité nitrate réductase est très faible dans toutes les feuilles quelque soit leur position (fig. 2d). Une activité nitrate réductase élevée est donc une caractéristique des jeunes feuilles (Streit et Feller, 1982 ; Kato et *al.*, 2003). Elle se traduit par une forte assimilation des nitrates qui atteint son optimum dans la jeune feuille en pleine croissance et décroît progressivement au cours du cycle de développement de la plante sans s'annuler. Elle reste à un niveau relativement faible mais se maintient afin d'assurer l'approvisionnement du métabolisme azoté ou même de contribuer à l'enrichissement en azote des graines à la fin du cycle.

1.3. Teneur en nitrate des feuilles en fonction des étages foliaires

La teneur en nitrate atteint un maximum dans les feuilles 30 jours environ après leur apparition (fig. 1). Le maximum correspond toujours à la phase exponentielle de la croissance de la feuille. Ce pic diminue assez rapidement pour rester à un niveau faible mais constant jusqu'à la fin du cycle.

La distribution de la teneur en nitrate dans la partie aérienne présente, comme l'activité NR, un gradient vers le sommet de la plante (feuilles les plus jeunes), du moins jusqu'au remplissage des gousses (fig. 3c). Les trois feuilles apicales contiennent environ 95% du nitrate contenu dans l'ensemble des feuilles au début de la floraison (fig. 3 b). Cette dominance disparaît progressivement et les feuilles du sommet ne contiennent plus que 17% du nitrate foliaire au stade maturité (fig. 3d).

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

La corrélation entre la teneur en nitrate et l'activité NR dans les feuilles est excellente et rejoint l'observation générale selon laquelle l'activité NR est étroitement dépendante de la disponibilité en nitrate (Boyat et Robin 1977; Robin *et al.*, 1983). Le coefficient de

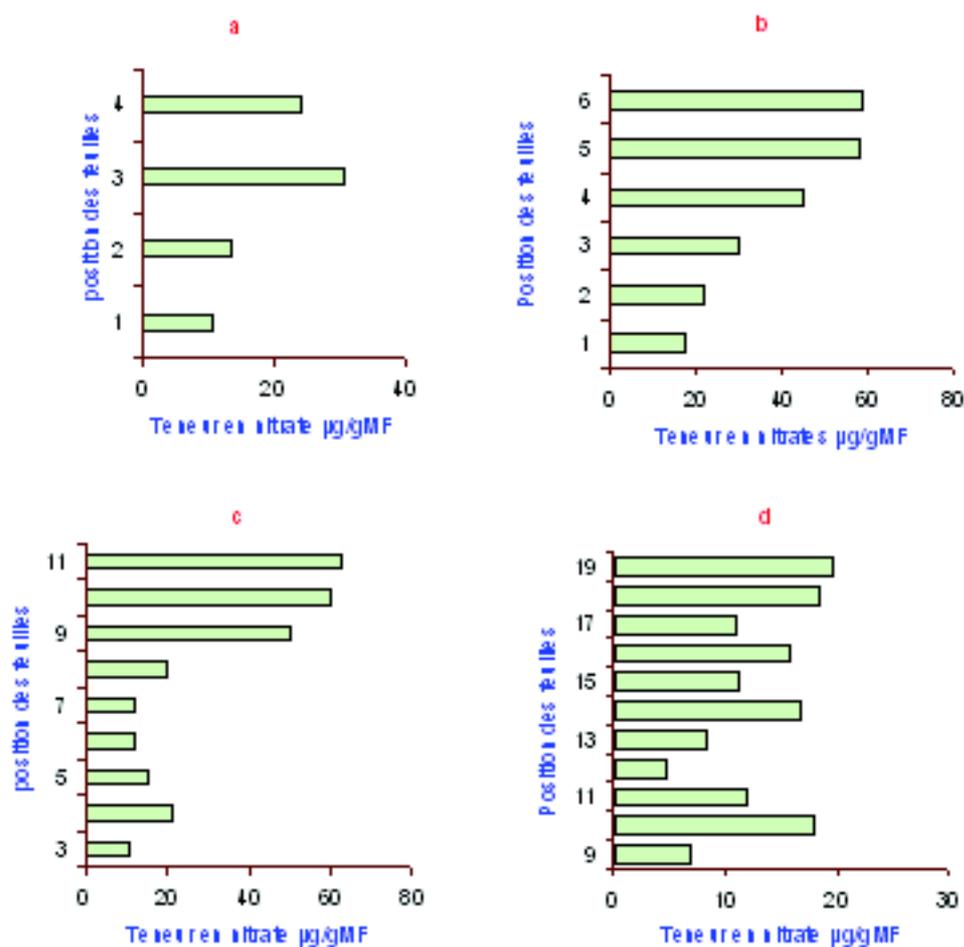


Figure 3 Teneur en nitrate des feuilles dans les différents étages foliaires aux stades, végétatif (a), floraison (b), gousses (c), et maturité (d)

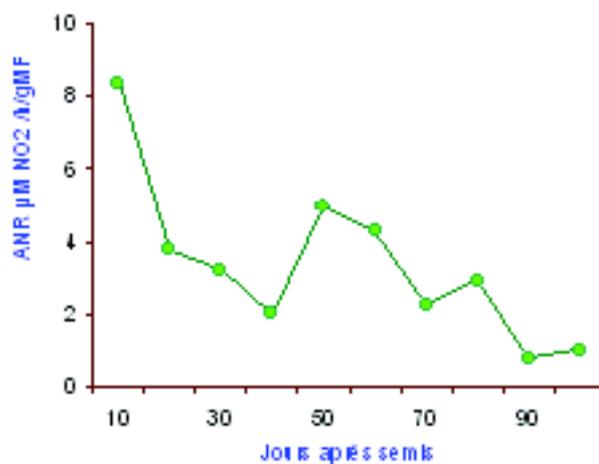


Figure 4 Activite nitrate réductase moyenne de l'ensemble des feuilles en fonction du cycle de la plante

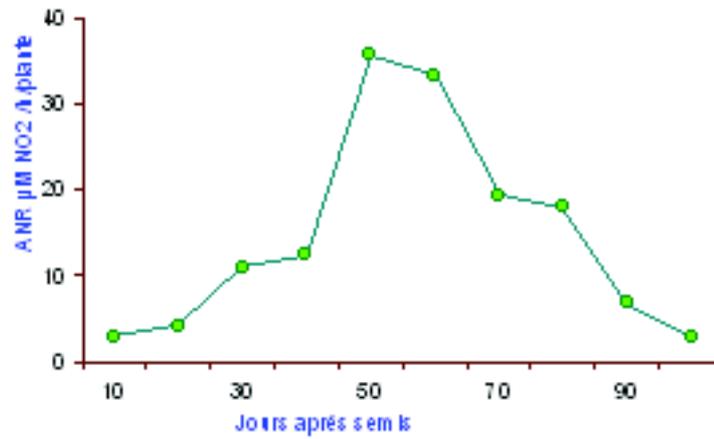


Figure 5 Activite nitrate réductase totale des feuilles en fonction du cycle de la plante

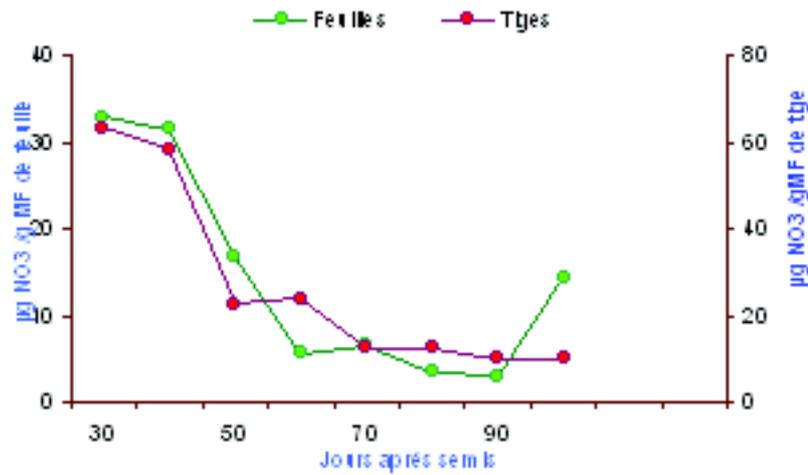


Figure 6 Teneur moyenne en nitrate dans les feuilles et dans les tiges au cours du cycle de la plante

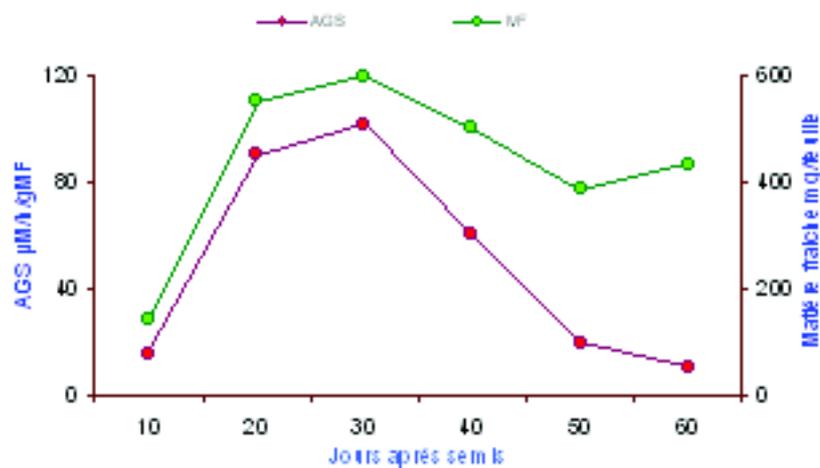


Figure 7 Evolution de la matière fraîche et de l'activité glutamine synthétase des feuilles au cours du cycle de la plante

corrélation est de 0.97 ($p \leq 0,05$) pour le stade floraison, 0.88 ($p \leq 0,05$) pour le stade gousse et de 0.86 ($p \leq 0,05$) pour le stade maturité.

L'activité NR moyenne de l'ensemble des feuilles, exprimée en μM par gramme de matière fraîche et par heure est très élevée au début du cycle, puis décroît rapidement (fig. 4). Dans nos conditions de culture nous observons une augmentation de l'activité à la fin de la floraison ou au début de la formation de gousses, qui diminue lentement en se maintenant à un niveau non négligeable, de l'ordre de $1 \mu\text{M}/\text{h}/\text{gMF}$, jusqu'aux stades maturité et sénescence (fig. 4). Une distribution semblable de l'activité nitrate réductase des feuilles, au cours du cycle a été observée par Kimou (1984).

L'activité NR totale de l'ensemble des feuilles augmente régulièrement et atteint un maximum pendant la pleine floraison, puis décroît, donnant une courbe en cloche (fig. 5). Cette évolution de l'activité nitrate réductase a été souvent observée en serre comme au champ (Obaton et al. 1982; Kimou, 1984 ; Kandlbinder, 2000).

La teneur moyenne en nitrate dans les feuilles comme dans les tiges, élevée au début du cycle, atteint un maximum avant la floraison, puis décroît brusquement et se maintient à une valeur inférieure à $10 \mu\text{g}/\text{gMF}$ dans les feuilles et à $20 \mu\text{g}/\text{gMF}$ dans les tiges pendant la phase de remplissage des gousses (fig. 6). La teneur moyenne en nitrate dans les tiges est nettement supérieure à celle des feuilles tout au long du cycle. Cette observation rejoint celle de Provan et al. (2000) faite sur le Soja cultivé au champ. La teneur en nitrate dans les feuilles et les tiges a une évolution assez semblable à celle de l'activité NR, mais le pic du nitrate précède d'une semaine celui de l'activité NR.

2. La glutamine synthétase (GS)

L'activité GS de la feuille au cours de son développement augmente avec la croissance foliaire et atteint sa valeur maximale lorsqu'elle est complètement développée soit environ 30 jours après son apparition (fig. 7). Cette activité diminue très rapidement au cours de la sénescence. Une évolution semblable se rencontre chez le pois (Storey et Beevers, 1978) et chez le haricot (Streit et Feller, 1982).

La figure 8 montre que l'activité GS aux stades, végétatif (fig. 8a), floraison (fig. 8b), gousse (fig. 8c), et maturité (fig. 8d) est plus élevée dans les feuilles médianes et diminue considérablement dans les feuilles situées à la base et au sommet de la plante. Cette distribution est encore plus favorable aux feuilles médianes lorsque l'activité est exprimée par organe. Le fait que la plus haute activité exprimée par gramme de matière fraîche ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{gMF}$) soit localisée dans les feuilles dont la masse foliaire est la plus importante, ne fait qu'augmenter la différence entre les feuilles des différents étages foliaires lorsque l'activité est représentée par feuille et par heure. Les étages foliaires reproduisent un gradient de feuilles du sommet les plus jeunes (en croissance), aux feuilles de la base les plus âgées (en sénescence). La plus haute activité GS apparaissant donc dans les feuilles en pleine maturité.

Au stade plus avancé de la plante (fig. 8d) l'activité GS s'accroît dans les feuilles du sommet. En effet, le nombre de feuilles en voie de développement diminue progressivement à la fin du cycle végétatif, de telle façon qu'au stade maturité il n'y a plus que des feuilles complètement développées ou sénescentes (fig. 8d)

L'activité GS moyenne de l'ensemble des feuilles augmente rapidement au début du cycle végétatif. Elle se maintient très élevée pendant une période assez longue, entre le début de la floraison et le remplissage des gousses, pour diminuer pendant la sénescence (fig. 9)

L'activité totale de l'ensemble des feuilles ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{plante}$) augmente rapidement jusqu'à la période de remplissage des gousses, puis elle diminue pendant la maturité. L'activité GS maximale des feuilles est plus tardive que celle de la nitrate réductase (fig. 5 et 9).

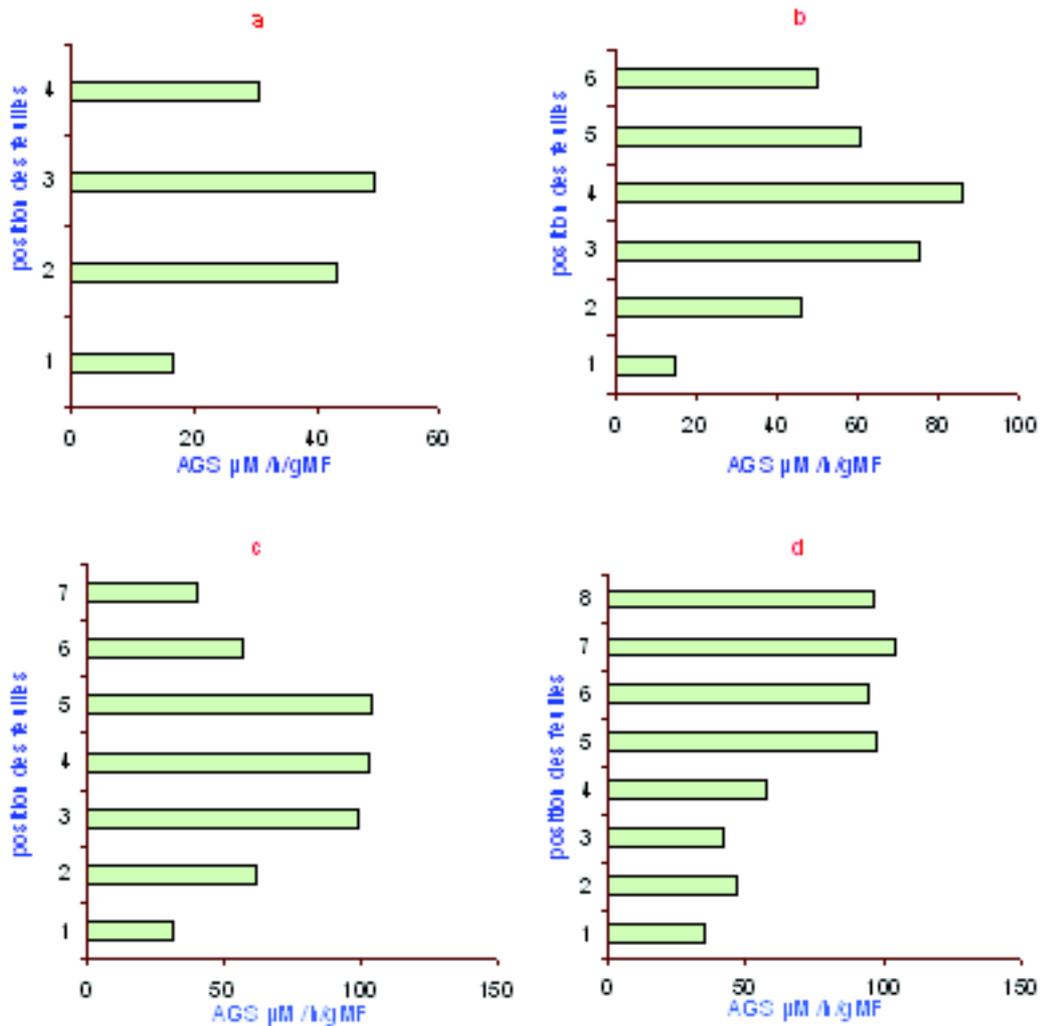


Figure 8 Activité synthétase dans les différents étages foliaires aux stades, végétatif (a), floraison (b), gousses (c), et maturité (d)

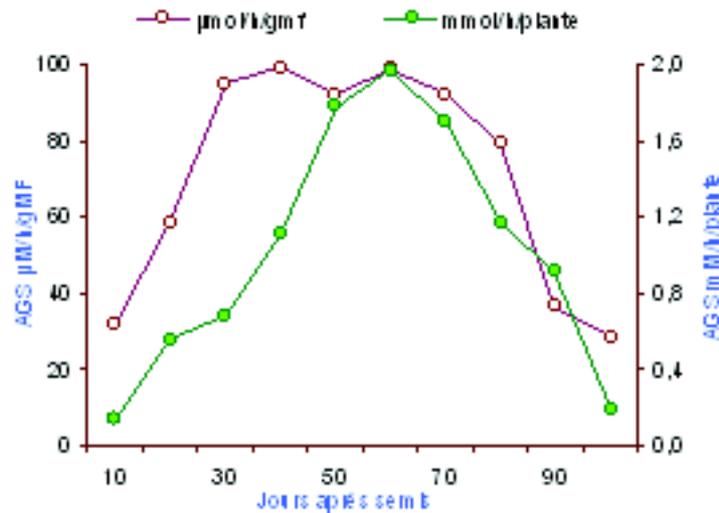


Figure 9 Activité glutamine synthétase moyenne et totale des feuilles en fonction du cycle de la plante

Pendant l'expansion foliaire, qui se traduit par l'accroissement de la matière fraîche de la feuille, la teneur en chlorophylle et l'activité GS augmentent simultanément pour diminuer après la maturité. La teneur en chlorophylle de la feuille atteint son maximum à la même période que l'activité GS (fig. 10).

La teneur en chlorophylle (exprimée en mg/gMF) dans la partie aérienne présente la même distribution que l'activité GS (exprimée en µM/h/gMF) (fig. 11b et c).

Lorsque l'activité GS est exprimée par mg de chlorophylle, ce gradient disparaît (fig. 11d), ce qui s'explique par le fait que les deux paramètres ont la même distribution au cours du développement foliaire (Streit et Feller, 1982).

D'après Wittenbach et *al.* (1980), l'accumulation de matière sèche chez le soja est étroitement liée à la photosynthèse, à la teneur en chlorophylle, et aux hydrates de carbone. Les symptômes initiaux de la sénescence se présentent comme une diminution de la photosynthèse, de la chlorophylle et de l'azote total de la feuille, ainsi que par une augmentation de l'activité protéolytique. L'activité GS globale pourrait donc constituer un témoin de la maturité de la feuille. En réalité, il existe une variation dans l'abondance des formes isofonctionnelles de la GS. Chez le soja, la forme chloroplastique est majoritaire dans tous les cas (Tirado, 1987). Dans la feuille à maturité, la GSII chloroplastique représente plus de 95% de l'activité totale, et 80% dans les feuilles sénescentes. L'activité de la GSI cytosolique reste constante pendant la vie de la feuille. Alors que l'activité GSII chloroplastique augmente au cours du développement et diminue pendant la sénescence foliaire (Tirado, 1987).

Les variations de l'activité GS totale au cours du développement de la feuille de soja ne peuvent donc être attribuées qu'à la synthèse ou à la dégradation de l'enzyme chloroplastique, dont la labilité a été maintes fois observée chez plusieurs espèces (Streit et Feller, 1982; Streit et Feller, 1983; McNally et Hirel, 1983).

3. La glutamate déshydrogénase (GDH)

3.1. Evolution de la GDH au cours du cycle de développement de la plante

L'activité NADH-GDH augmente continuellement au cours de la croissance de la feuille. Exprimée par gramme de matière fraîche, elle atteint son maximum dans les feuilles complètement développées pour se maintenir jusqu'à la fin de la vie de la feuille (fig. 12).

Nous observons la même évolution de cette activité lorsque l'AGDH est exprimée en $\mu\text{M/h/feuille}$ (fig. 12).

L'activité NADH-GDH aux stades, végétatif (fig. 13a), floraison (fig. 13b), gousse (fig. 13c) et maturité (fig. 13d) est plus élevée dans les feuilles de la base de la plante (feuilles les plus âgées) et diminue fortement dans les feuilles situées au sommet (feuilles les plus jeunes). Au stade maturité (fig. 13d), lorsque la majorité des feuilles se trouve en sénescence, l'activité est élevée dans l'ensemble du feuillage.

L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire. Une telle augmentation de l'activité GDH pendant la sénescence a déjà été observée chez les plantes supérieures (Postius et *al.*, 1976; Lauriere et *al.*, 1981a ; Streit et Feller, 1982; Lauriere, 1983 ; Cammaerts et Jacobs, 1985).

3.2. Relation entre la teneur en azote total et la GDH

La teneur en azote total des feuilles diminue avec l'âge. Cette diminution est plus prononcée au cours des deux premières semaines de la croissance, et s'infléchit pendant la maturité et la sénescence (fig. 14). Par contre, la quantité d'azote accumulée dans une feuille

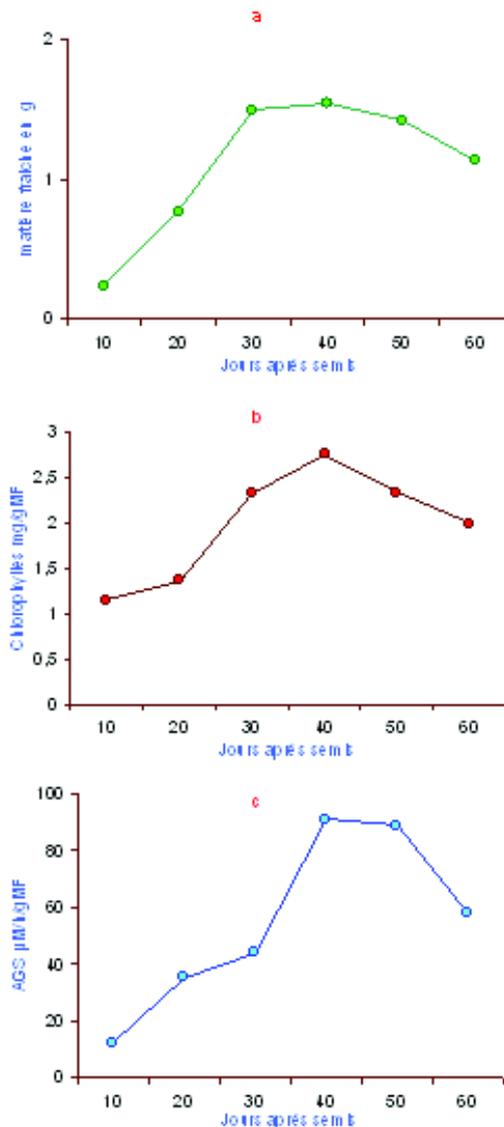


Figure 10 Evolution de la matière fraîche (a) de la chlorophylle (b) et de l'AGS au cours du cycle de la plante

(exprimée en mg/feuille) augmente avec la croissance foliaire (fig. 14). Cette augmentation fait apparaître le rôle de puits que représente la feuille à l'égard de l'azote pendant les premiers jours de sa croissance.

La diminution de la quantité d'azote après la maturité, au cours de la sénescence, résulte de la mobilisation de l'azote de la feuille sénescente vers les organes végétatifs en développement et/ou de réserve (Thomas et Stoddart, 1980). La feuille joue au cours de la maturité et de la sénescence un rôle de source d'azote pour les autres organes.

La diminution régulière de la teneur moyenne en azote au cours du temps est la conséquence d'une plus forte accumulation de macromolécules non azotées par rapport à l'accumulation d'azote. La forte croissance foliaire pendant la phase exponentielle cause par dilution, la réduction prononcée de la concentration d'azote de la plante (Mengel et Kirkby, 1982). Cette observation a déjà été constatée chez le soja (Wittenbach et al., 1980).

La distribution de la teneur en N total dans la partie aérienne présente un gradient vers le sommet de la plante (feuilles les plus jeunes) (fig. 15a et b), du moins jusqu'au remplissage des gousses(fig. 15c). La plus faible concentration en azote total est localisée dans les feuilles situées à la base de la plante (feuilles les plus âgées). Cette dominance disparaît progressivement au cours du cycle. Au stade maturité, nous remarquons une homogénéité dans la teneur en N total dans tous les étages foliaires de la plante (fig. 15d), une distribution semblable s'observe aussi dans la tige (fig. 16).

La concentration d'azote dans la tige est plus faible que dans la feuille contrairement à ce qui est observé pour le nitrate (tab.1). Ces résultats rejoignent ainsi, les observations faites chez le soja par Kandlbinder (2000).

Jours après semis	mg de N/g MS	
	Feuilles	Tiges
20	72.25	65.41
30	53.24	32.25
40	41.56	28.65
50	39.45	27.36
60	45.11	18.96
70	38.55	26.21
80	23.52	12.52
100	16.47	7.85
ppds 0.05	7.41	6.45

Tableau 1.- Teneur en azote total dans les feuilles et les tiges au cours du cycle de la plante

La diminution de l'azote total et l'augmentation de l'activité NAD-GDH semblent des caractéristiques communes de la sénescence foliaire ce qui se traduit par l'excellente corrélation, entre la teneur d'azote total et l'activité NADH-GDH dans les feuilles au moins jusqu'au remplissage des gousses (tab.2).

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

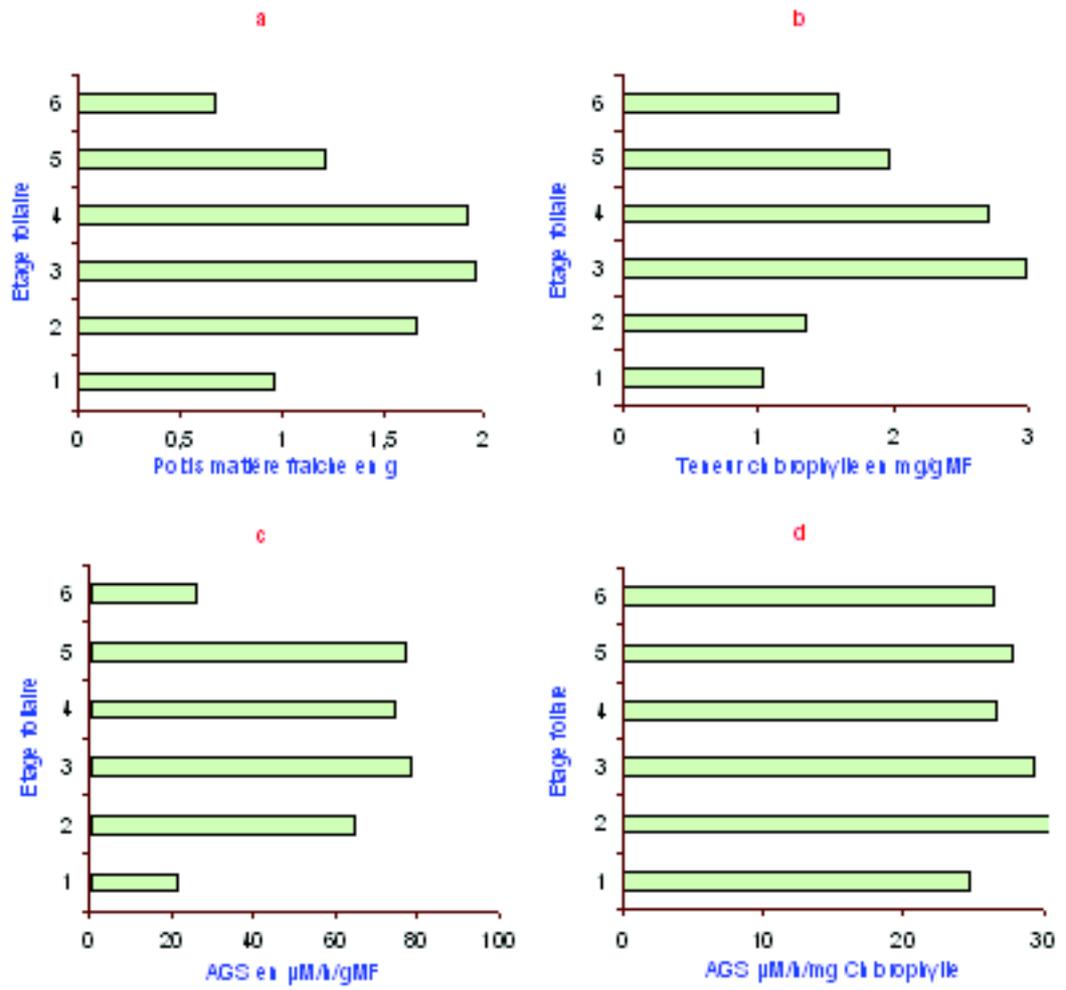


Figure 11 Poids de la matière fraîche (a), teneur en chlorophylle (b) et AGS (c) dans différents étages foliaires

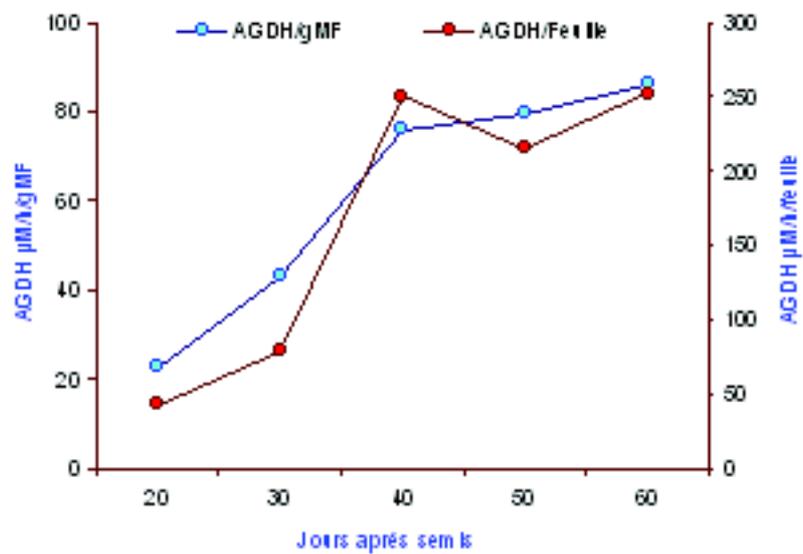


Figure 12 Evolution de l'AGDH au cours du développement des feuilles

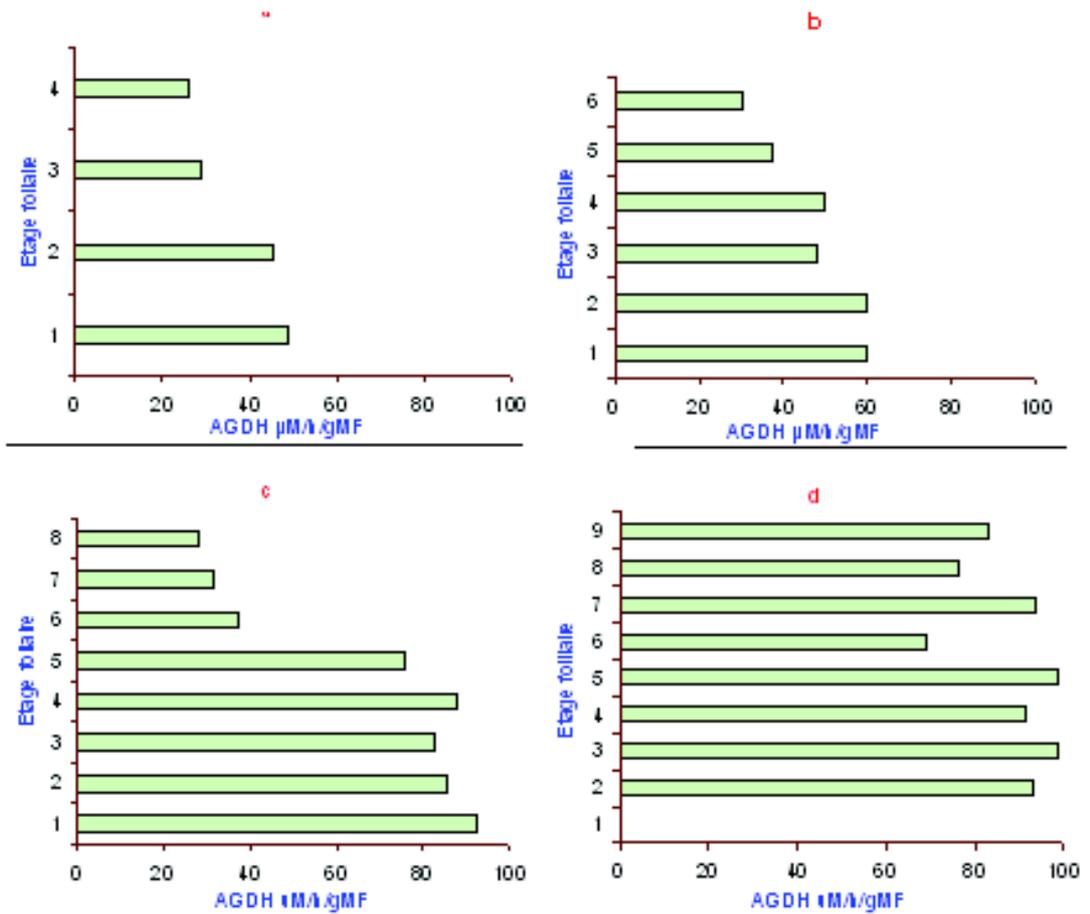


Figure 13 Evolution de l'AGDH dans les différents étages foliaires aux stades, végétatif (a), floraison (b), gousse (c) et maturité (d)

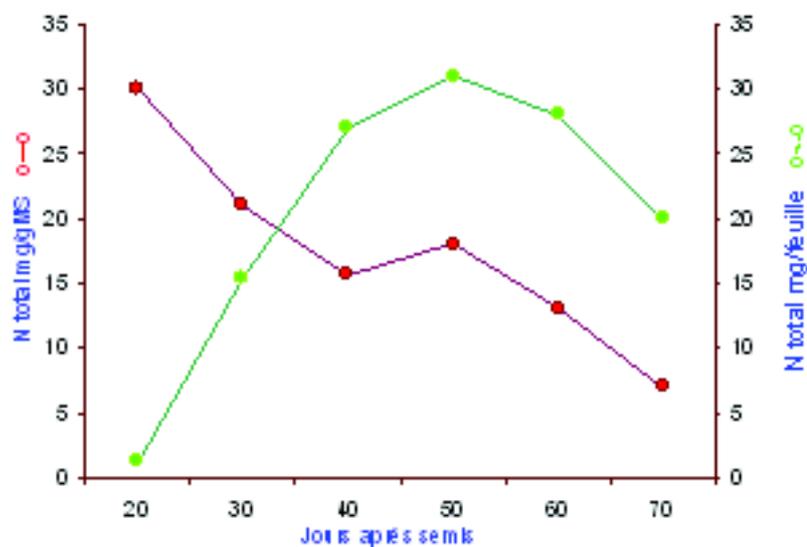


Figure 14 Teneur et accumulation de l'azote total dans les feuilles en fonction du temps

	Stade phénologique			
	Début floraison	Plein floraison	Gousses	Maturité
Essai 1		0.93	0.91	0.09
Essai 2	0.95	0.90	0.86	0.24

Tableau 2 : Coefficient de corrélation r entre l'activité GDH et la concentration en azote total des feuilles aux différents stades phénologiques.

3.3. Evolution de la GDH en fonction du nucléotide

La comparaison des activités NADH-GDH, NAD-GDH, NADPH-GDH et NADP-GDH a été étudiée au cours du développement de la feuille ainsi que dans les différents étages foliaires de la plante au stade début floraison.

Les activités GDH augmentent avec l'âge de la feuille et elles atteignent leur activité maximale dans la feuille sénescence (fig. 17). L'activité NADH-GDH maximale est en moyenne 5 fois plus élevée que l'activité mesurée avec les autres nucléotides. Les activités NAD-GDH et NADPH-GDH sont supérieures à l'activité NADP-GDH (fig. 17).

L'accroissement de l'activité GDH au cours du développement de la feuille diffère selon le nucléotide utilisé. La comparaison des rapports de l'activité NADH-GDH avec les autres activités GDH, montre que NADHGDH/NADPH-GDH et NADH-GDH/NADP-GDH ne changent pas significativement au cours de ce développement. Par contre, le rapport NADH-GDH/NAD-GDH augmente avec l'âge de la feuille et est maximal dans les feuilles sénescences où il est presque 3 fois plus élevé que dans les jeunes feuilles. L'activité NADH-GDH augmente donc plus rapidement que l'activité NAD-GDH au cours du développement (tab.3)

Tableau : 3 Variations du rapport de l'activité NADH-GDH sur les activités NADPH- GDH, NAD-GDH et NADP-GDH au cours du développement de la feuille.

Jours après semis	NADH-GDH / NADPH-GDH	NADH-GDH / NADP-GDH	NADH-GDH / NAD-GDH
20	5.21	16.45	2.31
30	7.65	18.35	2.52
40	6.12	19.54	3.51
50	5.32	18.54	5.62
60	4.62	16.25	6.86
Ppds 0.05	3.32	3.45	1.54

Les variations des rapports de l'activité NADH-GDH sur les activités NADPH-GDH et NADP-GDH ne sont pas significatives dans l'ensemble des feuilles de la plante. Par contre le rapport NADH-GDH/NAD-GDH diminue des feuilles de la base vers les feuilles du sommet où il est 3 fois plus faible (tab.3).

Les activités NADH-GDH et NAD-GDH moyennes ($\mu\text{M/h/gMF}$) de l'ensemble des feuilles ainsi que les activités totales (mM/h/plante) augmentent au cours du développement de la plante. Elles atteignent leur activité maximale pendant le remplissage des gousses pour se maintenir très élevées jusqu'à la maturité de la plante (fig. 18 et 19). Aux stades les plus tardifs de la sénescence, on observe une diminution de l'activité NAD-GDH mais

pas de la NADH-GDH qui reste constante. L'activité NADH-GDH maximale des feuilles est plus tardive que celle de l'activité NR, GS et NAD-GDH. A la différence des autres activités, celle de NADH-GDH est toujours très élevée jusqu'à la fin du cycle de développement de la plante.

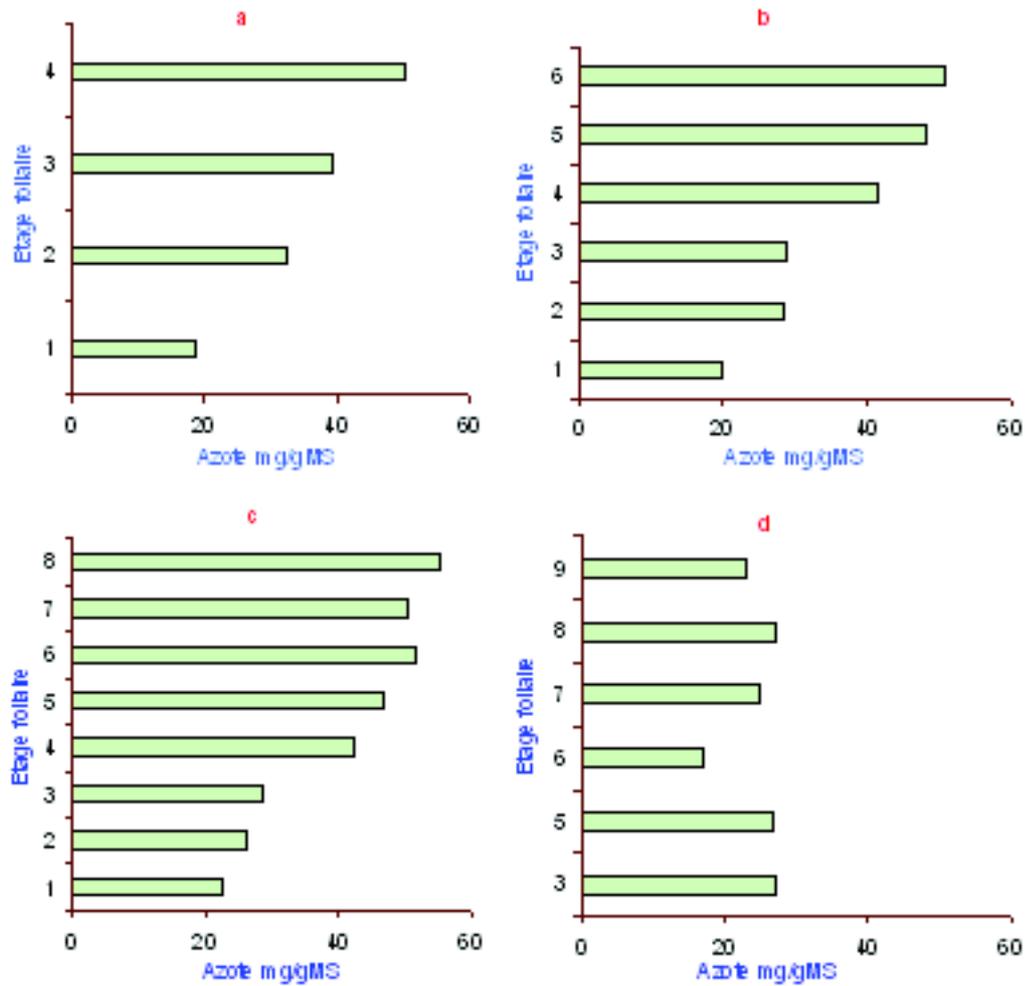


Figure 15 Teneur en azote dans les différents étages foliaires aux stades, végétatif (a), floraison (b), gousse (c) et maturité (d)

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

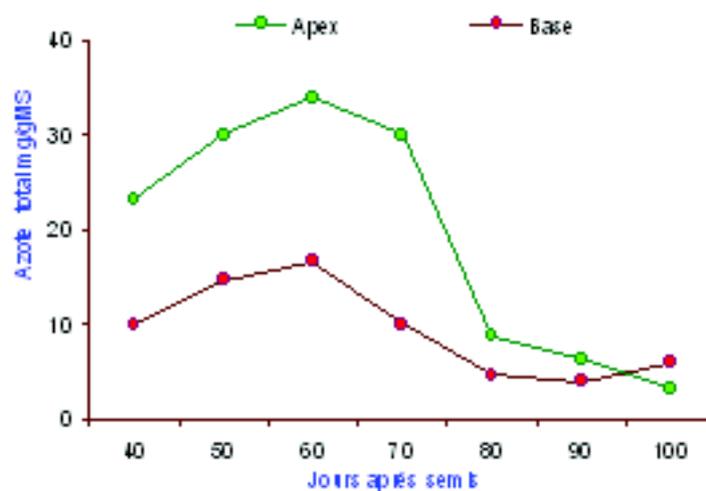


Figure 16 Teneur en azote total au niveau de l'apex et de la base de la tige

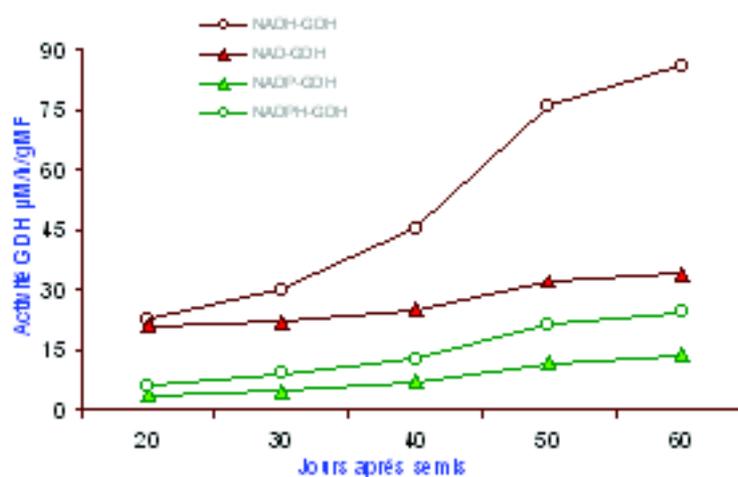


Figure 17 Evolution de l'activité AGDH avec les différents nucléotides au cours du développement de la feuille

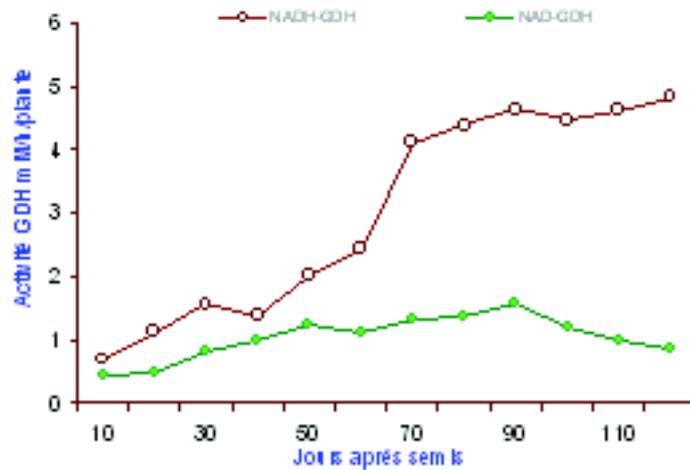


Figure 18 Evolution de l'activité moyenne NADH-GDH et NAD-GDH des feuilles au cours du cycle de la plante

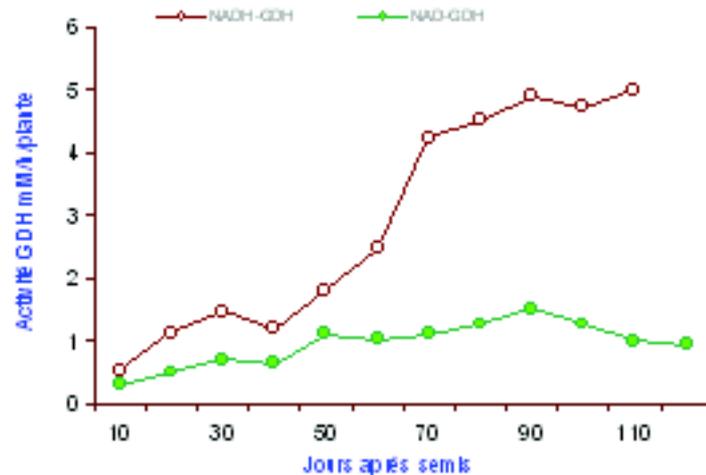


Figure 19 Evolution de l'activité totale NADH-GDH et NAD-GDH des feuilles au cours du cycle de la plante

III . Discussion

1 -La nitrate réductase

L'activité NR ainsi que la teneur en nitrate et azote total sont toujours maximales pendant la phase exponentielle de la croissance de la feuille à un stade de développement où se mettent en place les organes qui vont déterminer la masse de matière végétale produite (Foyer et al., 2003)

La nitrate réductase est la première enzyme de la chaîne métabolique qui permet aux végétaux d'assimiler l'azote nitrique pour aboutir à la formation de glutamine et de glutamate (Beevers et Hageman, 1980). Ces deux acides aminés vont fournir l'azote à la totalité des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique (Bryan, 1976; Lea et Mifflin, 1980). Cependant, l'activité NR est toujours plus faible que les activités GS et GDH. Dans nos

conditions de culture, l'activité NR est plus faible que l'activité GS et nettement plus faible que l'activité NADH-GDH. Cette enzyme catalyse une étape, considérée comme limitante de l'assimilation du nitrate (Beevers et Hageman, 1980 ; Abd-El baki et *al.* 2000).

2-La glutamine synthétase

La conversion du glutamate en glutamine est le mécanisme le plus important pour l'utilisation de l'ammonium formé dans les chloroplastes (Temple et *al.* 1994). Il n'est pas étonnant de trouver une plus haute activité GS dans les feuilles qui atteignent leur maximum de développement ou leur plus haute capacité photosynthétique. Ceci est d'autant plus vrai que la GSII chloroplastique chez le Soja est l'isoforme la plus abondante au cours du développement de la feuille (entre 80% et 95% de l'activité totale) (Temple et *al.*, 1998a).

L'incorporation de l'ammonium dans les acides aminés par la voie GS/GOGAT se justifie en partie par la haute affinité de la GS pour l'ammonium (Mifflin et Lea, 1977). L'accumulation d'acides aminés libres et l'accroissement de l'activité GS dans les jeunes feuilles de pois indiquent que cette enzyme intervient dans l'assimilation de l'ammonium (Storey et Beevers, 1978). Sa diminution rapide pendant la sénescence (Storey et Beevers, 1978; Simpson et Dalling, 1981; Streit et Feller, 1982 et 1983) peut être due à la dégradation des chloroplastes qui pendant la sénescence s'accompagne d'une dégradation de la chlorophylle et une diminution de la photosynthèse (Thomas et Stoddart, 1980). Cette diminution de l'activité GS correspond à une diminution de la capacité d'assimilation de l'ammonium qui peut alors s'accumuler dans les tissus sénescents (Temple et *al.*, 1995).

La glutamine synthétase chloroplastique (GSII) intervient donc, dans l'assimilation de l'ammonium issu directement de la réduction du nitrate. Par ailleurs, une plus haute activité de la GS par rapport à la glutamate synthétase (GOGAT), a fait suggérer qu'en plus de son rôle d'assimilation, la GSII pourrait jouer un rôle dans la désintoxication de l'ammonium dans les chloroplastes (Suzuki et Gadal, 1982).

Il a été également suggéré que la GSI cytoplasmique dans les feuilles pourrait fonctionner pour l'assimilation de l'ammonium dans le cytoplasme à l'obscurité (Hirel et Gadal, 1980). Par ailleurs, la GS cytoplasmique (GSI) pourrait être responsable de la réassimilation de l'ammonium produit pendant la photorespiration (Keys et *al.*, 1978). L'assimilation de l'ammonium se produit pendant la photorespiration (Keys et *al.*, 1978). L'ammonium produit est plus abondant chez les plantes C₃, que chez les plantes C₄. Paradoxalement, les plantes C₃ (haute photorespiration) sont classées par Mc Nally et *al.* (1983), dans le "groupe C" qui se caractérise par une GSI cytoplasmique minoritaire (5 à 30% de l'activité totale); les plantes C₄ (photorespiration faible ou nulle) sont classées dans le "groupe D" qui se caractérise par une GSI cytoplasmique très abondante (plus de 30% de l'activité totale).

Chez les plantes C₃, la quantité d'ammonium libérée dans la mitochondrie pendant la photorespiration, a été estimée être 5 fois plus élevée que l'azote transporté par le xylème vers la feuille (Keys et *al.*, 1978). Lorimer et Andrews (1981) estiment que le flux d'ammonium pendant la photorespiration pourrait être plus élevé que la proportion de son assimilation nette.

Postérieurement, il a été suggéré que les chloroplastes ont la capacité de réassimiler l'ammonium produit pendant la photorespiration (Woo et Osmond, 1982), et que les plantes qui ont une faible quantité ou qui ne possèdent pas la GSI cytoplasmique, peuvent assimiler

dans le chloroplaste, l'ammonium issu de la réduction du nitrate ainsi que celui produit pendant la photorespiration (Hirel et *al.*, 1982; McNally et *al.*, 1983).

Ainsi la variation de l'activité GS au cours du développement de la feuille est due principalement à la synthèse ou à la dégradation de l'enzyme chloroplastique (Streit et Feller, 1982 et 1983, Robin et Salsac, 1985). Il est donc probable que si l'enzyme cytoplasmique contribue à l'assimilation de l'ammonium, elle pourrait être plus importante dans les cellules immatures où l'activité GSII chloroplastique est encore très faible (Robin et Salsac, 1985)

3- La glutamate déshydrogénase

Dans les feuilles, nous observons une augmentation de l'activité GDH au cours du développement et de la sénescence (fig. 12, 13 et 17). Cette augmentation de l'activité GDH semble être une caractéristique du vieillissement chez la plupart des espèces étudiées. Elle pourrait résulter soit, d'une synthèse de novo de l'enzyme (Lauriere et *al.*, 1981), soit de l'augmentation d'isoformes déjà préexistantes (Vance et *al.*, 1994). Comme elle pourrait correspondre à l'apparition d'une enzyme de désamination fournissant des squelettes carbonés et du NADH (Streit et Feller, 1982; Cammaerts et Jacobs, 1985), ou comme cela a été démontré chez le blé, à l'apparition d'une isoforme GDH₂, abondante dans les feuilles sénescences et distincte de la GDH₁ présente dans les tissus jeunes (Lauriere et *al.* 1981). Cette GDH₂ serait inductible par l'ammonium issu de la désamination des acides aminés résultant de la protéolyse (Temple et *al.*, 1998b).

L'activité NADH-GDH maximale est nettement plus élevée que l'activité mesurée avec les autres nucléotides (fig. 17). Les activités NAD-GDH et NADPH-GDH sont du même ordre de grandeur et supérieures à l'activité NADP-GDH; cela peut être justifié par la présence d'isoformes différentes. En effet chez le soja par exemple, il existent trois isoformes distinctes qui peuvent être différenciées par leur spécificité à l'égard des nucléotides (McKenzie et Lees, 1981). La GDH₁ localisée dans les graines est absente dans les feuilles et les racines. Cette isoforme qui diminue pendant la germination n'est plus détectée dans les cotylédons douze jours après la germination ; elle est active avec NADH, NAD, NADPH et NADP. Les deux autres isoformes sont associées par analogie aux chloroplastes et mitochondries des autres parties de la plante. La GDH₂, décrite comme une enzyme chloroplastique, est active avec NADH, NAD et NADPH, et peu active avec NADP. La GDH₃, associée aux mitochondries, est active avec NADH et NAD, peu active avec NADPH et pas active avec NADP.

Dans notre cas, la capacité d'amination NADH-GDH est plus élevée que la capacité de désamination NAD-GDH. Ces activités NAD-GDH et NADH-GDH augmentent au cours du développement et sont très élevées pendant la sénescence. Le maximum d'activité se manifeste aussi plus tardivement pour la NADH-GDH que pour la NAD-GDH. Aux stades les plus tardifs de la sénescence, on observe une diminution de l'activité NAD-GH mais pas de la NADH-GDH qui se maintient constante. Ces observations rejoignent Cammaerts et Jacobs (1985), faites sur les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* et celles de Loyola et Sanchez (1986) à partir de culture de tissus de maïs.

Ces résultats se traduisent par une modification du rapport NADHGDH/NAD-GDH qui augmente notamment avec l'âge de la feuille; il est maximum dans les feuilles sénescences (tab. 3). L'évolution de ce rapport paraît difficile à interpréter sur la base des observations de McKenzie et Lees (1981) où GDH₂ chloroplastique et GDH₃ mitochondriale ne se distinguent que sur la base de la spécificité ou de la non spécificité pour le NADP.

Le nombre d'isoformes de la GDH dans les tissus végétaux est susceptible de varier sous l'influence de différents facteurs, comme le stade de développement et la sénescence (Lauriere et *al.*, 1981 ; Vance et *al.*, 1995). Ce changement du nombre d'isoformes a été décrit en particulier à l'aide des techniques électrophorétiques. Il peut être dû à la perte de certaines bandes d'activité GDH au cours du développement comme cela a été observé chez l'hypocotyle du Haricot (Yue, 1969) et chez les feuilles de luzerne (De Vienne, 1983), ou bien à l'augmentation ou à l'apparition de nouvelles bandes absentes précédemment (Cammaerts et Jacobs, 1985). La variation du nombre d'isoformes de la GDH dans les tissus pourrait donc être considérée comme un signal caractéristique du stade de différenciation de leurs cellules.

Cammaerts et Jacobs (1985) ont observé que les activités NADH-GDH et NAD-GDH de la feuille d'*Arabidopsis thaliana* augmentent au cours de son développement. En même temps, est associé un changement dans le nombre et l'intensité des bandes d'activité GDH. Pendant le développement de la plante, l'activité relative des isoformes les plus cathodales augmente tandis qu'en fin de sénescence, l'intensité de ces mêmes isoformes diminue pour laisser apparaître les isoenzymes les plus anodales. Ils suggèrent que la réaction NAD-GDH correspondrait aux isoenzymes les plus cathodales et la réaction NADH-GDH aux isoenzymes les plus anodales. Ces dernières pourraient être les isoformes synthétisées de novo et rencontrées au cours de la sénescence chez les cotylédons de *Cucurbita moschata* (Chou et Splittstoesser, 1972), chez les feuilles de *Cucurbita maxima* (Postius et *al.*, 1976) ou chez les feuilles de blé (Lauriere et *al.*, 1981).

L'existence de différentes isoformes pourrait donc expliquer les différences observées entre NADH-GDH, NADPH-GDH, NAD-GDH et NADP-GDH, et particulièrement les rapports NADH-GDH/NAD-GDH.

Le changement du rapport NADH-GDH/NAD-GDH au cours du développement de la feuille pourrait être d'une grande importance physiologique. La réaction NAD-GDH peut jouer un rôle important dans l'apport d'énergie (formation de NADH) et des squelettes carbonés pendant l'assimilation active de la cellule et spécialement au cours de la sénescence lorsque les chloroplastes deviennent inefficaces (Cammaerts et Jacobs, 1985). Une importante activité NADH-GDH pendant les stades les plus tardifs de la sénescence ne peut que révéler l'important rôle de cette isoforme dans la désintoxication de l'ammonium provenant de la protéolyse (Lauriere et Daussant, 1983), spécialement lorsque l'activité GS diminue fortement (Yoshioka et *al.*, 1999).

Si les isoformes ont une signification en relation avec le sens de la réaction enzymatique, nous pouvons penser que ces isoenzymes peuvent avoir une signification fonctionnelle spécifique dans la plante. La purification partielle de chaque isoforme de la GDH permettrait l'analyse détaillée des différentes isoformes et un examen des caractéristiques cinétiques de chaque isoenzyme.

IV. Conclusion

L'observation et l'analyse des différents étages foliaires de la plante à un stade déterminé présentent une analogie avec le développement de la feuille. Le sommet représente les organes en développement, le milieu les feuilles en pleine maturité et la base de la plante

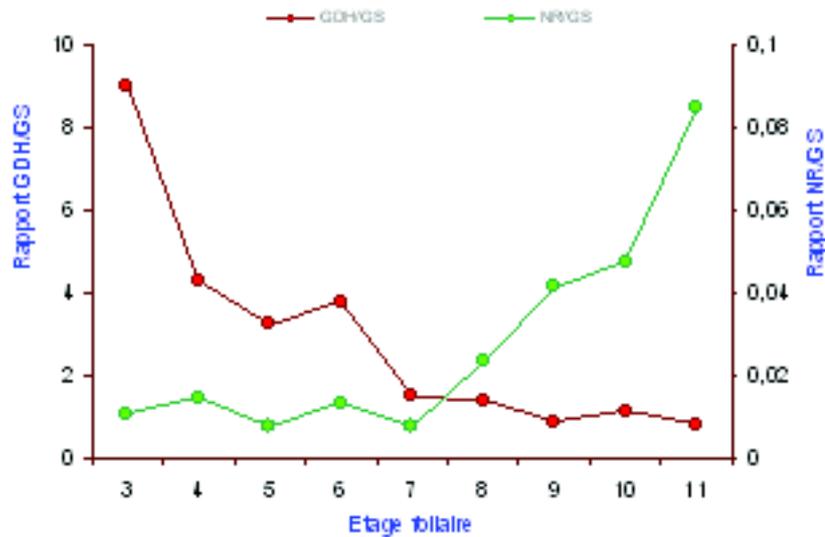


Figure 20 Evolution des rapports NR/GS et GDH/GS dans les différents étages foliaires au stade gousses

les feuilles sénescentes. Chaque étage foliaire peut donc être associé à une phase de l'ontogénie foliaire.

Les maxima de l'activité NR, de la teneur en nitrate et de l'azote total sont caractéristiques du début de la vie de la feuille ou des feuilles du sommet de la plante. Lorsque la feuille atteint sa maturité, l'activité GS et la teneur en chlorophylle sont maximales (phénomène aussi observé chez les feuilles médianes de la plante). Après la maturité de la feuille, nous observons une très faible activité NR ainsi qu'une très faible teneur en nitrate et azote total, une diminution de l'activité GS et de la teneur en chlorophylle et une très forte activité GDH.

L'activité GS a la même évolution que celle de la matière fraîche et de la teneur en chlorophylle. D'après Wittenbach et al. (1980), l'accumulation de la matière sèche est étroitement liée à la photosynthèse, à la chlorophylle, aux hydrates de carbone et à l'activité ribulose biphosphate carboxylase. L'activité GS peut donc être considérée comme un témoin de la maturité de la feuille. Nous avons utilisé cette activité enzymatique comme dénominateur commun des activités NR et NADH-GDH. Les rapports de l'activité NR/GS et de l'activité NADH-GDH/GS, en fonction de l'étage foliaire, évoluent en sens contraire au stade gousses (fig. 20). Ainsi, à chaque stade physiologique de la feuille peut être associé un paramètre métabolique. Un rapport NR/GS compris entre 0,02 et 0,1 caractérise les organes en croissance exponentielle, alors que dans le reste de la plante ce rapport reste de l'ordre de 0,005. Un rapport élevé NADH-GDH/GS entre 2 et 10 marque les organes sénescents, alors que les organes matures ou jeunes ont un rapport voisin de l'unité. Cette observation se confirme tout au long du cycle.

Chapitre II Effet de la nodulation et du nitrate sur la croissance et les principales activités enzymatiques du métabolisme azoté

I. Introduction

L'influence de l'azote minéral sur la fixation biologique de l'azote a fait l'objet de nombreuses études qui ont mis en évidence une relation complexe entre la plante-hôte, le Rhizobium, l'azote combiné (forme, teneur et période d'application) et les conditions du milieu (Harper et Gibson, 1983).

L'effet du nitrate se traduit par une action inhibitrice à un stade précoce en empêchant l'induction des nodosités et leur développement (Gibson et Pagan, 1977). Parmi les différentes hypothèses qui ont été formulées pour expliquer ce phénomène, on peut citer l'inhibition indirecte du nitrate sur la croissance et l'activité des nodosités par la réduction de leur approvisionnement en sucres (Latimore et *al.*, 1977), l'inhibition directe de la synthèse des lectines qui assurent l'adsorption des bactéries sur les poils absorbants (Denarie et Truchet, 1979) et l'accélération de la destruction de l'AIA, hormone qui contrôlerait la courbure des poils absorbants et l'infection des racines (Munns, 1968).

Le nitrate du sol peut provoquer plus tard une diminution de l'activité fixatrice de la nodosité (Oghoghorie et Pate, 1971). Les fortes teneurs en ammonium inhibent aussi l'activité nitrogénase, soit par une inhibition de la synthèse de la nitrogénase (Dilworth, 1966; Bethlenfalvay et *al.*, 1978), soit par une baisse de la teneur en léghémoglobines susceptible de limiter l'activité nitrogénase des nodosités (Bisseling et *al.*, 1978).

La diminution de la fixation de l'azote atmosphérique par le nitrate chez les légumineuses pourvues de nodosités efficaces est largement connue, même si elle ne semble pas générale. En effet, les faibles doses ont un effet bénéfique sur la fixation et même sur la nodulation, lorsque l'application du nitrate a lieu avant la nodulation (Mcneil, 1982 ; Ounane, 2002). Par contre, l'inhibition pourrait résulter soit d'un détournement d'ATP et du pouvoir réducteur pour la nitrate réductase (Mahart et Wong, 1979), soit de l'accumulation de nitrite dans les nodosités (Stephens et Neyra, 1983). Dans ce dernier cas, le nitrite bloquerait sous forme inactive, soit la léghémoglobine, soit la nitrogénase (Trinchant et Rigaud, 1982).

L'action bénéfique du nitrate, à faible dose, sur la symbiose s'expliquerait par un meilleur état physiologique de la plante dû à une stimulation de la photosynthèse (Jatimliansky et *al.*, 1982) particulièrement en début du cycle de développement de la plante, lorsque l'azote cotylédonaire est épuisé et la fixation inexistante ou encore faible (Larry et *al.*, 1981).

Un apport d'azote combiné (NH_4 et/ou NO_3) à concentration égale, montre que l'ion ammonium a un effet inhibiteur moins élevé que l'ion nitrate sur la nitrogénase (Kimou et *al.*, 1985). L'urée au contraire n'affecte pas la fixation de l'azote (Harper et Nicholas, 1976).

Les données disponibles révèlent qu'une très grande attention a été portée sur l'effet de l'azote combiné sur la nodulation. Réciproquement, on dispose de moins d'informations concernant l'influence de la nodulation sur l'aptitude du végétal à assimiler le nitrate. Or, au cours du cycle végétatif les deux voies de nutrition azotée jouent des rôles complémentaires (Salsac et *al.*, 1984). Les modifications de l'équilibre dans la contribution de ces deux

sources d'azote dans la plante peuvent avoir d'importantes implications sur l'efficacité du métabolisme azoté.

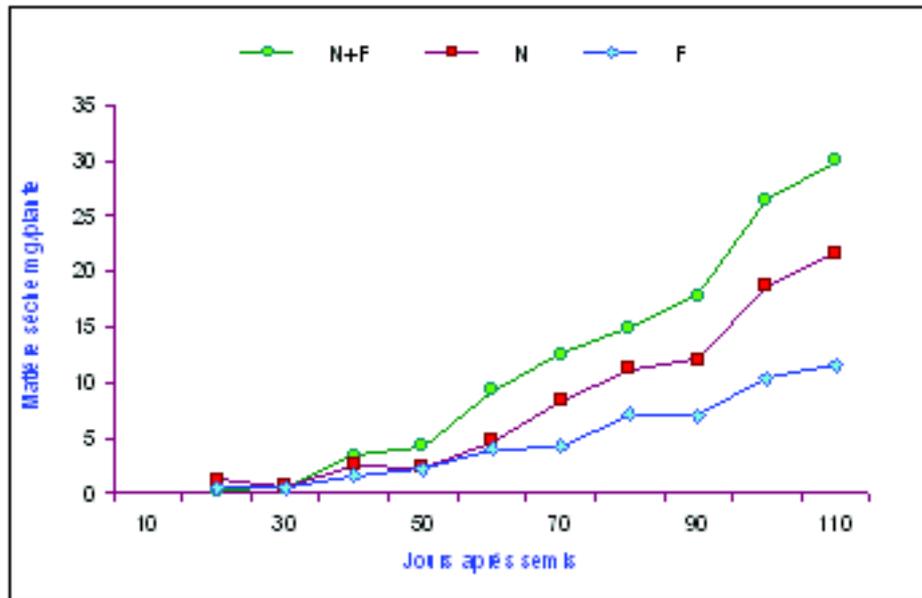


Figure 21 Evolution de la matière sèche de la partie aérienne des plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), inoculées uniquement (F), recevant de l'azote uniquement (N)

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

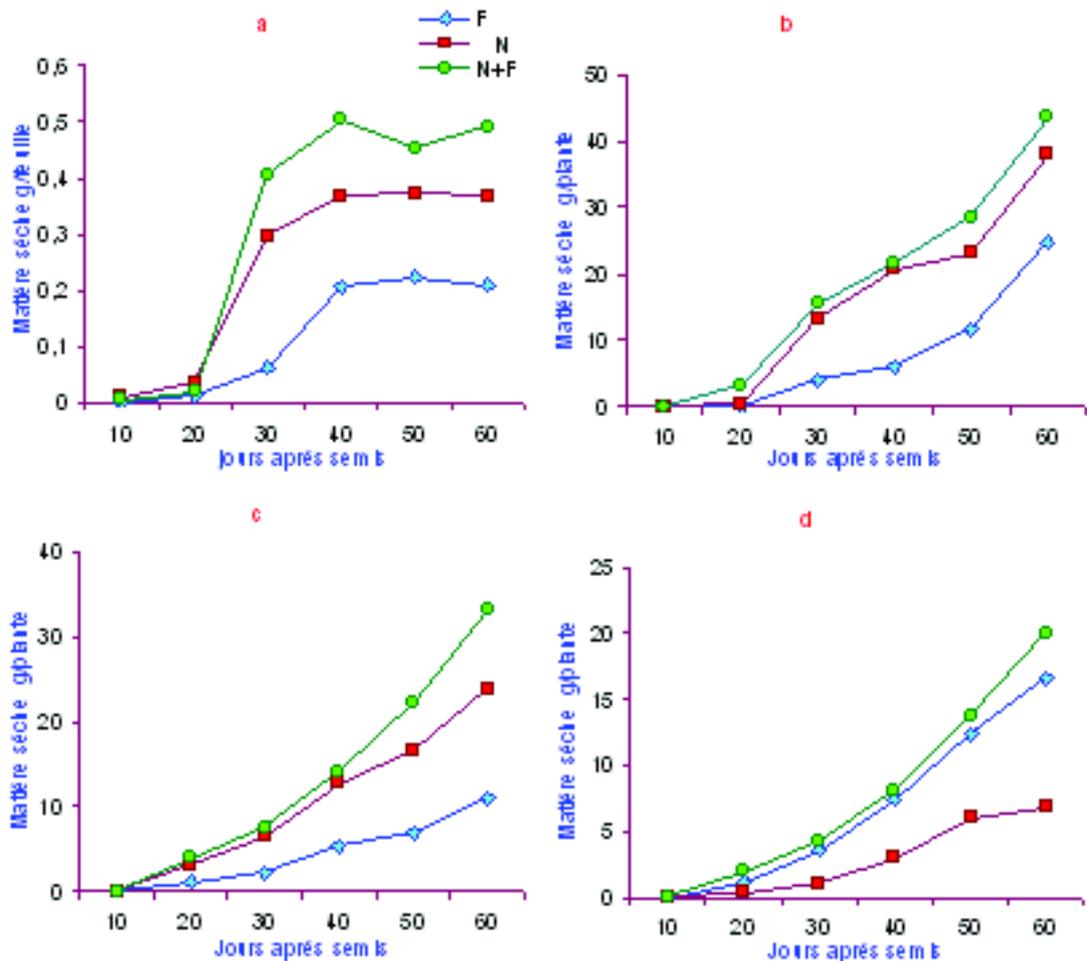


Figure 22 Evolution de la matière sèche de la la feuille (a), de l'ensemble des feuilles (b), des tiges et pétioles (c), et des racines (d) de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), inoculées uniquement (F), recevant de l'azote uniquement (N)

L'étude des interactions entre l'assimilation du nitrate et la fixation de l'azote atmosphérique paraît donc nécessaire. Pour étudier ces interactions, nous avons retenu quatre activités enzymatiques susceptibles de servir de critère de l'état de la nutrition azotée de la plante. Les activités nitrate réductase et nitrogénase indiquent l'évolution de l'aptitude du végétal à utiliser l'une ou l'autre voie et plusieurs études ont déjà été effectuées sur les aspects biochimiques et physiologiques de ces activités chez les légumineuses et spécialement chez le Soja (Harper et Hageman, 1972; Harper et al., 1972; Streeter, 1972; Thibodeau et Jaworski, 1975; Miquel et al., 1980; Conejero, 1981; Obaton et al., 1982; Kimou, 1984; Kimou et al., 1985).

Nous avons suivi aussi les activités de la glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase qui sont des marqueurs des deux voies possibles de l'incorporation de l'ammonium.

Cette dernière approche nous a paru intéressante pour voir dans quelle mesure la fixation symbiotique, source d'azote réduit pour les parties aériennes, était susceptible de contrôler les activités GS et GDH.

II. Résultats

Dès la germination jusqu'à l'apparition de la première feuille, les plantes sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive sans azote. En début de végétation elles reçoivent un complément d'azote sous forme de KNO_3 1 mM . Ce dernier est indispensable aux plantes pour démarrer leur croissance.

A l'apparition de la première feuille, trois traitements sont appliqués:

N: Les plantes non-inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive contenant 4 mM de nitrate.

N+F: Les plantes inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive contenant 4 mM de nitrate.

F: Les plantes inoculées sont arrosées quotidiennement avec une solution nutritive dépourvue d'azote.

1. Effet des nitrates et de la nodulation sur la croissance

La figure 21 montre bien un effet synergique quand la nodulation est accompagnée par un apport d'azote minéral. Nous remarquons en effet que l'accumulation de la matière sèche dans la partie aérienne (feuilles + tiges + gousses) au cours du cycle est toujours supérieure dans le traitement (N+F). Par contre, la nodulation (F) qui produit le moins de matière sèche, ne semble pas pouvoir assurer à elle seule les besoins en azote de la plante.

Durant la première phase, de la levée jusqu'au début de la floraison, qui correspond à la période de la mise en place des nodosités chez les plantes nodulées, les plantes N +F accumulent plus de matière sèche dans les feuilles et les tiges que les plantes N (fig. 22 b et c). Ces dernières accumulent à leur tour plus de matière sèche dans les feuilles et dans les tiges que les plantes qui ne reçoivent pas d'azote minéral F (fig. 22 b et c). Cette observation se retrouve aussi au niveau de la première feuille, dont le poids sec à la maturité est supérieur dans les traitements N et N+F par rapport au traitement F (fig. 22 a).

Durant la même période, la croissance en matière sèche des racines est plus importante chez les plantes nodulées N+F et F que chez les plantes qui reçoivent exclusivement de l'azote minéral N (fig. 22d).

Quand les plantes atteignent le stade gousse, l'effet de la source d'azote sur l'accumulation de la matière sèche des parties aériennes est particulièrement marqué: environ

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

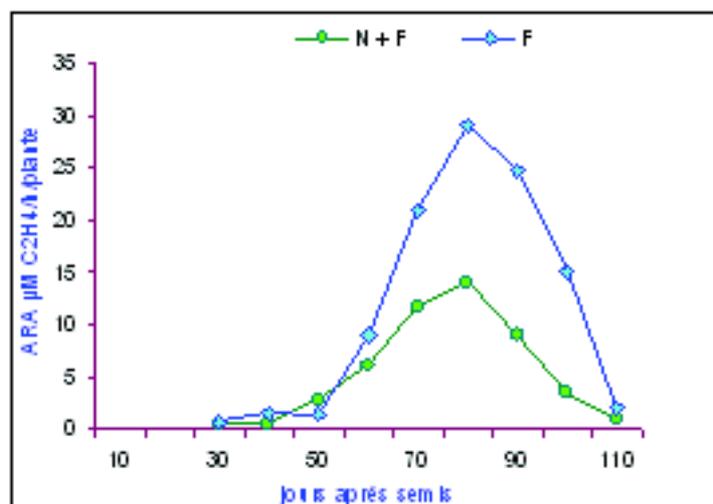


Figure 23 Evolution de l'activité nitrogénase (ARA) de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), inoculées uniquement (F

100% de plus chez les plantes N et N+F que chez les plantes F selon l'organe étudié (tab. 4). L'effet de l'azote minéral est particulièrement remarquable sur la partie aérienne et notamment sur les tiges. Les plantes cultivées exclusivement avec l'azote minéral N ont une croissance supérieure de 100% pour les feuilles plus tiges que les plantes nodulées sans azote minéral F. Par contre le poids des gousses n'est pas différent dans les deux traitements (tab.4).

Organe	Matière sèche g / plante			ppds 0.05
	Fixation (F)	Fixation+Azote (N+F)	Azote (N)	
Feuilles (F)	21,23	45,11	42,45	7.25
Tiges (T)	15,25	35,45	30,24	6.54
F + T	36,48	80,56	72,69	7.89
Gousses (G)	18,87	32,5	18,54	5.68
F + T + G	55,35	113,06	91,23	10.57
G / F+T+G	0,34	0,29	0,2	

Tableau 4 Répartition de la matière sèche dans les différents organes de la plante au stade gousse en fonction des traitements F, N+F et N

Il ressort de ces résultats que l'azote minéral participe à la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est mobilisé surtout pour la production des gousses. Des résultats analogues ont été obtenus chez le soja par Tirado (1987) qui a pu montrer que les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non nodulées, tandis que les plantes alimentées avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus

dans la production de l'appareil végétatif. Par ailleurs, Dart et *al.* (1977) ont montré que l'augmentation de la concentration du nitrate dans le milieu de culture, réduit progressivement l'élongation des racines et la formation des poils absorbants chez *Medicago*. Ce même phénomène a été observé aussi chez le maïs, l'épinard et l'oignon (Heins et Schenk, 1986). D'autres travaux ont montré l'existence d'une relation entre la répartition et la destination de l'azote fixé et assimilé chez le soja (Pazdernik et *al.* 1996, 1997; Wanek et Arndt, 2002)

2. Effet des nitrates et de la nodulation sur la fixation symbiotique de l'azote

Chez les plantes nodulées F et N+F, l'activité nitrogénase (ARA) suit la même évolution jusqu'au 60^e jour, au delà duquel se fait sentir l'effet du nitrate (fig. 23). Au stade floraison nous observons une forte diminution de l'ARA chez les plantes N+F.

L'inhibition moyenne par l'azote minéral sur l'ensemble des mesures faites entre le début de la floraison et le stade gousse est de 64%. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Kimou (1984) et Kimou et *al.* (1985) qui observent que des doses supérieures à 3 meq de nitrate inhibent la croissance des nodules et l'activité nitrogénase. Ils ne font que rejoindre les nombreuses observations sur le phénomène bien connu de l'inhibition de la nodulation et de la fixation par l'azote minéral (Denarie et Truchet, 1979; Trinchant et Rigaud, 1982; Kimou et *al.*, 1985; Serraj et Sinclair,1998 ; Wanek et Arndt, 2002).

Au delà du 90e jours, l'effet est moins évident. Il est vraisemblable que les nodules qui ne fonctionneraient pas à leur optimum à ce stade (Ounane, 1994), n'interfèrent que très peu sur le métabolisme azoté (Davies et *al.*,2000).

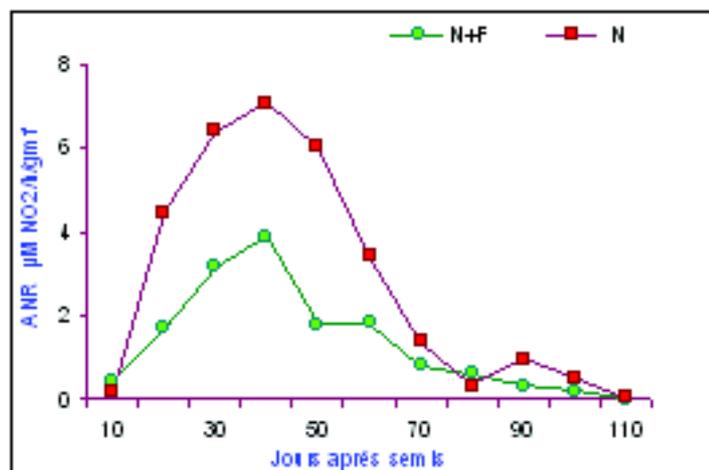


Figure 24 Evolution de l'activité nitrate réductase de feuilles de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), recevant de l'azote uniquement (N)

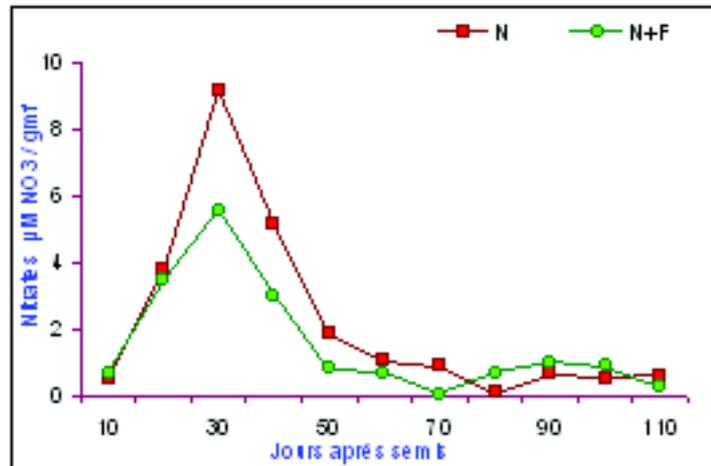


Figure 25 Evolution de la teneur des feuilles de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), recevant de l'azote uniquement (N)

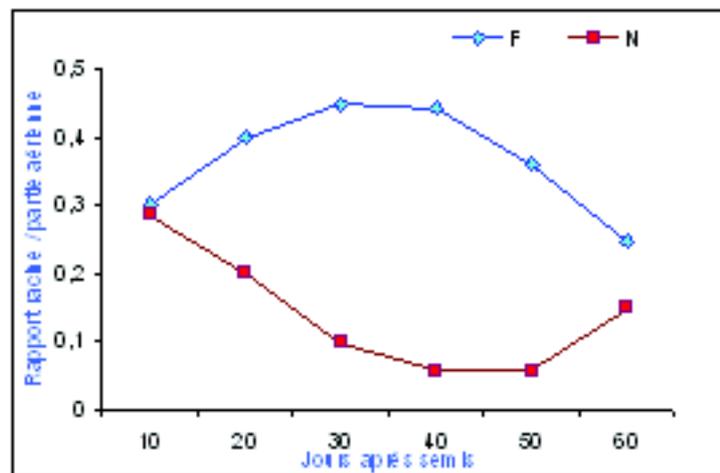


Figure 26 Evolution du rapport du poids sec des racines sur la partie aérienne de plantes inoculées uniquement (F), ou recevant de l'azote uniquement (N)

3. Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité nitrate réductase

Bien qu'évoluant de façon similaire dans les deux traitements contenant du nitrate (N et N+F), l'activité NR moyenne par gramme de matière fraîche des feuilles est nettement plus faible chez les plantes N+F que chez les plantes N (entre le tiers et la moitié), particulièrement pendant la première phase où se situe le pic d'activité (fig. 24). Cette tendance s'observe aussi sur la teneur en nitrate dans les feuilles (fig. 25).

Si, comme certains auteurs l'ont montré, le flux du nitrate vers la partie aérienne contrôle l'activité NR (Talouizte et *al.*, 1984; Soualmi-Boujemaa et *al.*, 1985) cela signifie que la nodulation affecte l'absorption et/ou le transport du nitrate, de sorte que l'activité NR (fig. 24) et la teneur en nitrate (fig. 25) sont plus faibles chez les plantes nodulées N+F que chez les plantes non nodulées N. Par contre, la croissance des racines pendant la même période est relativement plus faible chez les plantes N que chez les plantes nodulées F et N+F (fig. 26). On peut donc supposer que pendant cette période d'établissement des nodules, les photosynthétats sont détournés vers la partie racinaire ; ce qui a pour conséquence un effet positif sur la croissance en matière sèche des racines et des nodules (fig. 26). Mais ces

conditions peuvent limiter la capacité d'absorption du nitrate en modifiant la structure du système racinaire (plus trapu) et par voie de conséquence le flux du nitrate qui commande la synthèse et le fonctionnement de la nitrate réductase (Wych et Rains, 1978). Si le nitrate limite la nodulation et la fixation de l'azote, la nodulation peut donc limiter l'assimilation du nitrate.

4. Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité glutamine synthétase

L'activité glutamine synthétase est affectée positivement par l'azote minéral. Exprimée par gramme de matière fraîche, elle est largement supérieure à celle des plantes F (fig. 27a). Cette différence disparaît plus tard lorsque la feuille devient sénescente (fig. 27a). Nous observons une légère différence entre les traitements N et N+F, qui disparaît lorsque l'activité GS est exprimée par organe (fig. 27 b).

L'effet positif du nitrate sur l'activité GS déjà signalé par différents auteurs (Rhodes et al., 1976; Loyola et Sanchez, 1986), indique que cette enzyme est liée à l'assimilation du nitrate dans la feuille. De plus, la présence dans les chloroplastes de la nitrite réductase (qui catalyse la réduction du nitrite en ammonium), de la glutamine synthétase (responsable de la synthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammonium) ainsi que de la glutamate synthétase (qui catalyse la synthèse de 2 glutamates à partir de la glutamine et l' α -cétoglutarate), a fait suggérer à Lea et Miflin (1974), que l'incorporation de l'ammonium provenant de la réduction du nitrate dans la glutamine et le glutamate est réalisée dans les chloroplastes. Ces derniers, vont à leur tour fournir l'azote à la totalité des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique (Miflin et Lea, 1980).

La diminution de l'activité glutamine synthétase chez les plantes nodulées privées d'azote minéral peut être attribuée (comme pour l'activité nitrate réductase) à une diminution de l'absorption et/ou du transport du nitrate ainsi qu'à une diminution de la croissance de la partie aérienne au détriment du bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique. En effet, Jatimlinsky et al. (1982) ont montré que la teneur en chlorophylle et la photosynthèse nette sont déprimées chez les plantes nodulées sans apport de nitrate.

Le fait que les plantes nodulées recevant de l'azote minéral ont une activité GS semblable à celles des plantes non nodulées, nous indique que la nodulation n'a pas un effet dépressif direct sur l'activité GS.

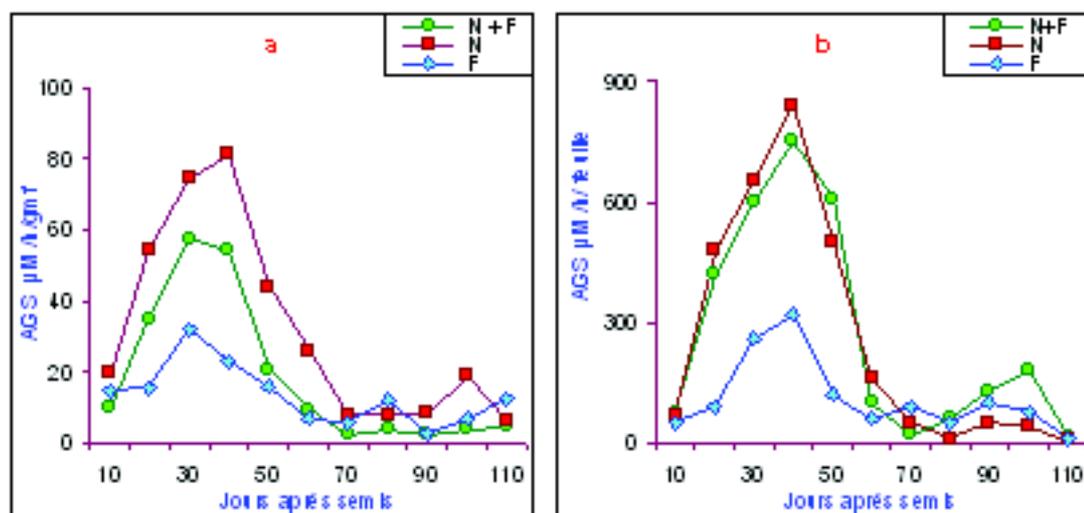


Figure 27 Evolution de l'activitéglutalinique synthétase par g de matière fraîche (a), de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N+F), inoculées uniquement (F), recevant de l'azote uniquement (N)

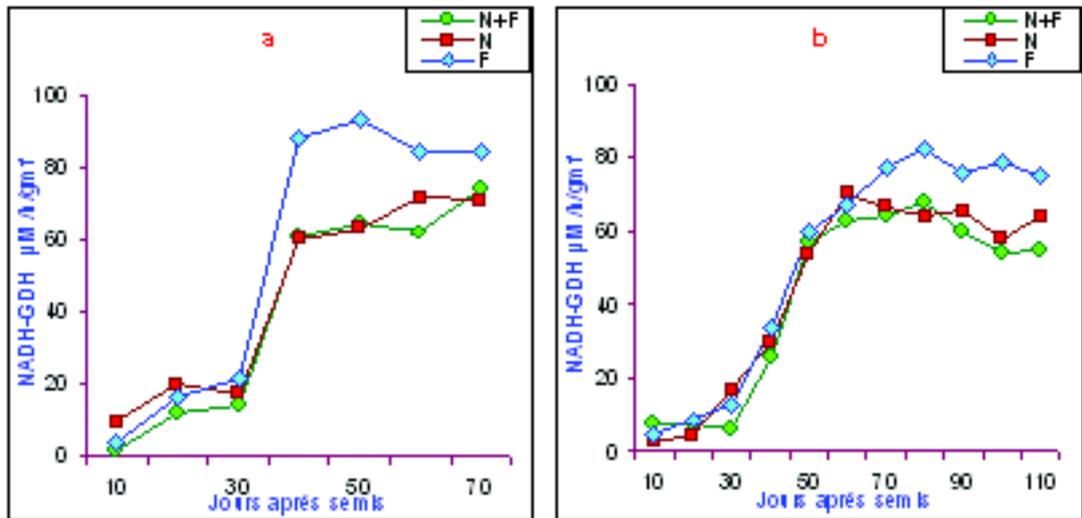


Figure 28 Evolution de l'AGDH dans une feuille (a), at dans l'ensemble des feuilles (b), de plantes inoculées et recevant de l'azote minéral (N +F), inoculées uniquement (F), recevant de l'azote uniquement (N)

5. Effet des nitrates et de la nodulation sur l'activité glutamate déshydrogénase

L'activité GDH augmente régulièrement au cours du développement de la feuille et atteint son activité maximale chez la feuille sénescente. Aux stades les plus avancés du développement de la feuille, nous obtenons une augmentation plus prononcée dans les feuilles de plantes nodulées privées d'azote minéral (F) (fig. 28a).

Cette observation est confirmée avec l'activité moyenne de l'ensemble des feuilles au cours de leur développement (fig. 28 b).

L'effet positif de la privation d'azote minéral sur l'activité GDH ne peut être associé qu'à une accélération de la sénescence, provoquée par une mauvaise nutrition azotée.

L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire. Une telle augmentation de l'activité GDH pendant la sénescence a déjà été observée chez les plantes supérieures (Lauriere et Daussant, 1983 ; Cammaerts et Jacobs, 1985).

III. Conclusion

Il ressort de ces résultats que l'azote minéral participe à la croissance et au développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est mobilisé surtout pour la production des gousses. Les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non nodulées tandis que les plantes alimentées avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus dans la production de l'appareil végétatif .

La diminution de l'activité glutamine synthétase chez les plantes nodulées privées d'azote minéral peut être attribuée (comme pour l'activité nitrate réductase) à une diminution de l'absorption et/ou du transport du nitrate ainsi qu'à une diminution de la croissance de la partie aérienne au détriment du bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

Les plantes nodulées recevant de l'azote minéral ont une activité GS semblable à celles des plantes non nodulées et de ce fait, nous pouvons penser que la nodulation n'a pas un effet dépressif direct sur l'activité GS.

L'activité GDH augmente régulièrement et atteint son activité maximale chez la feuille sénescente. L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire.

L'effet positif de la privation d'azote minéral sur l'activité GDH ne peut être associé qu'à une accélération de la sénescence, provoquée par une mauvaise nutrition azotée.

Si l'on compare les résultats des activités GS et GDH des feuilles de plantes soumises aux différents traitements, il est possible de tirer une conclusion qui confirme certaines observations physiologiques et souligne l'intérêt de ces activités enzymatiques comme marqueurs du statut azoté de la plante. L'activité glutamine synthétase est bien liée à la croissance de la feuille et à l'alimentation nitrrique, au moins partiellement.

En général, les activités nitrate réductase et nitrogénase paraissent antagonistes et leur pic maximum se succède au cours du cycle de développement de la plante. Par contre, nos résultats obtenus en serre montrent que les activités nitrate réductase et nitrogénase augmentent parallèlement à la croissance des plantes jusqu'à la fin de la floraison puis chutent au moment du remplissage des gousses. Des résultats semblables ont été obtenus sur le soja par Kimou (1984), en assurant un apport régulier de nitrate au cours du cycle de développement.

La disparité de ces observations doit être attribuée à la complexité des facteurs qui régulent ces deux enzymes et qui fluctuent au cours de la vie de l'association symbiotique. La présence simultanée de ces deux activités suggère que dans certaines conditions lorsque l'énergie disponible est suffisante et l'apport de nitrate continu, les activités nitrate réductase et nitrogénase ne seraient pas antagonistes.

Le processus d'assimilation du nitrate dans les molécules organiques est exigeant en énergie, pouvoir réducteur et substrats carbonés. Il concurrence le fonctionnement des nodosités pour la fourniture en photosynthétats. L'inhibition de la fixation d'azote observée dès que l'alimentation nitrrique est importante peut s'expliquer par un détournement des photosynthétats utilisés pour la réduction et l'assimilation du nitrate au détriment de l'approvisionnement nodulaire.

Sur un plan agronomique, les résultats que nous avons obtenus en serre montrent que les deux voies d'assimilation de l'azote sont nécessaires pour obtenir un développement maximum en terme de matière sèche, d'azote total accumulé ou de production de graines. L'azote minéral a pour effet de stimuler la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est surtout destiné à la production de gousses. Les plantes nodulées investissent proportionnellement davantage dans la production des gousses que les plantes non nodulées et les plantes nourries avec de l'azote minéral investissent proportionnellement plus dans la production de l'appareil végétatif. Le nitrate réduit la croissance des racines, la nodulation et la fixation. De même la nodulation peut limiter l'assimilation du nitrate par la feuille.

Chapitre III Effet du stress hydrique sur la nodulation, la fixation et l'assimilation de l'azote

I. Introduction

Le développement de la culture du pois chiche reste largement tributaire des disponibilités en eau dans les régions à vocation céréalière où elle remplacerait avantageusement la jachère dans une rotation avec le blé. Il n'en demeure pas moins que c'est une espèce peu exigeante en eau, sauf pendant le stade floraison, où elle exprime le maximum de ses potentialités. En semis de printemps, ce stade coïncide généralement avec la saison où les risques de sécheresse sont fréquents dans ces régions. De ce fait, les rendements sont généralement faibles, et les charges qui se greffent à cette culture limitent considérablement son extension (Ministère de l'agriculture, 1996).

L'augmentation des rendements passerait obligatoirement par l'utilisation de variétés adaptées aux contraintes hydriques. Les recherches entreprises en Algérie, dans ce domaine, ont été orientées essentiellement vers le comportement de variétés introduites possédant le caractère de tolérance à la sécheresse. Il serait intéressant d'étudier les paramètres et/ou les mécanismes physiologiques liés à ce caractère, pouvant servir de base à des critères de sélection de cette espèce, très appréciée pour sa capacité de fixer l'azote atmosphérique et pour la richesse de ses graines en protéines.

Le stress hydrique se traduit généralement par une réduction de la croissance, des échanges gazeux et du métabolisme général de la plante.

Durant les années 70 et 80 on invoquait pour expliquer les réponses de la plante au stress hydrique, des mécanismes simples se rapportant au métabolisme du carbone et à la perméabilité à l'oxygène du nodule. Mais depuis, un autre mécanisme est avancé et concerne le feedback entre la feuille et le nodule des produits azotés. Le facteur commun qui lie ces trois mécanismes est leur sensibilité au flux du phloème. Le stress hydrique diminue le flux du phloème de la plante particulièrement, celui destiné au nodule. Cette diminution provoquerait une réduction de l'activité du nodule à la suite de la dérégulation de plusieurs mécanismes:

- Une baisse de l'approvisionnement en photosynthétats bien quelle ne soit pas une limitation majeure de l'activité du nodule.

- Une modification de la forme des cellules corticales et des espaces intercellulaires qui diminue leur perméabilité à l'oxygène (Po).

- Une diminution des exportations des produits de la fixation vers les feuilles déclenche leur accumulation et la réduction de l'activité des nodules

La réponse au déficit hydrique peut se manifester par chacun de ces trois mécanismes de contrôle.

Mais une distinction claire a été établie entre les deux formes possibles d'exportation de l'azote fixé chez les légumineuses. Les espèces tropicales qui exportent les produits de la fixation sous forme d'uréides auraient une activité nodulaire plus sensible à la sécheresse que les espèces utilisant la forme amide. Le cowpea, à l'exception des autres espèces à uréides serait plus tolérant à la sécheresse. Dans ce cas, il est possible que le facteur limitant majeur pour la croissance de la plante pourrait être l'azote (Purcell et al. 2004).

Actuellement, il existe une importante base de données sur la variabilité génétique des légumineuses qui pourrait servir à améliorer la tolérance de la fixation N_2 à la sécheresse des cultivars commerciaux.

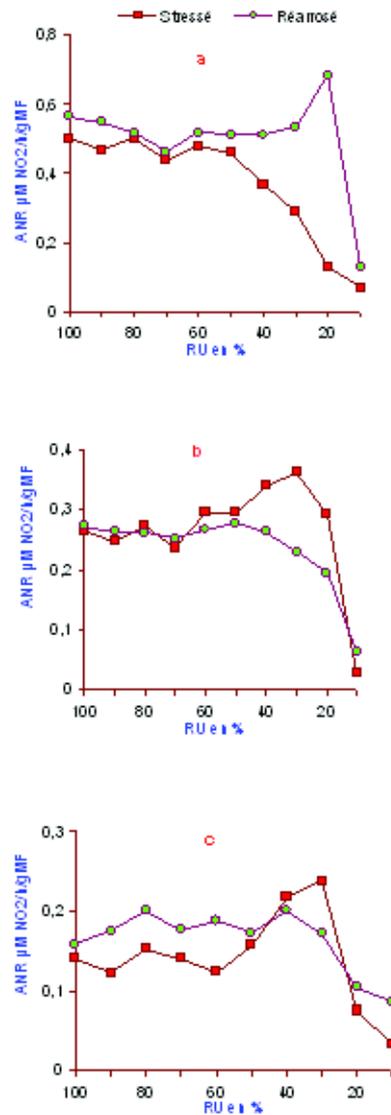


Figure 29 Effet du stress hydrique et de la réalimentation en eau sur l'activité nitrate réductase au stade végétatif (a), floraison (b), gousse (c)

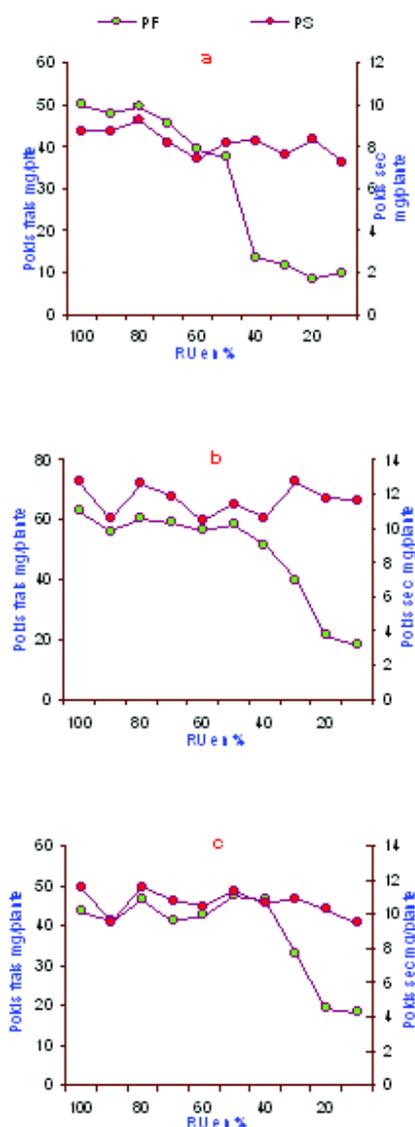


Figure 30 Effet du stress hydrique sur le poids frais et le poids sec des nodules au stade végétatif (a), floraison (b), gousse (c)

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'influence du stress hydrique croissant, appliqué à trois stades phénologiques, sur la nodulation, la fixation et l'assimilation de l'azote. Nous avons aussi étudié la réaction de ces deux activités après la levée de la contrainte hydrique.

II. Résultats

1. Effet du stress hydrique sur l'activité nitrate réductase (A.N.R.)

La figure 29 montre bien un effet dépressif du stress hydrique sur l'activité de la nitrate réductase. Cet effet ne s'observe pas de la même façon en fonction de l'intensité de la contrainte et du stade de développement de la plante. En effet, nous remarquons au stade végétatif (fig. 1a) une diminution de l'A.N.R. mais uniquement à partir de 40% de la R.U.

Cette chute s'observe aussi aux deux autres stades (fig. 29b et c) mais à des stress plus sévères (20% R.U.).

Nous remarquons par ailleurs, aux stades floraison et gousse une augmentation de l'A.N.R. entre 60% et 30% de la RU suivie par une diminution assez brutale de cette activité mais sans jamais s'annuler complètement.

Hsiao (1973) a pu montrer depuis longtemps que le déficit hydrique provoque une diminution du potentiel hydrique du végétal et des troubles métaboliques au niveau cellulaire . D'autres auteurs ont pu observer une forte diminution de l'A.N.R. sous l'effet d'un stress hydrique sévère chez le trèfle (Wery et al, 1986) et chez le dactyle (Triboï-Blondel ,1978).

La levée de la contrainte (réarrosage) se traduit dans le premier stade par une reprise de l'A.N.R. jusqu'à atteindre le niveau du témoins et même le dépasser quand les plantes ont subi un stress sévère (fig. 29a) . Ce dépassement a été expliqué par Smirnoff et al (1984) sur la base d'une accumulation importante de nitrates au niveau de la vacuole pendant le stress, formant ainsi un grand pool rapidement disponible pour l'enzyme au moment de la levée de la contrainte. Le rétablissement de l'arrosage provoquerait un flux d'eau fortement chargée en ions, notamment des nitrates nécessaires à la synthèse et à l'activité de la nitrate-réductase.

Au stade floraison le réarrosage provoque paradoxalement une réduction de l'A.N.R. entre 40% et 20% de la RU. Pour les stress sévères nous observons une faible reprise, qui pourrait signifier une détérioration plus ou moins importante des structures enzymatiques, sous l'effet de la contrainte hydrique (fig. 29b et c)

2. Effet du stress hydrique sur le poids frais et le poids sec des nodules

La figure 30 montre bien une diminution du poids frais des nodules, aux trois stades phénologiques, tandis que le poids sec reste sensiblement constant ou diminue peu en fonction du taux de tarissement du sol. Nous observons au stade végétatif (fig. 30 a) une diminution régulière jusqu'à 40% de la RU ; au-delà, le poids frais reste constant. Au stade floraison (fig. 30b) et gousse (fig. 30c) le poids frais semble peu affecté jusqu'à 40% de la RU ; au delà, nous constatons une chute brutale (40% du témoin). L'analyse de ces résultats nous permet de remarquer une perte en eau des nodules plus importante au stade végétatif. A ce stade nous avons observé la présence d'une grande proportion de petits nodules, qui seraient plus sensibles au dessèchement. Les mêmes observations ont été faites par Sprent (1981) qui a remarqué chez le soja, que les nodules de petite taille, perdent rapidement leur réserve d'eau, alors que les gros nodules possèdent un parenchyme cortical plus épais qui empêche ou réduit leur déshydratation sous contrainte hydrique.

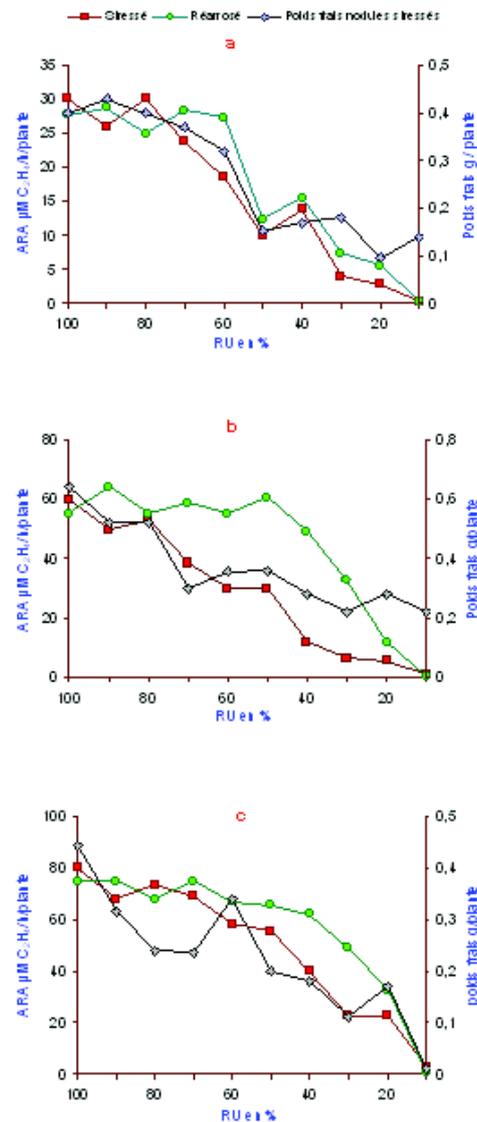


Figure 31 Effet du stress hydrique et de la réalimentation en eau sur l'ARA et le poids frais des nodules au stade végétatif (a), floraison (b), gousse (c)

Les faibles variations du poids sec des nodules peuvent être expliquées par une durée trop brève du stress pour provoquer des modifications importantes dans la production de la matière sèche. Raissac (1992) montre bien qu'une contrainte hydrique brève provoque un arrêt de la croissance, qui redémarre quand le stress est levé. En effet, le comptage des nodules que nous avons réalisé sur des plants non stressés (témoins), nous a permis de constater que pour un même poids frais, le nombre de nodules du stade végétatif est trois fois supérieur à celui du stade gousse.

3. Effet du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote

Nous constatons généralement une baisse de l'ARA des plantes soumises à une contrainte hydrique. L'évolution de cette baisse varie cependant, en fonction de l'intensité du stress et du cycle végétatif de la plante (fig. 31). La figure 31a montre en effet, une diminution brutale de l'ARA dès l'application des premiers niveaux de stress au stade végétatif. A 50% de la RU, l'ARA chute de 75% et continue à décroître jusqu'à devenir nulle. Aux stades floraison

et gousse l'activité nitrogénase diminue sur un premier palier entre 0 et 50% de la RU puis un deuxième palier entre 50 et 10 % de la RU. A 10% de la RU , le stress considéré très sévère, provoque l'inhibition complète de l'ARA.

La figure 31, montre également une évolution de l'ARA comparable à celle du poids frais des nodosités. Cette relation a été déjà mise en évidence chez le soja par Johnson et Hume (1973), Finn et Brun (1980) et Sprent (1981). D'autres auteurs ont trouvé aussi, une corrélation entre le contenu en eau des nodules, leur taille et l'ARA. Ils ont pu montrer que les gros nodules possèdent une proportion de matière sèche très faible par rapport à celle de l'eau, traduisant ainsi une présence plus importante en léghémoglobine et l'existence d'espaces intracellulaires plus grands, favorables à la circulation des gaz (Denison et al, 1985 ; Durand et al, 1987).

La sensibilité du pois chiche, soumis au stress hydrique, pendant la phase végétative peut alors être expliquée par la présence d'une proportion plus importante de nodules de petite taille qui se dessècheraient plus rapidement. La perte en eau provoque leur rétrécissement et une diminution de la porosité de leur épiderme dont la conséquence est une mauvaise circulation de l'oxygène nécessaire aux bactéroïdes (Durand et al, 1987).

Aux deux autres stades nous avons pu observer la présence de nodules de taille plus grande, qui auraient permis une meilleure protection contre le dessèchement. Leur parenchyme cortical plus épais, réduit dans une certaine mesure la perte de leur contenu en eau, leur permettant ainsi de conserver une bonne activité fixatrice lors d'un déficit hydrique faible ou modéré (Sall, 1987).

D'autres auteurs ont mis en évidence chez des génotypes de soja, une relation directe entre la fixation de l'azote et la taille ou le volume de leurs nodules (Paul et Planchon , 1990 ; Burias et al.,1990)

4. Effet de la réalimentation en eau sur la fixation de l'azote après un stress

Le pois chiche réalimenté en eau à la RU après avoir subi un stress hydrique, développe une ARA qui varie en fonction de l'intensité du stress et du cycle végétatif de la plante (fig. 31). Pendant le premier stade, la réalimentation permet une reprise de l'ARA pouvant atteindre, le niveau du témoin pour les stress modérés (90 à 40% de la RU), mais reste faible quand les stress sont sévères (20 à 10% de la RU) (fig. 31a). Aux stades floraison et formation de gousses la reprise de l'ARA rejoint aussi le niveau du témoin, jusqu'à 40% de la RU (fig. 31b, c). Au delà, les contraintes sévères permettent une reprise moins importante qui finit par s'annuler à 10% de la RU.

Ces résultats suggèrent une bonne conservation des structures cellulaires des nodules soumis à un déficit hydrique modéré qui leur permet de reprendre facilement une activité fixatrice après

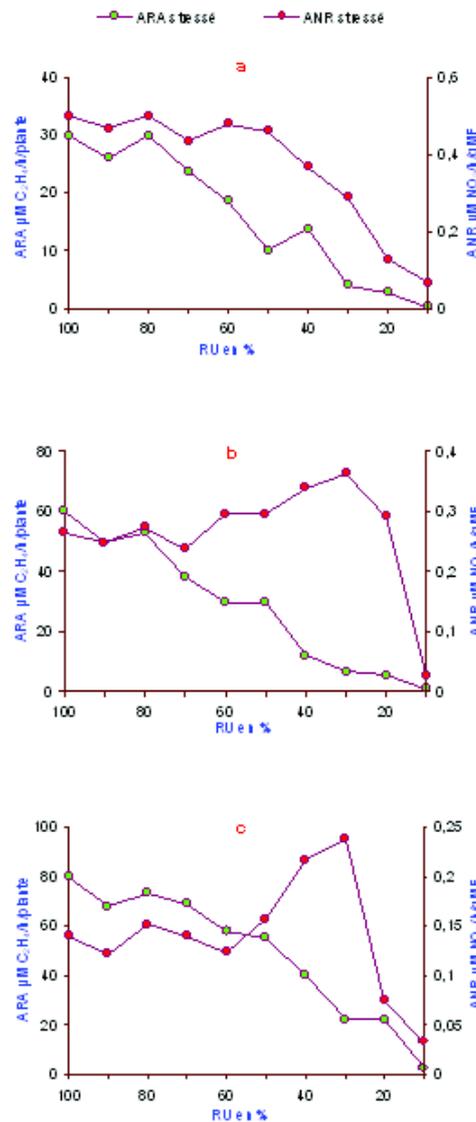


Figure 32 Comparaison de l'ARA et de l'ANR en fonction du stress hydrique

un réarrosage. Par contre, les stress sévères semblent entraîner une destruction partielle de la nitrogénase, plus importante au stade végétatif. La grande sensibilité à ce stade pourrait être expliquée aussi par la présence de petits nodules. En effet, Sprent (1972) et Sall (1987) ont pu montrer que les nodules de petite taille perdent rapidement leur réserve d'eau, provoquant ainsi une destruction du tissu central où sont localisés les bactéroïdes. De plus, Sprent (1971) a obtenu une inhibition irréversible de l'ARA lorsque les nodules subissaient une perte en eau supérieure à 20% du poids frais.

5. Evolution comparée de l'ANR et de l'ARA sous une contrainte hydrique

La figure 32 montre l'évolution des deux activités enzymatiques, chez des plantes soumises aux mêmes contraintes hydriques. Nous remarquons d'abord que le stress affecte plus l'A.R.A. que l'A.N.R. Cette tendance est plus marquée au stade végétatif où nous pouvons observer une chute de l'A.R.A. dès l'application des premiers niveaux de stress (fig 32 a).

La sensibilité de la fixation au déficit hydrique a été montrée par plusieurs auteurs, notamment chez le soja (Obaton *et al.*, 1982), chez le trèfle (Robin *et al.*, 1989), chez le pois chiche (Wery *et al.*, 1988). Ces chercheurs expliquent cette sensibilité par le fait que les nodules, ne possèdent aucun mécanisme leur permettant de s'adapter aux contraintes hydriques. De plus, leur localisation dans le profil de surface du sol les expose en premier, aux effets de la sécheresse. Par contre les deux autres stades, présentent une évolution différente où nous observons une compensation entre les deux activités (fig. 32b, c). En effet, l'activité de la nitratre réductase augmente fortement quand l'A.R.A. diminue, tout au moins pendant les stress modérés (entre 60% et 30% de la RU). Ce comportement suggère une réponse du pois chiche aux contraintes hydriques par une alimentation à dominance nitrrique capable de compenser le déficit provoqué par la baisse de la fixation. Les stress sévères provoquent généralement une forte diminution des deux activités qui s'annulent pratiquement à 10% de la RU.

III. Discussion

La contrainte hydrique peut affaiblir des fonctions vitales ou stimuler les réactions adaptatives qui permettent aux plantes de subsister pendant les déficits hydriques prolongés (Pimentel *et al.* 1990).

Nous avons pu montrer que le stress hydrique provoque une diminution des deux activités enzymatiques et du poids des nodules. La réduction de l'activité nitrogenase dans les plantes stressées a déjà été rapportée chez plusieurs légumineuses (Huang *et al.* 1975; Finn et Brun 1980; Guerin *et al.* 1990). Pour la fixation, la diminution est plus importante au stade végétatif qui semble représenter une phase très sensible du cycle de la plante. Cette sensibilité se manifeste d'abord par une perte rapide de la réserve en eau des nodules et une baisse concomitante de la fixation.

La relation entre l'état hydrique des nodules et la fixation a été démontrée à plusieurs reprises, sans pour autant constituer la principale cause de la baisse de l'A.R.A. (Stamford *et al.* 1990; González *et al.* 1995; Serraj et Sinclair, 1998) En effet, d'autres relations ont été mises en évidence notamment entre la photosynthèse et la fixation (Vignes *et al.*, 1986).

Purcell *et al.*, (1997) ont comparé les modèles de nodulation chez deux cultivars de soja, et montré des réponses contradictoires dans le nombre et la masse des nodules. Ils ont conclu que l'augmentation de la masse était le fait d'une plus grande allocation de photosynthétats aux nodules, en réponse au stress hydrique.

L'application d'une contrainte progressive nous a permis de constater que le stress modéré affectait moins l'A.R.A. pendant la floraison et la formation des gousses. Nous avons pu expliquer ce fait par la présence en plus grand nombre, de gros nodules capables de développer une meilleure résistance à la déshydratation et de conserver une bonne activité nitrogenase. Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces notamment chez le soja (Patterson et Hudak, 1996) et peut permettre une nouvelle approche pour étudier les mécanismes d'adaptation à la sécheresse.

L'assimilation des nitrates est moins déprimée par le stress hydrique, tout au moins pour les contraintes faibles ou modérés. Par contre les contraintes sévères provoquent d'abord une légère augmentation de l'A.N.R. suivie par une chute brutale.

La levée de la contrainte se traduit par une reprise de l'activité nitrogenase et nitratre réductase quand le stress est faible ou modéré alors que le stress sévère provoque une inhibition irréversible de ces deux activités.

La comparaison des deux activités sous une contrainte hydrique laisse entrevoir une sensibilité plus grande de la fixation par rapport à l'assimilation et une compensation qui s'établit pour assurer une alimentation régulière en azote de la plante. La plante réajuste sa nutrition par une augmentation de l'A.N.R. au moment où la fixation diminue sous l'effet du stress hydrique. Encore faut-il que dans ce cas, la plante puisse disposer de suffisamment de nitrate dans le sol pour équilibrer sa nutrition azotée. Mais dans tous les cas, la plante finit par se dessécher si la contrainte se prolonge au delà d'une certaine limite.

Chapitre IV Réponse de différentes souches de *Rhizobium* nodulant le pois chiche sous contrainte hydrique

I. Introduction

La biodiversité nous permet de puiser dans un grand patrimoine représentatif de plusieurs étages bioclimatiques en Algérie. Bien que la majorité des zones de culture sont caractérisées par un déficit hydrique fréquent qui ne permet pas toujours une bonne installation de la végétation (notamment de l'association légumineuse-Rhizobium), il est toujours possible de trouver des espèces ou des écotypes à même de tolérer cette contrainte. La recherche de couples (plante-bactérie) tolérants, capables de fonctionner dans ces conditions peut nous aider à mieux comprendre les paramètres et les mécanismes physiologiques liés à ce caractère et pouvant servir de base à des critères de sélection de cette association.

Kirda et al. (1989) ont montré que la fixation était le paramètre le plus sensible au déficit hydrique chez le soja, bien que la croissance du nodule fût aussi fortement affectée. Par contre Sinclair et al. (1988) ont trouvé que le nombre et le poids sec des nodules ont diminué seulement après une sécheresse sévère. D'autres travaux, ont montré l'existence d'une variabilité génétique parmi les cultivars de soja pour le nombre et le poids sec des nodules en irrigué (Pazdernik et al. 1996, 1997; Sinclair et al., 1991). En conditions sèches, Purcell et al., (1997) ont comparé les modèles de nodulation chez deux cultivars de soja, et montré des réponses contradictoires dans le nombre et la masse des nodules. Ils ont conclu que l'augmentation de la masse était le fait d'une plus grande allocation de photosynthétats aux nodules, en réponse au stress hydrique. Figueiredo et al.(1998) dans un essai similaire sur le dolique, ont pu montrer la supériorité de l'efficacité d'une souche en condition sèche et ont relié ce caractère au contenu en léghémoglobine des nodules, au potentiel hydrique foliaire et au poids de matière sèche des racines.

Serraj et al. (1998) ont constaté une baisse très importante du nombre de nodules de grande taille et une augmentation des nodules de petite taille chez des plantes de soja soumises à une contrainte hydrique modérée. Du fait de leur nombre réduit, les grands nodules bénéficient d'un approvisionnement plus important en eau et photosynthétats. Ces derniers fournissent les ATP et les squelettes carbonés nécessaires à la fixation N₂ alors que l'eau est indispensable pour exporter vers les feuilles, les produits de la fixation à travers le xylème.

Les grands nodules consacrent une plus grande proportion de leur volume à la fixation de l'azote, comparée aux petits nodules (Purcell et al. 2000). Cette hypothèse conforte d'autres résultats qui montrent une plus grande accumulation de biomasse et allocation de photosynthétats aux nodules pendant un déficit hydrique chez un génotype tolérant à la sécheresse (Purcell et al. 1997). De même, Serraj et al. (1998) ont rapporté qu'une exposition au CO₂ entraîne une augmentation de la masse du nodule et prolonge la fixation sous stress hydrique.

L'objectif de ce travail est de rechercher la variabilité dans le comportement des souches étudiées en réponse à différents niveaux de stress hydrique appliqués aux trois stades phénologiques critiques du pois chiche.

Notre approche est d'examiner l'effet du stress hydrique sur le potentiel hydrique foliaire, l'ARA, le poids sec et la teneur en eau des nodules ainsi que sur la production de matière sèche des feuilles, des tiges et des gousses qui contribuent à la formation du rendement.

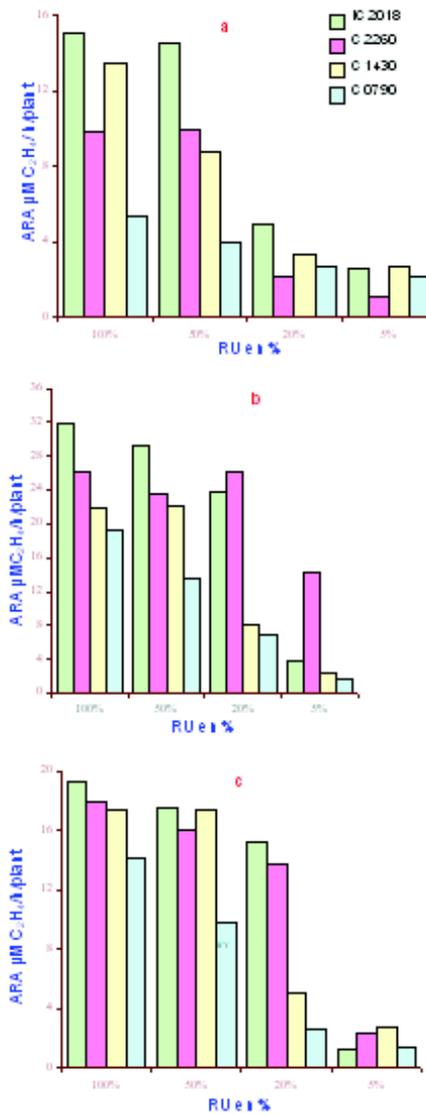


Figure 33 Relation entre le stress hydrique et l'ARA (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

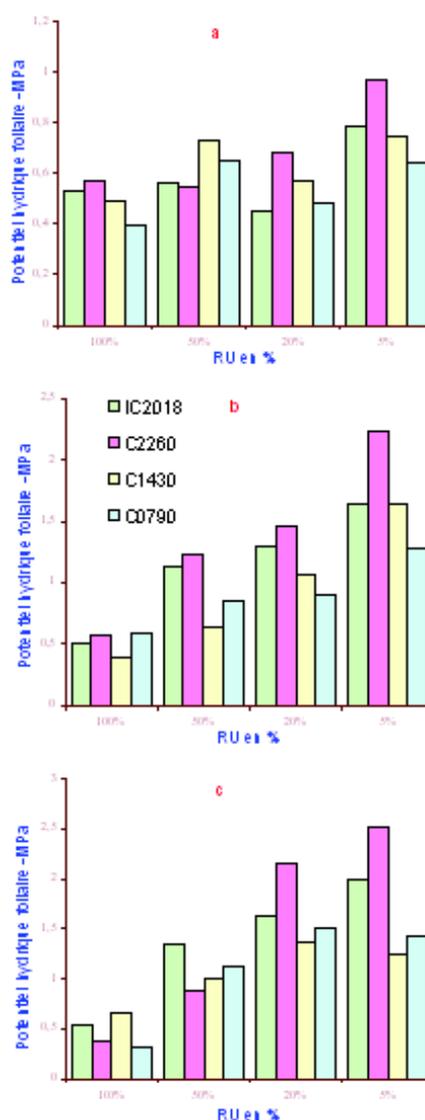


Figure 34 Relation entre le stress hydrique et le potentiel hydrique foliaire (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

II. Résultats et discussion

Dans cet essai nous avons utilisé une souche de référence IC2018 et trois isolats autochtones (C2260, C1430, C0790). Les plantes sont soumises à trois niveaux de stress hydrique correspondant à 50%, 20% et 5% de la RU.

1. Effet du stress hydrique sur les réponses physiologiques

L'effet du stress hydrique se manifeste différemment en fonction de son intensité, de la souche de *Rhizobium* et du stade phénologique de la plante (fig. 33, 34, 35, 36). Il se

traduit généralement par une baisse du potentiel hydrique foliaire de l'ARA, mais aussi de la teneur en eau et du poids sec des nodules.

Au stade végétatif, (fig. 33a) ces effets se font sentir nettement à partir de 20% de la RU. Toutes les souches que nous avons testées se comportent de la même manière avec une baisse du potentiel hydrique foliaire (fig. 34a) qui s'accompagne d'une diminution de l'ARA (fig. 33a) du contenu en eau des nodules (fig. 35a) et du poids sec des nodules (fig. 36a). Ce stade ne semble pas permettre une différenciation nette du comportement des souches, quelque soit l'intensité de la contrainte hydrique. Nous observons, par ailleurs dans la figure 36 a, une forte diminution du poids sec des nodules à 50% de la RU alors que l'ARA ne subit que très peu de modification pour le même niveau de stress (fig. 33a).

Au stade floraison, les grandeurs des paramètres mesurés sont plus importantes et bien différenciées. Le stress hydrique provoque une baisse très nette du potentiel hydrique foliaire (fig. 34b) qui s'accompagne d'une diminution de l'ARA avec une activité très réduite pendant le stress sévère (fig. 33b). Les différentes souches suivent la même tendance sauf la C2260 qui se distingue en maintenant une bonne activité fixatrice pendant le stress modéré. Elle se remarque aussi pendant le stress sévère (5%RU) en permettant la meilleure activité fixatrice (fig. 33b) et en maintenant une teneur en eau (fig. 35b) ainsi qu'un poids sec des nodules (fig. 36b) supérieurs aux autres souches. Cette souche se comporte moins bien en conditions favorables (100% de la RU) par rapport à la souche de référence (IC2018) mais tolère mieux les contraintes hydriques en maintenant une meilleure activité fixatrice pendant le stress sévère. C'est un caractère très intéressant à exploiter dans la sélection de souches capables d'établir une association efficiente avec le pois chiche cultivé sous contrainte hydrique. Mais pour se faire, il faut aussi choisir la plante hôte capable de former cette association (Sinclair et *al.*, 2003).

Au stade gousse, nous observons une chute brutale du potentiel hydrique foliaire (fig. 34c); là aussi, nous constatons une baisse plus importante pour la souche C2260 mais qui se traduit par une forte diminution de l'ARA (fig. 33c). Il ne semble pas y avoir de différence entre les souches étudiées en ce qui concerne leur capacité à fixer l'azote pendant ce stade. Lecoer et *al.* (1992) ont observé aussi une chute brutale du potentiel hydrique foliaire jusqu'à -2 MPa lorsque les plantes sont soumises à une contrainte hydrique sévère pendant ce stade.

Dans la figure 37, nous avons établi des corrélations qui nous permettent de constater que la fixation symbiotique de l'azote apparaît étroitement corrélée avec la teneur en eau (fig. 37a) et la teneur relative en eau des nodules (fig. 37b). Par contre la relation entre l'ARA et le potentiel hydrique nodulaire est moins nette en particulier, pour les valeurs faibles de ce potentiel (fig. 37b). Ainsi à partir des valeurs du potentiel hydrique nodulaire de -1.4 MPa, la fixation de l'azote apparaît moins dépendante de ce potentiel, alors qu'elle reste étroitement

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

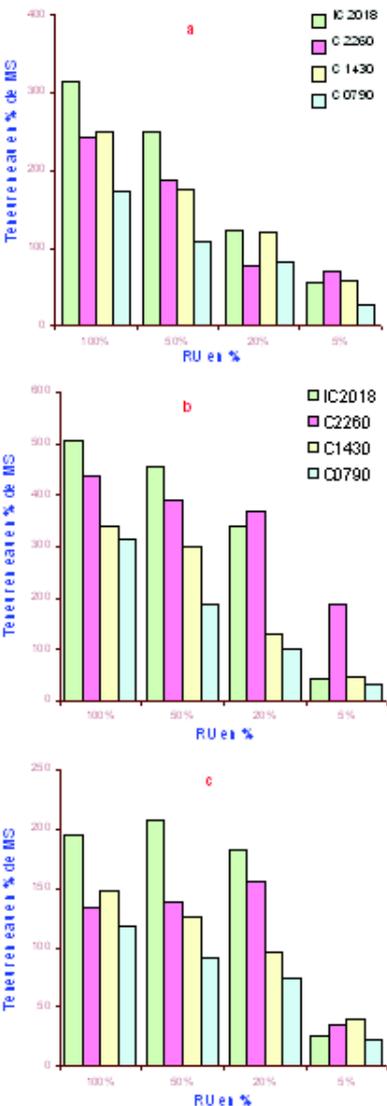


Figure 35 Relation entre le stress hydrique et la teneur en eau des nodules (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

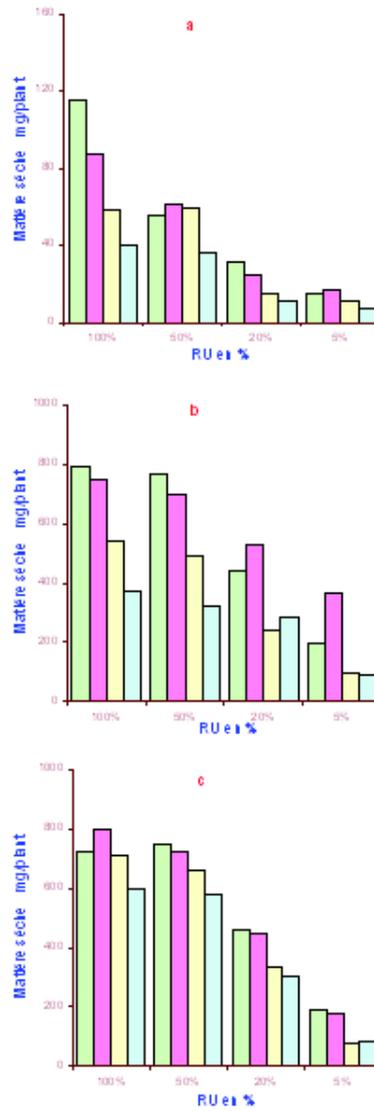


Figure 36 Relation entre le stress hydrique et la matière sèche (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

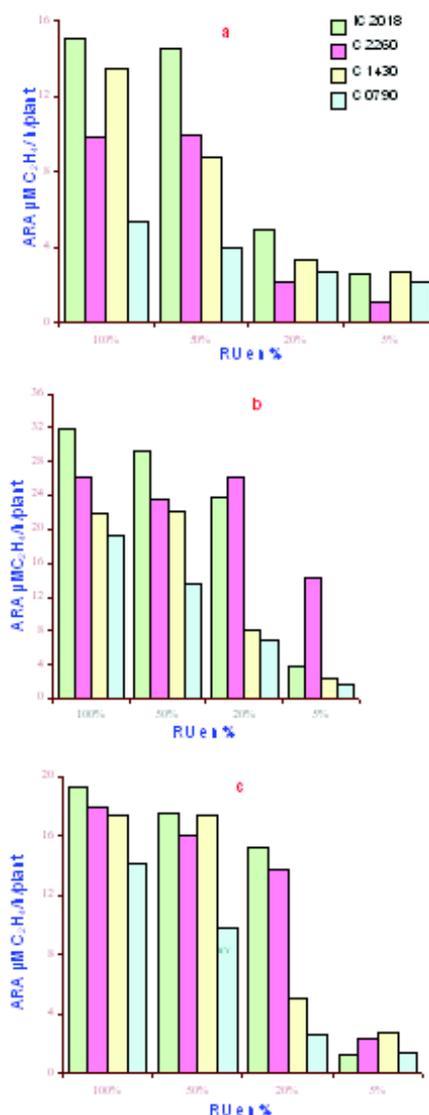


Figure 37 Relation entre l'ARA et la teneur en eau (a), la teneur en eau relative (b) et le potentiel hydrique des nodules (c)

liée au contenu en eau des nodules. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bennet *et al.* (1986) quant aux relations entre la fixation de l'azote et le potentiel hydrique nodulaire ainsi que d'autres auteurs qui ont trouvé une corrélation entre la teneur en eau des nodules, leur taille et l'ARA (Venkateswarlu *et al.*, 1989 ; Serraj et Sinclair, 1997). En effet la diffusion de l'oxygène dans les nodules est un facteur important dans la régulation de la fixation de l'azote (Weisz *et al.*, 1985) qui pourrait être plus directement liée à la teneur en eau qu'au potentiel hydrique des nodules. La perte du contenu en eau des nodules entraîne leur rétrécissement et une diminution de la porosité de leur épiderme qui provoquerait une augmentation de la résistance à la diffusion de l'eau et de l'oxygène nécessaire aux bactéroïdes (Durand *et al.*, 1987 ; Serraj et Sinclair, 1998).

2. Effet du stress hydrique sur la production de biomasse

La production de matière sèche est aussi affectée par les contraintes hydriques en fonction des différentes souches (Saxena et *al.*, 1993) et du stade phénologique de la plante (Roy et *al.*, 1995)

Quand la contrainte hydrique est appliquée au stade végétatif, elle se traduit par une baisse de la matière sèche des feuilles et tiges (Fig. 38a) alors que celle des gousses (Fig. 39a) est très peu modifiée quelque soit la souche utilisée. Nous remarquons le même comportement des quatre souches qui semblent réagir de la même façon quand le stress hydrique se produit au stade végétatif. Il est vraisemblable que les nodules qui ne fonctionneraient pas à leur optimum à ce stade (Ounane, 1994), n'interfèrent que très peu sur les composantes finales du rendement (Davies et *al.*, 2000).

Quand la contrainte hydrique est appliquée au stade floraison, nous observons une réduction de la matière sèche des feuilles et tiges bien que la souche C2260 se distingue par une meilleure production pendant le stress sévère (fig. 38b). Nous remarquons aussi une baisse de la matière sèche des gousses mais dans ce cas la souche C2260 se distingue franchement pour tous les niveaux de stress en permettant les meilleures productions (fig. 39b). Singh (1993) considère ce stade comme étant le plus sensible à un déficit hydrique parcequ'il influe indirectement sur les rendements du pois chiche .

Quand la contrainte est appliquée au stade gousse, elle se traduit par une forte baisse de la matière sèche des gousses (fig. 39c) alors que celle des feuilles et tiges change peu (fig. 38c). Ces résultats confirment aussi la sensibilité de ce stade où la plante remobilise activement ses réserves pour la formation du grain (Saxena , 1993). Dans tous les cas, les souches ont très peu d'effet sur la production de la matière sèche, quelque soit le niveau de stress, ce qui suggère un déclin de l'activité des nodules, observé à ce stade chez de nombreuses légumineuses (Patterson et Hudak, 1996).

III. Conclusion

La sensibilité de la fixation de l'azote au stress hydrique peut affecter les rendements dans beaucoup de régions touchées par le déficit hydrique. Dans ces conditions, le rôle bénéfique de la fixation, dans la formation du rendement a été démontré par Purcell et King (1996).

Les bases physiologiques pour la tolérance au stress hydrique ne sont pas bien connues chez la symbiose légumineuse-rhizobium. Le rôle que peut jouer la souche dans cette association pour améliorer la fixation en conditions de stress hydrique est primordial dans notre région. Nous avons pu montrer la supériorité de la souche IC2018 en conditions normales et de la souche C2260 pendant une contrainte hydrique en ce qui concerne la fixation de l'azote. Cet avantage est mieux exprimé pendant le stade floraison où le pois chiche fixe le maximum d'azote grâce au pic d'activité de la nitrogénase.

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

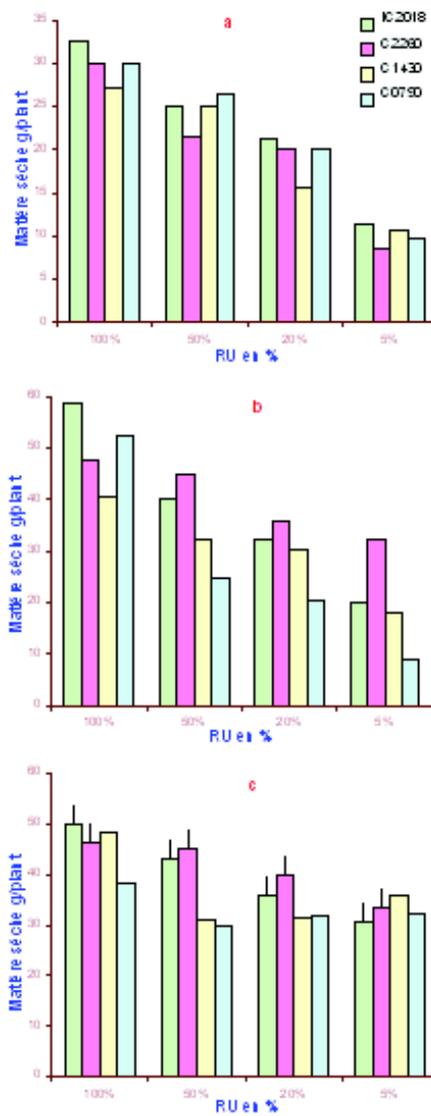


Figure 38 Relation entre le stress hydrique et la matière sèche des tiges et feuilles (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

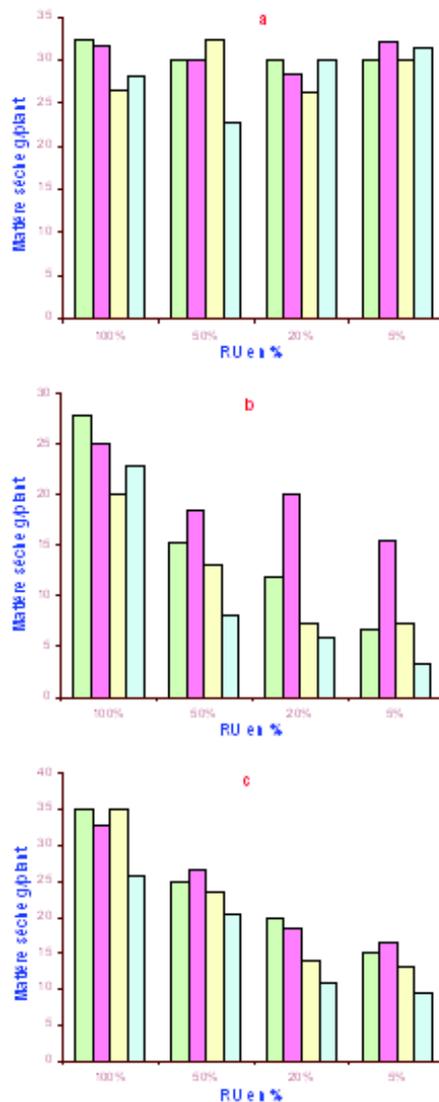


Figure 39 Relation entre le stress hydrique et la matière sèche des gousses (a) = stade végétatif (b) = stade floraison (c) = stade gousse

L'existence d'une forte corrélation entre la fixation de l'azote et le contenu en eau du nodule montre l'importance de la relation qui peut exister entre cet organe et la diffusion de l'eau et de l'air nécessaire au bon fonctionnement des bactéroïdes (King et Purcell, 2001).

Nous avons aussi mis en évidence la supériorité de la souche C2260 pour la production de matière sèche des feuilles, tiges et gousses pendant une contrainte hydrique. Ces paramètres contribuent à la formation du rendement et par conséquent conditionnent la productivité du pois chiche. De ce fait, nous pouvons penser que cette souche peut présenter un intérêt pour inoculer le pois chiche susceptible d'être cultivé dans les régions où les contraintes hydriques constituent un facteur limitant de la production végétale.

Nous estimons que dans notre région, la diversité génétique chez ce *Rhizobium* peut encore révéler de nombreux caractères liés à l'adaptation des souches au stress hydrique qui pourraient contribuer probablement à l'amélioration du rendement de cette espèce.

Chapitre V Effet du stress hydrique sur la formation et la croissance des nodules

I Introduction

La plupart des travaux concernant les effets du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote ont pris comme plante modèle le soja. Ils ont porté principalement sur l'activité de la nitrogénase alors que la formation des nodules n'est abordée que de façon accessoire.

Plusieurs études, sur le soja notamment, ont montré que la fixation est très sensible à la contrainte hydrique (Durand *et al.*, 1987) et que la baisse de cette activité peut affecter fortement l'accumulation de l'azote et par conséquent le rendement potentiel de la culture (Sinclair *et al.*, 1987).

Malgré l'importance des effets de la sécheresse sur la fixation et son impact sur les rendements, l'étude de la formation et la croissance des nodules sous contraintes hydriques n'a pas suscité autant d'intérêt alors que la relation entre l'humidité du sol et la nodulation est reconnue depuis longtemps. Smith *et al.* (1988) ont signalé une baisse substantielle dans la masse des nodules de la fève et du soja soumis à une contrainte hydrique. Comparant les effets de la sécheresse sur la nodulation, la fixation et la biomasse chez le soja, Kirda *et al.* (1989) ont montré que la fixation était le paramètre le plus sensible au déficit hydrique, bien que la croissance du nodule fut aussi sévèrement affectée. Une étude sur deux cultivars de soja faite par Purcell *et al.* (1997) a montré des réponses contradictoires au stress hydrique, dans le nombre et la masse des nodules. Mais Djekoun (1991) a clairement montré chez le soja, un effet dépressif du stress hydrique sur le nombre et la masse des nodules ainsi que sur leur contenu en eau.

Bien qu'il y ait eu des études sur l'existence d'une variabilité génétique parmi les cultivars du soja pour le nombre et le poids sec des nodules en irrigué (Sinclair *et al.* 1991 ; Pazdernik *et al.* 1996, 1997), pratiquement peu d'informations sont disponibles sur la variabilité de la nodulation sous contrainte hydrique chez les autres légumineuses. Cependant, il existe une variabilité dans la sensibilité de la fixation à la sécheresse, notamment chez le soja dont le cultivar Jackson s'est révélé plus tolérant (Sinclair *et al.*, 1991 ; Pazdernik *et al.*, 1996, 1997). La tolérance de ce cultivar est due partiellement à la présence de gros nodules qui favorisent un approvisionnement plus important en photosynthétats (King et Purcell, 2001). De même, Serraj et Sinclair, (1997), ont observé une variabilité dans la réponse de la fixation au stress hydrique chez plusieurs lignées de soja. Aussi, Ounane *et al.* (2003) ont montré une variabilité chez le pois chiche inoculé avec différentes souches sous contrainte hydrique.

Figueiredo *et al.*, (1998), dans un essai similaire sur le dolique, ont signalé la supériorité de l'efficacité d'une souche en condition sèche et ont relié ce caractère au contenu en léghémoglobine des nodules.

L'objectif de cette étude est de rechercher chez des cultivars de pois chiche, la variabilité dans la formation et la croissance des nodules sous contrainte hydrique. L'essai est mené en serre puis en plein champ de façon à mieux contrôler les conditions de la culture et leur impact sur les paramètres étudiés. Dans les deux cas le nombre et le poids sec des nodules ainsi que le poids sec individuel d'un nodule nous donnent une idée assez précise sur la formation, la croissance et la nodulation sous contrainte hydrique.

II Résultats

1. Effet du stress hydrique sur le nombre et le poids sec des nodules chez huit cultivars cultivés en serre

Nous constatons une diminution systématique du nombre et du poids sec des nodules sous l'effet du stress hydrique. Cette diminution est variable suivant les cultivars mais les valeurs obtenues chez FLIP87-7C montrent que ce dernier se distingue par une réduction plus forte du nombre de nodules avec un rapport de 0,7 ; il arrive cependant à maintenir un maximum de poids sec sous l'action de la contrainte hydrique (tab.8). Ce même cultivar se distingue aussi, dans les mêmes conditions par une augmentation du poids sec d'un nodule dans un rapport de 1,3. D'autres cultivars, comme FLIP86-96C, sont moins nodulés et perdent beaucoup plus de matière sèche pendant le stress hydrique.

Cultivars	Nombre de nodules /plant			Poids sec mg/plant			Poids sec mg/Nodule		
	arrosé	Stressé	Rapport	arrosé	Stressé	Rapport	Arrosé	Stressé	Rapport
ILC3279	65,02	50,72	0,78	220,32	139,24	0,63	3,39	2,75	0,81
ILC482	53,04	44,77	0,84	175,34	118,18	0,67	3,31	2,64	0,8
FLIP87-7C	84,32	59,11	0,7	240,12	218,89	0,91	2,85	3,7	1,3
FLIP86-88 C	51,11	42,32	0,83	145,65	102,83	0,71	2,85	2,43	0,85
FLIP86-93 C	42,02	35,93	0,86	135,54	98,54	0,73	3,23	2,74	0,85
FLIP87-54 C	40,43	34,54	0,85	129,87	84,67	0,65	3,21	2,45	0,76
FLIP87-86 C	35,12	27,56	0,78	123,43	79,53	0,64	3,51	2,89	0,82
FLIP86-96 C	29,21	21,34	0,73	104,54	56,77	0,54	3,58	2,66	0,74
ppds(0,05)	4,67	3,87	0,14	14,69	11,43	0,16	0,87	0,79	0,11

Tableau 8 : Effet du stress hydrique sur le nombre, le poids sec des nodules par plante et le poids sec d'un nodule chez le poids chiche cultivé en serre.

2. Effet d'un déficit hydrique progressif sur le nombre et le poids sec des nodules chez deux cultivars (ILC 482 et FLIP87-7C) cultivés en serre

Une approche particulièrement intéressante pour comparer la réponse de la plante au déficit hydrique est d'exprimer cette réponse comme une fonction de la réserve utile du sol (Ducroq, 1990). Pour cela, un essai a été mené en serre pour mieux contrôler les conditions expérimentales afin de mesurer le nombre et le poids sec des nodules en fonction des variations de la réserve utile du sol (RU).

L'effet de la déshydratation du sol (en % de la RU) sur le nombre et le poids sec des nodules ainsi que sur le poids sec d'un nodule a été étudié sur deux cultivars ayant un comportement contrasté vis-à-vis du stress hydrique: ILC 482 et FLIP87-7C. L'analyse de la variance montre que le cultivar et le stress hydrique ont un effet considérable sur ces paramètres. Quand ils sont exprimés en % du témoin arrosé et en fonction de la réserve utile, ils montrent des tendances différentes entre ILC et FLIP (fig. 40). Les deux cultivars possèdent sensiblement le même nombre de nodule et arrivent à le maintenir jusqu'à 60%

de la RU. Au-delà, l'effet du stress hydrique provoque une diminution du nombre de nodules qui

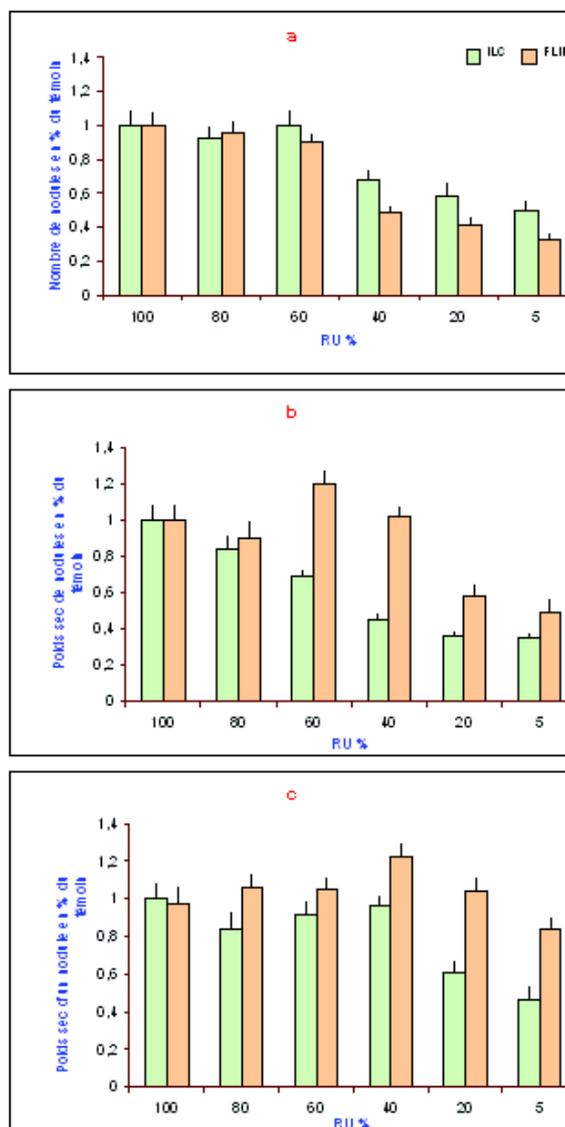


Figure 40 Effet du stress hydrique sur le nombre de nodules (a) le poids sec de nodules (b) et le poids sec d'un nodule individuel (c) chez le pois chiche cultivé en serre

est plus importante chez le cultivar FLIP. Chez ILC la contrainte hydrique se traduit par une diminution continue du poids sec des nodules ; par contre FLIP arrive à maintenir ce paramètre au niveau du témoin jusqu'à 40% de la RU. Au-delà nous observons une diminution du poids sec mais qui reste toujours inférieure à celle de ILC. Chez les plantes témoins le poids sec d'un nodule est sensiblement identique. Il diminue à partir de 20% de la RU chez ILC alors que FLIP garde le même poids et arrive à dépasser celui du témoin à 40% de la RU.

3. Effet du stress hydrique sur le nombre et le poids sec des nodules chez huit cultivars cultivés en plein champ

L'essai au champ a été mis en place sur un sol limono-sableux avec une fumure phospho-potassique à raison de 80 U de P₂O₅ et de 80 U de K₂O. L'inoculation est réalisée par enrobage des graines avec un inoculum juste avant le semis. Le stress hydrique est provoqué par arrêt de l'arrosage au stade début floraison pendant quinze jours.

Dans cette étude, nous avons pu montrer que la variété et le stress hydrique ont un effet considérable sur le nombre et le poids sec des nodules chez le pois chiche.

En plein champ et quinze jours après l'application de la contrainte hydrique le poids sec des nodules par plant varie entre 63mg et 202mg pour les plantes arrosées et entre 43mg et 165mg pour les plantes stressées (tab. 9). Parmi les 8 cultivars étudiés, FLIP 87-7C se distingue par le plus grand rapport entre le traitement stressé et le traitement arrosé avec une valeur de 0.82 pour le poids sec des nodules et le plus faible rapport (0,66) pour le nombre de nodules. Le poids sec d'un nodule chez les plantes stressées a une valeur inférieure ou légèrement supérieure à celle des plantes arrosées. Le plus grand rapport (1,24) est observé aussi chez FLIP 87-7C, traduisant ainsi une augmentation du poids sec du nodule sous la contrainte hydrique.

Cultivars	Nombre nodules /plant			Poids sec nodules mg/plant			Poids sec d'un nodule mg/Nodule		
	arrosé	Stressé	Rapport	arrosé	Stressé	Rapport	arrosé	Stressé	Rapport
ILC3279	54,15	41,32	0,76	179,34	98,54	0,55	3,31	2,38	0,72
ILC482	41,14	33,34	0,81	134,54	79,65	0,59	3,27	2,39	0,73
FLIP87-7C	73,43	48,43	0,66	202,54	165,43	0,82	2,76	3,42	1,24
FLIP88-88 C	40,21	31,43	0,78	104,43	60,98	0,58	2,60	1,94	0,75
FLIP88-93 C	31,12	24,54	0,79	96,54	56,87	0,59	3,10	2,32	0,75
FLIP87-54 C	30,43	23,22	0,76	88,52	45,56	0,51	2,91	1,96	0,67
FLIP88-98 C	26,32	18,43	0,70	85,45	43,56	0,51	3,25	2,36	0,73
FLIP87-88 C	18,76	13,78	0,73	63,34	46,21	0,73	3,38	3,35	0,99
ppds (0,05)	5,56	4,67		16,89	13,42		0,12	0,096	

Tableau 9 : Effet du stress hydrique sur le nombre, le poids sec des nodules par plante et le poids sec d'un nodule chez le pois chiche cultivé en plein champ.

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

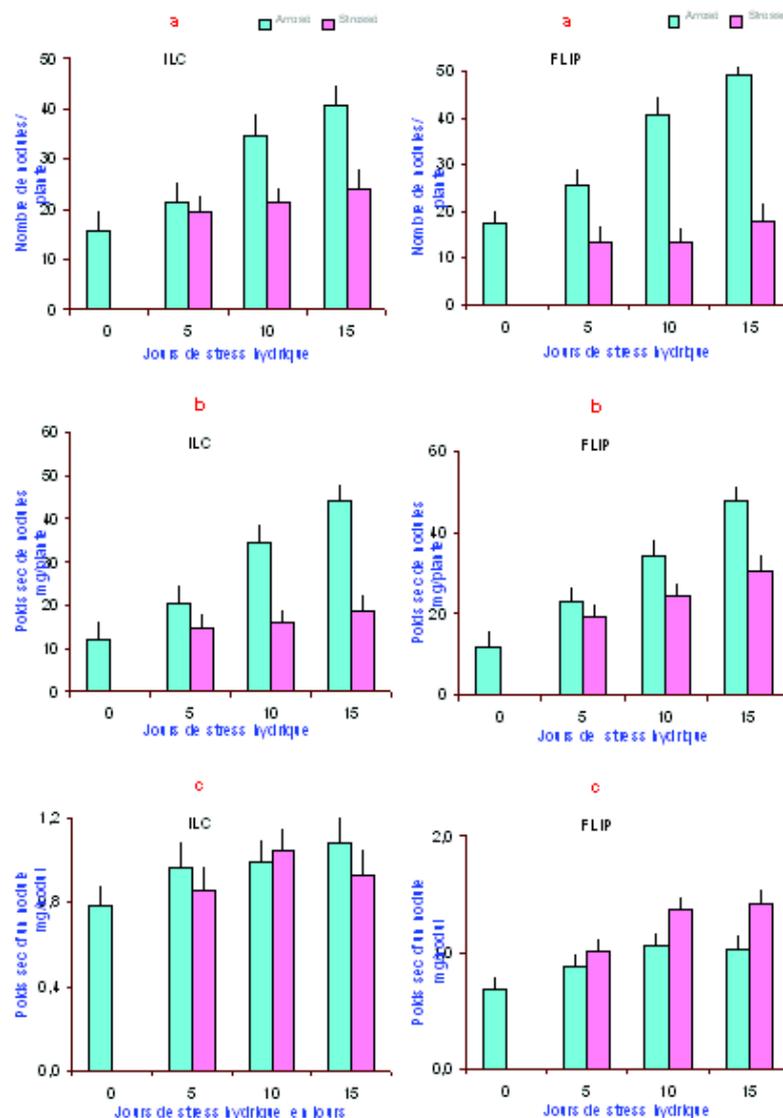


Figure 41 Effet du stress hydrique sur le nombre de nodules (a) le poids sec de nodules (b) et le poids sec d'un nodule individuel (c) chez deux cultivars le pois chiche (ILC482 et FLIP87-7C) cultivés en plein champ

4. Effet du stress hydrique sur le nombre et le poids sec des nodules chez deux cultivars (ILC 482 et FLIP87-7C) cultivés en plein champ

Dans cette expérience nous avons évalué la différence génotypique entre deux cultivars (ILC 482 et FLIP87-7C) en comparant l'effet du stress hydrique sur le nombre et le poids sec des nodules et le poids sec individuel d'un nodule (fig. 41).

Le stress provoque une diminution du nombre de nodules aussi bien chez ILC que FLIP (fig. 41a). Cette diminution est plus prononcée à partir du 10^{ème} jour chez FLIP. La comparaison entre les deux cultivars montre que FLIP arrive à garder plus de matière sèche nodulaire sous contrainte hydrique notamment au 15^{ème} jour (fig. 41b).

Le poids sec d'un nodule diminue légèrement sous contrainte hydrique chez ILC; par contre il augmente chez FLIP surtout au 10^{eme} et 15^{eme} jours de stress (fig. 41c).

5. Effet du stress hydrique sur la taille des nodules

Classe 1 : Les nodosités de taille < 2mm

Classe 2 : Les nodosités de taille comprise entre 2 et 2.5 mm

Classe 3 : Les nodosités de taille comprise entre 2.5 et 3 mm

Classe 4 : Les nodosités de taille > 3mm

Le poids sec des nodules est déterminé après séchage à 80°C pendant 18 heures.

Dans cet essai, nous avons étudié les plantes cultivées sous serre qui ont subi un stress hydrique de 15 jours après la floraison (fig. 42).

Le nombre de nodules, toutes tailles confondues, est plus grand chez FLIP.

Dans le traitement témoin arrosé c'est la classe 4 (grands nodules) qui renferme le plus grand nombre de nodules chez ILC. Par contre, nous observons autant de nodules dans la classe 1 (petits nodules) que la classe 4 chez FLIP. Dans le traitement stressé le nombre de gros nodules diminue fortement alors que les nodules de classe 1 augmentent chez ILC. Cette tendance s'inverse chez FLIP où nous remarquons une forte diminution des petits nodules et le maintien d'une grande partie de gros nodules (70%).

Le nombre de nodules de petite taille est plus important chez ILC que chez FLIP, alors que pour les nodules de grande taille c'est l'inverse qui se produit. En effet, ce dernier arrive à garder plus de nodules de grande taille quand il subit un stress hydrique. Ce résultat indique que la variation dans la sensibilité de la nodulation du pois chiche peut être associée avec les différences dans la réponse de la croissance du nodule au déficit hydrique.

III. Discussion

Les résultats obtenus en serre et au champ ont montré un effet inhibiteur important de la contrainte hydrique sur la nodulation. Dans tous les cas, le nombre et le poids sec des nodules, par rapport au témoin arrosé, ont diminué sous l'effet du stress hydrique (tab. 5 et 6, fig. 40 et 41). De même, nous avons observé une variabilité dans la réponse des cultivars au stress hydrique. Dans les deux essais, en serre (tab. 5) et au champ (tab. 6), le cultivar FLIP87-7C se distingue par sa capacité à conserver le maximum de matière sèche nodulaire sous contrainte hydrique.

Des résultats analogues ont été obtenus chez le soja par Serraj et Sinclair (1997); par contre ils contrastent avec ceux présentés par Sinclair et *al.* (1988), qui montrent dans une expérience au champ, qu'il n'y avait aucune baisse dans le nombre et poids sec des nodules en réponse à une contrainte hydrique modérée, bien qu'une baisse dans la fixation de l'azote ait été observée. Ils ont conclu que la nodulation ne répond à la sécheresse que lorsque la

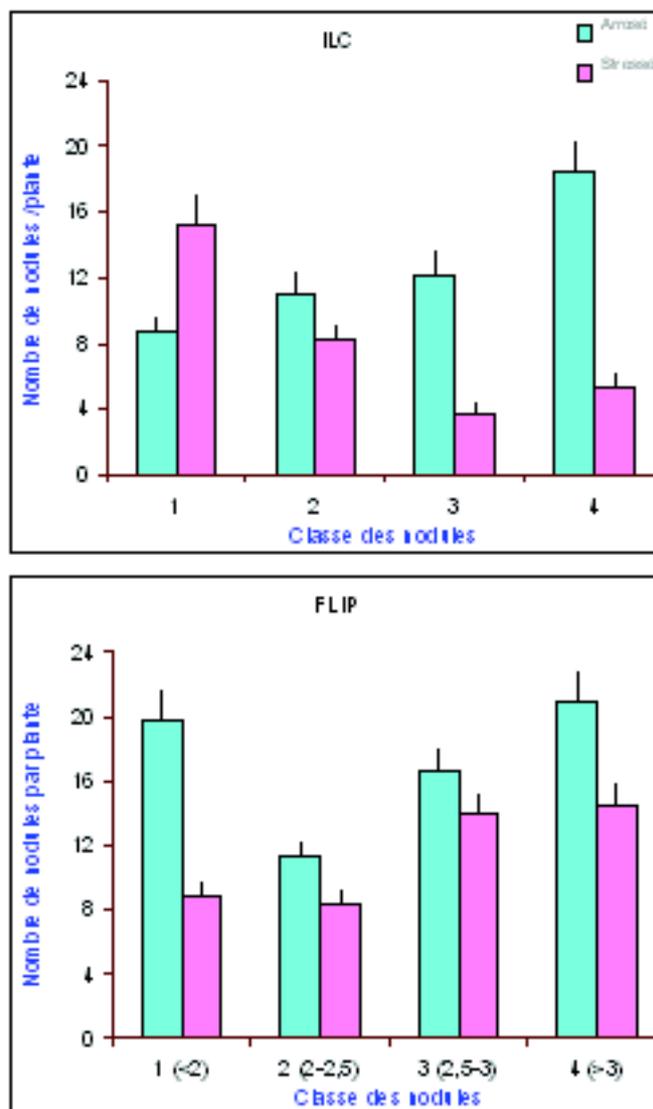


Figure 42 Effet du stress hydrique sur la taille des nodules chez deux cultivars (ILC482 et FLIP87-7C) cultivés en serre

contrainte était sévère et que la sensibilité était variable en ce qui concerne la fixation symbiotique de l'azote.

Le changement dans le poids sec moyen d'un nodule individuel peut constituer une indication intéressante qui peut être corrélée à la capacité de la plante à maintenir une bonne fixation de l'azote sous contrainte hydrique (Sall et Sinclair, 1991). Pour beaucoup de cultivars, y compris ILC, ce paramètre était le même ou légèrement plus petit que celui des plantes témoins bien arrosées (fig. 40 et 41, tab. 5 et 6).

La distribution des tailles de nodules pour ILC a montré une forte baisse dans le nombre de grands nodules et une augmentation dans le nombre de petits nodules (fig. 42). En revanche FLIP présente une augmentation dans le poids sec d'un nodule par rapport à celui du témoin bien arrosé (tab. 5 et 6) et maintient une distribution assez constante du nombre de nodules de la classe 3 et 4 (fig. 42). Un comportement analogue a été observé par Purcell et al. (1997) qui ont montré dans une comparaison entre petits et grands nodules que ces derniers se caractérisent par un volume plus important consacré à la fixation de l'azote.

Il semblerait que la réduction du nombre de nodules soit compensée par l'apparition de nodules plus grands pouvant bénéficier d'une plus grande provision en hydrates de carbone capable de fournir de l'énergie et des squelettes carbonés nécessaires à la fixation de l'azote. Cette hypothèse est soutenue par Purcell et *al.* (1997) qui ont montré une plus grande accumulation de la biomasse et allocation de photosynthétats aux nodules pendant un déficit hydrique. En effet, Serraj et *al.* (1998) ont rapporté qu'une exposition prolongée dans le gaz carbonique, favorise l'accumulation des hydrates de carbone, ce qui permet une augmentation de la masse du nodule et une prolongation de la fixation de l'azote sous contrainte hydrique. De même, la variation dans la sensibilité de la fixation à la sécheresse peut être associée à la réponse du nodule dans sa croissance sous contrainte hydrique (Serraj et Sinclair, 1997).

En conclusion, les essais en serre ont montré une grande variabilité parmi les cultivars de pois chiche, dans la sensibilité de la nodulation au stress hydrique. Ces observations ont été confirmées au champ et sont en accord avec les observations sur la tolérance à la sécheresse signalées par plusieurs auteurs (Djekoun, 1991 ; Serraj et Sinclair 1996 ; Purcell et *al.*, 1997; Serraj et *al.*, 1997; Ounane et Salsac, 1999). Ils montrent l'intérêt que peuvent présenter certains cultivars à maintenir et à garder le maximum de matière sèche nodulaire lors d'un déficit hydrique. La présence de gros nodules constitue aussi un mécanisme d'adaptation pouvant permettre à ces cultivars de mieux surmonter les contraintes hydriques.

Nous estimons que la diversité génétique chez cette espèce peut encore révéler d'autres écotypes capables de former de gros nodules et pouvant contribuer probablement à l'amélioration du rendement du pois chiche cultivé sous contrainte hydrique.

Chapitre VI Effet des nitrates sur la nodulation et la fixation de l'azote

I. Introduction

Depuis la découverte de l'action inhibitrice de l'azote combiné sur la formation des nodosités chez *Vicia faba* (Rautenberg et Kuhn 1964 in Gonzalez, 1987), de nombreux travaux portant sur diverses légumineuses ont eu pour objectif d'en expliquer le mode d'action. Celui-ci est certainement complexe car le nitrate affecte à la fois le processus d'infection des racines par les bactéries, le développement des nodosités et l'expression de la nitrogénase.

L'analyse bibliographique montre l'existence d'une relation complexe mettant en jeu la plante, le *Rhizobium*, la forme ou la teneur de l'azote, la période d'application et l'environnement (Gordon et *al.*, 2002 ; Fujikake et *al.*, 2003).

Dans l'état actuel des connaissances, l'influence des nitrates dans la symbiose *Rhizobium* - légumineuses reste encore mal connue surtout sur le plan des mécanismes. Il est cependant admis que le facteur majeur qui induit des changements dans l'activité nitrogénase est la concentration d'oxygène libre à l'intérieur du nodule. Cette dernière est contrôlée par la barrière de diffusion qui régule le flux d'oxygène (ODB). La présence de nitrate peut réduire la disponibilité de cet élément en augmentant la résistance à la diffusion des gaz dans le cortex nodulaire (Neo et Layzell, 1997).

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

Une autre hypothèse met en évidence un lien indirect entre la fixation de l'azote et le feed-back de l'azote soluble des feuilles vers les nodules (Parson *et al.*, 1993; Hartwig, 1998; Serraj *et al.*, 1999). Dans ce cas, l'absorption des nitrates peut avoir des répercussions sur le métabolisme général de la plante. Il est possible alors, que la réduction du nitrate dans les feuilles produit des acides aminés et amides qui seraient exportés au reste de la plante et qui vraisemblablement seraient impliqués dans la réduction de la fixation de l'azote.

D'autres travaux montrent que l'ODB n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le contrôle des fonctions du nodule. En effet, chez des plantes exposées à un stress hydrique modéré, les nodules ne sont pas limités uniquement par O₂ mais également par une limitation métabolique (Guerin *et al.*, 1990; Diaz Del Castillo *et al.*, 1994). Quand la fixation N₂ diminue par suite d'une contrainte du milieu, l'augmentation de la concentration externe en O₂ provoque rarement une augmentation de la fixation par rapport aux plantes témoins (Gordon *et al.*, 1997). Cela implique que dans la plupart des stress environnementaux l'ODB ne représente qu'une partie des causes responsables de la réduction de l'activité du nodule.

Gordon *et al.* (1999) ont montré que la fixation N₂ est corrélée directement avec l'activité de la saccharose synthétase (SS) du nodule chez le soja soumis à plusieurs contraintes. Les déclin les plus importants de la fixation N₂ et de la SS s'observent dans les nodules de plantes soumises, soit à une contrainte hydrique modérée, soit traitées avec 10 mM de nitrate ou 150 mM de NaCl pendant 6 jours. Ces traitements induisent aussi une répression sévère du gène SS.

Lors d'un stress hydrique, le déclin de l'activité SS est corrélé avec la répression du gène SS du nodule (Gordon *et al.*, 1997). Cela confirme l'hypothèse que la baisse de la fixation N₂ dans les nodules de soja n'est pas seulement due aux changements dans le flux de l'O₂, mais aussi, de leur capacité à métaboliser le saccharose à travers l'activité SS. De plus, il a été proposé que la réponse de nodules aux contraintes de l'environnement peut impliquer directement la régulation du gène SS (Gordon *et al.*, 1999).

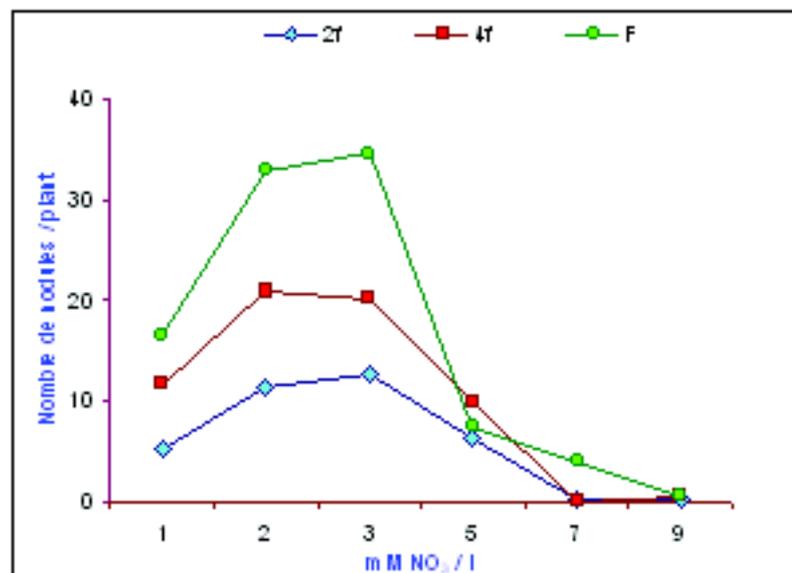


Figure 43 Effet des nitrates sur le nombre des nodules au stade deux feuilles (2f), quatre feuilles (4f) et floraison (F)

Le métabolisme dans les nodules de la légumineuse a besoin d'être régulé pour assurer une coordination entre la quantité d'azote fixé, la croissance et les exigences en azote de la plante. Il est maintenant établi qu'il y a généralement des interactions régulatrices entre photosynthèse, accumulation des hydrates de carbone et croissance qui impliquent des besoins en sucre, nitrate ou d'autres composés azotés (Stitt et Krapp, 1999).

II. Résultats

1. Effet des nitrates sur la formation des nodules

L'effet du nitrate se manifeste d'abord par une stimulation de la nodulation jusqu'à 3 mM de NO_3 ensuite par une réduction puis une forte inhibition de la nodulation au-delà de cette concentration (fig. 43). En effet, les légumineuses ne fixent bien l'azote qu'après la formation des nodules et le fonctionnement optimum de la nitrogénase, ce qui correspond en général au stade début floraison. Entre temps, la légumineuse puise la majorité de ses besoins en azote sous forme combinée du sol (Dommergues et Mangenot, 1970). En fait, cet azote contribue directement à la croissance et au bon développement de la plante en général et indirectement à la mise en place du système fixateur (racines + nodules).

L'effet bénéfique du nitrate sur la nodulation est bien connu et se manifeste avec des concentrations inférieures en général à 3 mM. Mais l'origine exacte de la stimulation des *Rhizobium* pour la formation des nodules est obscure; on sait cependant, qu'elle est liée dans une certaine mesure aux exsudations racinaires (acides aminés, enzymes, sucres, vitamines), abondantes chez les légumineuses (Dommergues et Mangenot, 1970).

En effet, Jessop et *al.* (1984) ont pu montrer que des concentrations comprises entre 1,5 meq et 3 meq stimulent la nodulation chez le pois chiche. De même, Rawstorne et *al.* (1985) confirment cette tendance sur la même espèce mais avec une concentration légèrement supérieure (3,5 mM) qu'ils considèrent comme optimum pour la nodulation. En culture hydroponique la meilleure nodulation a été obtenue au stade début floraison avec 3 mM chez le pois chiche (Irekti, 1989).

Nous remarquons par ailleurs que l'effet bénéfique du nitrate s'observe bien aux trois stades phénologiques et qu'il est plus accentué au stade début floraison (fig. 43). A ce stade, la plante termine la formation de la majorité des nodules qui commencent à fixer l'azote atmosphérique avec un pic d'activité qui se situe entre la floraison et le remplissage des gousses. Au-delà de 5mM, la nodulation est sévèrement affectée sinon complètement inhibée notamment, au stade floraison où nous observons une chute brutale à partir de 3mM et qui se poursuit jusqu'à 9mM où aucun nodules n'est visible (fig. 43).

L'effet du nitrate se traduit par une action inhibitrice à un stade précoce en empêchant l'induction des nodosités et leur développement (Gibson et Pagan, 1977). Parmi les différentes hypothèses qui ont été formulées pour expliquer ce phénomène nous pouvons citer l'inhibition de la synthèse des lectines qui assurent l'adsorption des bactéries sur les poils absorbants et par conséquent la diminution du nombre de récepteurs pour la lectine à la surface des racines (Dazzo et Brill, 1978; Denarie et Truchet, 1979), l'accélération de la destruction de l'AIA, hormone qui contrôle la courbure des poils absorbants et l'infection des racines (Munns, 1968), l'inhibition de la reconnaissance du soja par le *Rhizobium* (Gonzalez, 1987). L'inhibition dépend aussi de la concentration en nitrate de la solution (Streeter, 1988).

Des constituants de la paroi bactérienne jouent probablement un rôle dans la phase précoce de l'infection (Denarie et Truchet, 1979). Chez le soja, l'étude des profils de nodulation établis en présence ou en absence de nitrate montre que la localisation de l'infection par les *Bradyrhizobium* n'est pas modifiée mais que le nombre de nodosités formées est diminué en présence de nitrate (Fernandez, 1987).

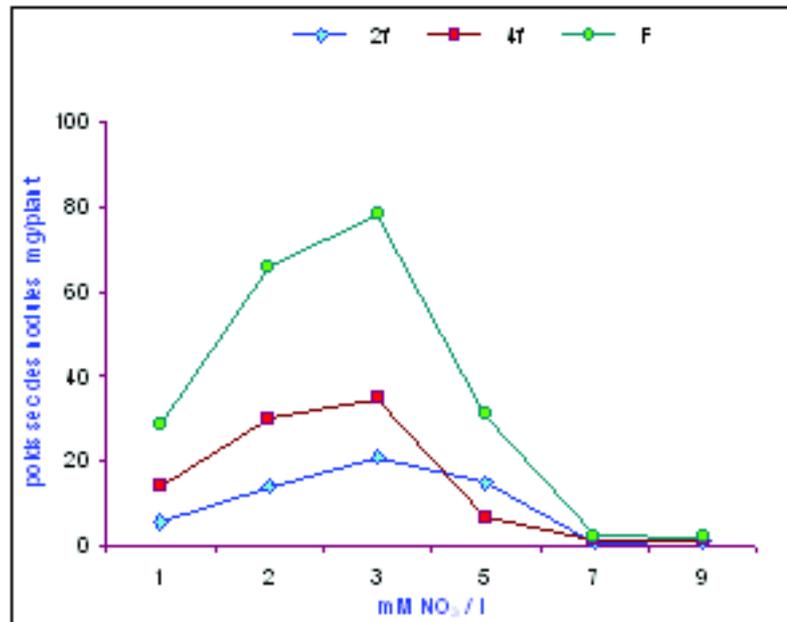


Figure 44 Effet des nitrates sur le poids sec des nodules au stade deux feuilles (2f), quatre feuilles (4f) et floraison (F)

Jusqu'à la fin des années 80, il était admis que la présence de nitrate dans le milieu inhibe complètement ou réduit sévèrement le processus d'infection des racines par des souches (Alcantar-Gonzales et al., 1988). Par la suite, il a été montré que quelques souches de *Rhizobium* n'ont pas été affectées par la présence de nitrate. En effet, Serrano et Chamber-Perez (1990) travaillant sur trois souches de *Bradyrhizobium sp* (*Lupinus*) ont montré que les souches avec une activité cNR constitutive ou iNR inductible étaient capables d'infecter des racines en présence de fortes concentrations de NO₃⁻ (12 mM), alors que les souches sans NR ont complètement perdu la capacité de former des nodules. De plus, à des concentrations faibles de 1-2 mM de NO₃⁻, les souches avec une activité NR (constitutif ou inductible) ont infecté plus efficacement les racines qu'en l'absence de nitrate. Ces résultats montrent qu'il y a une possibilité de formation d'associations symbiotiques, dans lesquelles la présence de nitrate n'inhibe pas la nodulation. L'effet de l'activité NR sur l'efficacité de l'infection de la racine peut être expliqué par le « nettoyage » des ions NO₃⁻ (qui seraient consommés par ANR) de l'environnement bactérien.

2. Effet des nitrates sur la croissance des nodules

La figure 44 montre clairement une augmentation de la masse des nodules par plant sous l'action des faibles concentrations de nitrates puis une diminution à partir de 3 mM. Il est intéressant de remarquer qu'au stade floraison, la réduction à 5mM est moins forte qu'aux deux autres stades. Ceci traduit la présence de nodules de taille plus grande. En effet, si nous comparons le rapport entre le nombre de nodules et leur masse, nous obtenons la valeur la plus faible au stade floraison et en présence de 5mM de nitrates (0.24) ; ce qui

traduit bien une compensation de la diminution du nombre de nodules par une augmentation de leur masse (tab 7).

Tableau 7 Evolution du rapport du nombre par le poids sec de nodules par plante en fonction des concentrations NO_3^- et au stade floraison

Concentration NO_3^-	1mM	2mM	3mM	5mM	7mM	9mM
Nombre de nodules	16,6	32,9	34,6	7,4	4	0,5
Poids sec de nodules	28,5	66	78,3	31	2,3	2
Nombre / Poids sec	0,58	0,50	0,44	0,24	1,74	0,25

Chez le pois chiche, comparativement au soja, la nodulation est moins sensible aux effets inhibiteurs du nitrate (Jessop et al., 1984). Selon cet auteur, la croissance des nodules exprimée par la masse de nodules par plant atteint son maximum en présence de 3mM de nitrate, tandis que ce maximum est observé à des dose plus faibles chez le soja.

L'action du nitrate qui se manifeste par une réduction de la croissance des nodules serait due à une baisse de l'accumulation des sucres à l'intérieur de ceux-ci (Latimore et al., 1977). De même Fujikake et al. (2003) ont montré chez le soja que la présence de nitrate provoque une baisse de la fourniture des photoassimilats aux nodules qui se traduit par l'arrêt réversible de la croissance de ces derniers.

Day et al (1989) ont signalé que l'effet inhibiteur du nitrate sur l'initiation et le développement du nodule chez le soja, dépend de l'interaction entre le nitrate et le signal d'autorégulation. Un test de nodulation avec ou sans apports de nitrates appliqué à des mutants de soja supernodulants a relevé une tolérance prononcée de ces mutants aux nitrates comparativement au type sauvage. De plus, cette nodulation s'est étalée tout au long du cycle de la culture.

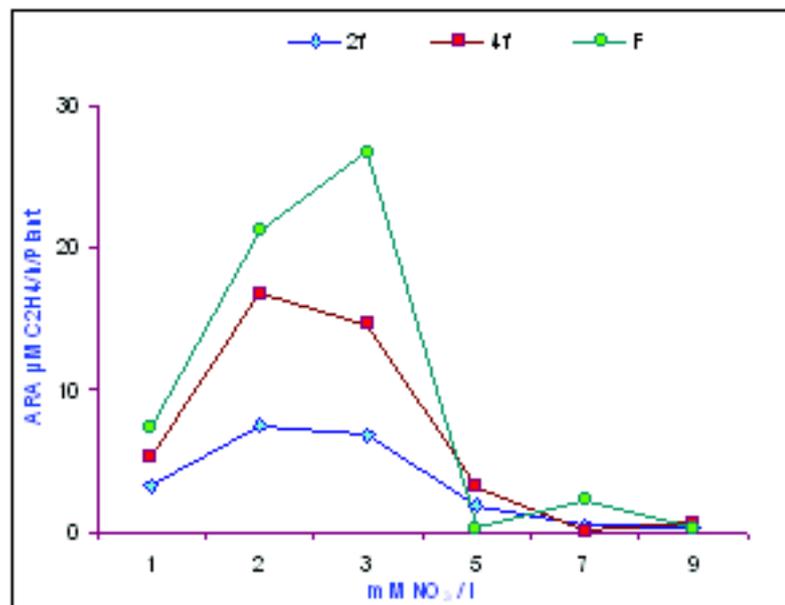


Figure 45 Effet des nitrates sur l'activité réductrice d'acétylène (ARA) au stade deux feuilles (2f), quatre feuilles (4f) et floraison (F)

Des expériences de greffage entre un cultivar de soja sensible au nitrate et les mutants supernodulants indiquent que la partie aérienne était responsable de la supernodulation. Cette aptitude à la nodulation semble être associée à une diminution de l'autorégulation du nombre de nodules par la plante qui serait due à l'absence ou à l'altération du signal d'autorégulation (Day et al., 1989).

Enfin, il faut noter la présence d'un gène qui intervient dans l'élaboration d'une substance dans la partie aérienne. Cette substance serait transmise dans la partie racinaire où elle va bloquer l'activité méristématique nodulaire. Cela n'exclue pas un effet d'inhibition de la nodulation par les nitrates au site même de sa formation (Day et al., 1989).

Chez la majorité des légumineuses la présence de nitrate dans le milieu affecte le contenu protéique et la matière sèche des nodules (Arrese-Igor et al., 1990). La présence d'une NR active peut cependant changer cette action. Serrano et Chamber-Perez (1990), dans une expérience sur le lupin jaune (*Lupinus luteus*) ont comparé trois souches de *Bradyrhizobium spp.* (*Lupinus*). Ils ont montré que la masse des nodules produits par les souches avec une activité NR (inducible ou constitutif) était plus grande que les nodules produits par la souche sans NR. De plus ce résultat est corrélé positivement avec le contenu en azote des tiges de la plante. D'autres associations symbiotiques ont aussi montré une certaine tolérance au nitrate. Les nodules formés par *Rhizobium meliloti* sont capables de garder une concentration en protéine constante en présence de 5 mM NO₃ (Arrese-Igor et al., 1997).

3. Effet des nitrates sur l'ARA

La figure 45 montre aussi une double action du nitrate sur l'activité fixatrice. Les mêmes observations peuvent être faites pour l'activité réductrice d'acétylène où nous remarquons une amélioration de cette activité aux concentrations inférieures à 3 mM de nitrate. A partir de 5mM de nitrate, l'ARA est très faible ou nulle.

Une baisse dans la fixation de l'azote par les bactéroïdes en présence de nitrate a été rapportée à maintes reprises (Minchin et al., 1986a ; Serrano et Chamber-Perez, 1990 ; Chamber-Perez et al., 1997; Arrese-Igor et al., 1997). La plupart des recherches ont approché ce problème par la plante hôte, ignorant le fait que le microsymbiote bactérien n'est pas entièrement subordonné au métabolisme de la plante. Ces dernières années, plusieurs travaux se sont penchés sur le microsymbiote permettant une nouvelle approche dans la compréhension de ce phénomène.

L'hypothèse expliquant le rôle du nitrate dans la diminution de la fixation de l'azote causée par une baisse de la respiration des bactéroïdes (sous l'effet de l'augmentation de la résistance à la diffusion de l'O₂ dans le cortex du nodule), est apparue dans les années 80 (Minchin et al., 1986a; 1986b). Les changements rapides dans la résistance à la diffusion des gaz ont été expliqués par plusieurs mécanismes : changements dans le potentiel osmotique des cellules du nodule (Witty et al., 1986), remplissage de l'espaces intercellulaire du nodule par des molécules d'eau (Walsh et al., 1989; Ismade, 1991), ou une variation dans l'écoulement de la sève du phloème (Layzell et Hunt, 1990).

Il y a cependant, de nombreuses données qui confirment la présomption que la présence de nitrate augmente la résistance à la diffusion des gaz. En présence de nitrate, le coût énergétique de la fixation de l'azote et la résistance à la diffusion du gaz augmente, mais la respiration du bactéroïde baisse. Quelques auteurs ont suggéré que l'augmentation de la résistance à la diffusion des gaz pourrait être une réponse secondaire

aux changements métaboliques, comme dans le cas des effets causés par le stress hydrique et les basses températures (Arrese-Igor et al., 1997).

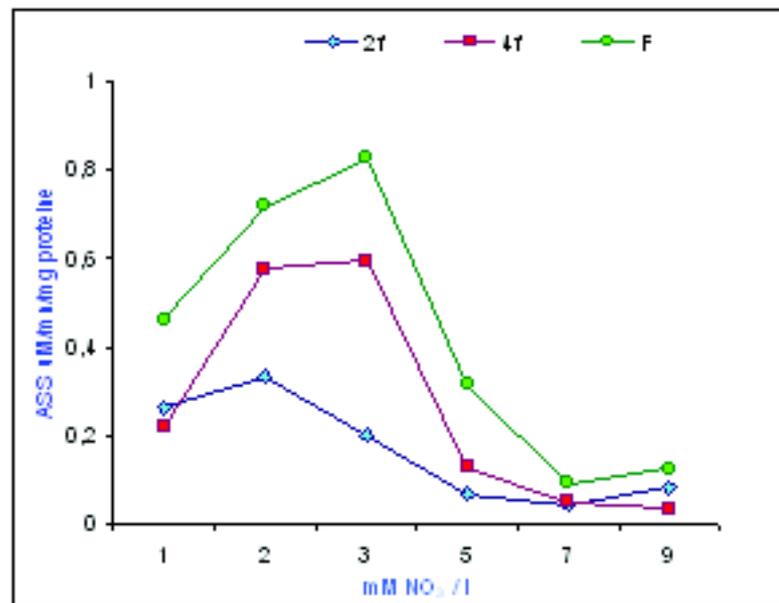


Figure 46 Effet des nitrates sur l'activité sacharose synthétase au stade deux feuilles (2f), quatre feuilles (4f) et floraison (F)

Vessey et Waterer (1992) ont suggéré que la haute concentration du nitrate pourrait être la cause de la formation d'un gradient de pH local ou d'un gradient électrochimique dû aux différences dans la concentration de nitrate entre les couches de cellules du cortex. Ces conditions peuvent affecter la perméabilité des gaz dans le cortex et causer une réduction de la fourniture du NAD(P)H et de l'ATP et par conséquent une limitation de l'activité de la nitrogénase .

Chez le lupin, l'intensité de la respiration du bactéroïde représente 83% de l'activité respiratoire de la zone infectée (Ratajczak et al., 1996). Dans ce cas, on peut comprendre qu'une privation d'oxygène peut causer une baisse considérable dans la synthèse de l'ATP nécessaire à l'activité de la nitrogénase.

La présence d'une nitrate réductase dans les bactéroïdes est responsable de la réduction dissimilatrice du nitrate. Ce processus peut se produire aussi bien dans les conditions anaérobiques que microaérobiques (O'Hara et Daniel, 1985). Dans ces conditions, la compétition pour l'énergie entre les activités nitrogénase et nitrate réductase pourrait diminuer la quantité d'ATP disponible pour la nitrogénase et par conséquent limiter son activité. Cette compétition est susceptible de s'exercer au niveau de la répartition des photosynthétats, mais chez le soja il n'y a pas de diminution de l'approvisionnement en glucides des nodosités en cas d'apport de nitrate (Streeter, 1981). La compétition entre les deux activités aurait donc lieu plus vraisemblablement dans les nodosités où l'activité nitrate réductase peut être élevée (Streeter, 1982; Hunter, 1983).

Selon une autre hypothèse, l'activité nitrogénase serait inhibée par une accumulation d'ion NO₂⁻ qui a été observée dans les nodosités (Rigaud, 1976; Streeter, 1982; Wasfi, 1983). L'ion NO₂⁻ est en effet un inhibiteur spécifique du composant I de la nitrogénase (Trinchant et Rigaud, 1982) ainsi que de la léghémoglobine (Rigaud et Puppo, 1977).

Gonzalez (1987) a montré que le carbone assimilé par voie photosynthétique est exporté en moindre quantité vers les organes souterrains lorsque les légumineuses sont traitées à l'azote. En effet, la nitrate réductase foliaire est induite par le nitrate. Donc, le besoin d'énergie et de chaînes carbonées pour la réduction du nitrate rendrait les feuilles prioritaires dans la compétition vis-à-vis des photosynthétats. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'inhibition de la fixation de N₂ est partiellement levée par un apport de glucides aux nodosités (Wong, 1980).

Par contre, une étude sur le soja, suggère que la photosynthèse ne contrôlerait pas le fonctionnement des nodosités puisque une augmentation de CO₂ aérien ou une diminution d'illumination du feuillage qui modifie la fixation foliaire du CO₂, n'ont pas d'effet à court terme sur l'activité nodulaire (Drevon et al., 1990).

La tolérance de plusieurs espèces de *Rhizobium* à certaines concentrations de NO₃, dépend aussi de l'activité hydrogénase. Les souches qui en possèdent sont plus tolérantes aux nitrates (Serrano et Chamber-Perez, 1990). L'hydrogénase est une enzyme de la membrane du bactéroïde qui contribue au recyclage de H⁺ avec une synthèse d'ATP (Uden, 1997).

4. Effet des nitrates sur l'activité saccharose synthétase des nodules (ASS)

La figure 46 illustre bien aussi la double action des nitrates sur l'activité de la saccharose synthétase (ASS). Les concentrations inférieures à 3 mM stimulent l'activité de cette enzyme mais au-delà de cette concentration, nous observons une réduction brutale de l'ASS qui devient pratiquement nulle entre 7 et 9 mM. La même tendance est observée aux trois stades phénologiques. Gordon et al., (1997) ont avancé l'hypothèse que la baisse de l'ASS serait la cause directe de la réduction de l'ARA en présence de nitrates. La relation entre ces deux activités est bien claire si nous comparons les courbes des figures 3 et 4. Il semble que la tendance de ces deux activités soit comparable vis-à-vis du nitrate. Mais il n'est

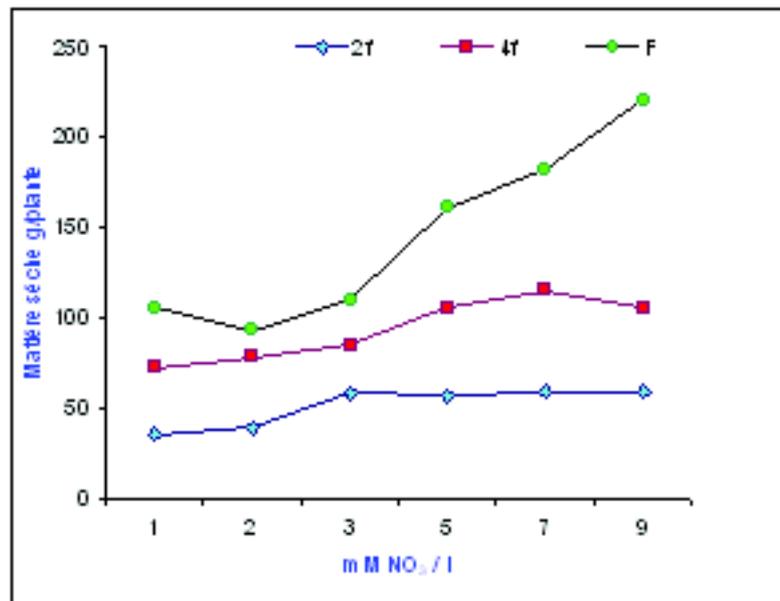


Figure 47 Effet des nitrates sur le poids de matière sèche au stade deux feuilles (2f), quatre feuilles (4f) et floraison (F)

pas possible de confirmer dans notre cas le lien direct de cause à effet entre ces deux enzymes.

La saccharose synthétase est une enzyme essentielle pour la fixation symbiotique de l'azote (Gordon et *al.*, 1999). Par conséquent, si l'activité de cette enzyme est réduite par suite d'un mécanisme régulateur en réponse à un stress ou à un changement du statut alimentaire, cela pourrait être une fonction de contrôle du nodule. La réduction de l'activité SS est comparable à celle de l'activité nitrogénase en présence de nitrates (fig. 45) ou d'un stress hydrique (Gordon et *al.*, 1997). Cependant, le déclin de la fixation, reflète probablement un épuisement rapide du saccharose (dû au manque d'activité photosynthétique) plutôt qu'un changement dans la capacité de l'enzyme à le métaboliser.

La réduction graduelle de l'activité SS paraît être retardée à l'obscurité comparée au déclin considérable observé deux jours après le stress hydrique. En outre, la présence de nitrate provoque un déclin de l'activité nitrogénase un jour après le traitement alors qu'il n'apparaît que deux jours plus tard dans le cas d'un stress hydrique (Durand et *al.* 1987).

Par contre, Gordon et *al.*(2002) n'ont décelé aucune perte d'hydrate de carbone dans les nodules; le taux de saccharose et d'hexose n'ont pas changé pendant le déclin de la nitrogénase bien que le niveau d'amidon ait baissé rapidement. En effet, une carence en azote provoque une accumulation d'amidon et l'addition de nitrate déclenche une remobilisation rapide de l'amidon chez les plantes carencées (Stitt et Krapp, 1999; Geiger et *al.*, 1999)

Donc, les changements de l'activité SS et du taux de saccharose dans le nodule ne pourraient pas être la cause de la baisse de l'activité nitrogénase. Par conséquent, l'hypothèse SS (Gordon et *al.*, 1997) ne peut s'appliquer que dans le cas du stress hydrique et le déclin de l'activité SS pourrait être la conséquence de la baisse de l'activité nitrogénase.

5. Effet des nitrates sur la croissance de la plante

La figure 47 montre une évolution normale de la production de la matière sèche pour les deux premiers stades. Par contre le stade floraison présente une courbe où nous observons une forte production de matière sèche à partir de 5 mM de NO_3^- . Si nous comparons ce résultat avec la figure 47 nous constatons que cette concentration (5mM) correspond à la chute de l'activité de la fixation N_2 . Nous remarquons aussi que les faibles concentrations (2 et 3 mM NO_3^-) permettent une forte activité fixatrice (fig. 45), mais qui ne se traduit pas par une grande production de matière sèche (fig. 47). Les fortes concentrations (5 à 9 mM NO_3^-) provoquent une inhibition très sévère de l'ARA (fig. 45) mais stimulent par contre la croissance avec une forte production de matière sèche (fig. 47). Il est bien connu que la fixation N_2 ne peut pas suffire à elle seule pour satisfaire la totalité des besoins en azote des légumineuses (Gordon, 2002). Un apport d'engrais azoté procure une meilleure production des cultures (Stitt et Krapp, 1999). La préférence des légumineuses pour le nitrate au détriment de la fixation N_2 n'est pas bien expliquée. On pense que pour que le cycle de l'azote puisse s'accomplir, il faut que le dernier produit de la minéralisation (NO_3^-) puisse être consommé par la plante pour boucler le cycle (Gordon, 2002).

III. Discussion

Les résultats que nous venons de présenter confirment la complexité des mécanismes déclenchés par la présence du nitrate chez les légumineuses. Des données contradictoires

viennent encore compliquer la compréhension de ce phénomène. Nous avons pu cependant mettre en évidence le rôle majeur du nitrate dans la fixation symbiotique de l'azote. Sa double action se traduit par une stimulation aux faibles concentrations (1 à 3 mM NO₃) et une inhibition aux fortes concentrations (4 à 9 mM NO₃). Ce mode d'action s'observe dans la plupart des paramètres que nous avons étudiés notamment la nodulation, l'ARA et l'ASS. Nous avons pu montrer aussi l'existence d'une limite de concentrations aux environs de 3 mM qui sépare l'action stimulante et l'action inhibitrice du nitrate. Cette limite constitue un enjeu majeur pour la fertilisation des cultures dans une optique de préservation de l'environnement. Tous les apports d'azote au delà de cette limite affectent la fixation N₂ et polluent le milieu. Un nouveau concept est entrain de se développer pour éviter les pertes d'azote dans la nature. C'est le « pilotage » de la fertilisation azotée dans les systèmes de culture pour une agriculture propre et durable.

Les mécanismes invoqués pour expliquer l'action du nitrate sur la fixation N₂ sont nombreux du fait de la complexité des interrelations qui existent entre l'activité du nodule et d'autres processus biochimiques de la plante. Actuellement, la majorité des chercheurs sont d'accord sur le fait que le nitrate serait responsable de l'augmentation de la résistance de la barrière de diffusion à l'oxygène nécessaire à la respiration des bactéroïdes. On invoque aussi, la présence d'une nitrate-reductase dans les nodules responsables de la réduction dissimilatrice du nitrate. L'activité de cette enzyme garantit un enlèvement rapide du nitrate dans la zone d'infection du nodule.

Il existe cependant, une grande variabilité chez les légumineuses pour leur tolérance au nitrate. Quelques variétés de soja sont capables de fixer l'azote en dépit de la présence de concentrations relativement fortes de nitrate (Serraj et *al.*, 1992).

La recherche de couples variété-souche capables de fixer l'azote dans des sols riches en nitrates constitue un objectif important pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche.

Chapitre VII Effet du manganèse sur la tolérance à la sécheresse de la fixation N₂

I. Introduction

D'après la revue de Serraj et *al.* (1999a), concernant l'effet du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote, les données biochimiques et physiologiques montrent que :

- Le stress hydrique provoque une accumulation des uréides dans les feuilles.
- Les uréides accumulés dans les feuilles retournent par feedback aux nodules.
- L'accumulation des uréides dans les nodules inhibe la nitrogénase.
- Le catabolisme des uréides par l'amidohydrolase peut être accéléré par un apport supplémentaire de manganèse.
- Les cultivars tolérants à la sécheresse dégradent plus rapidement les uréides

A partir de ces données nous avons essayé de vérifier l'hypothèse que l'apport du manganèse peut atténuer l'action inhibitrice des uréides sur l'activité de la nitrogénase chez le pois chiche (Serraj et *al.*, 1999a).

Les uréides (allantoïne et allantoate) sont les produits de la fixation N_2 chez la plupart des légumineuses. Ils sont transportés des nodules vers les feuilles où ils sont dégradés normalement grâce à l'amidohydrolase (Winkler et *al.*, 1987). Pendant une contrainte hydrique, le fonctionnement de cette enzymes est ralantie, provoquant ainsi une accumulation des uréides dans les feuilles (De Silva et *al.*, 1996; Serraj et Sinclair, 1996; Purcell et *al.*, 1998). Par feedback ces uréides retournent aux nodules par la sève du phloème et leur accumulation provoque l'inhibition de la nitrogénase (Serraj et *al.*, 1999a).

Le taux d'accumulation des uréides en réponse à un déficit hydrique est variable suivant les variétés ou les écotypes. Cette variabilité existe chez le soja avec notamment le cultivar « Jackson » réputé tolérant à la sécheresse et qui accumule moins d'uréides que les cultivars sensibles (Serraj et Sinclair, 1996; Purcell et *al.*, 1998). Par conséquent, la plus grande capacité de fixation N_2 chez Jackson pendant la sécheresse peut être associée avec son aptitude à maintenir les uréides de la feuille, à une concentration moindre par rapport aux cultivars sensibles. Ce cultivar a été largement étudié pour comprendre les mécanismes impliqués lors d'un stress hydrique.

Serraj et *al.* (1999b) observent une baisse de l'ARA après une application de 10 mM d'allantoate aux racines de soja en culture hydroponique. Le cultivar de soja Jackson dont la fixation N_2 est tolérante à la sécheresse, accumule moins d'uréides dans les feuilles que le cultivar sensible KS4895 (Serraj et *al.*, 1997; Purcell et *al.*, 1997).

D'une population initiale de 3000 lignées de soja soumise au test RAU (Relative Abondance Uréides) pour estimer la fixation N_2 sous contrainte hydrique, huit ont été identifiées pour la tolérance de la fixation N_2 à la sécheresse grâce à la faible teneur en uréides de leurs feuilles (Sinclair et *al.* 2000). Ces géotypes sont actuellement étudiés comme modèles pour comprendre les mécanismes physiologiques de la régulation de la fixation N_2 . On sait cependant que la fixation N_2 est un processus complexe qui implique la formation du nodule, l'activité du nodule, le transport des produits entre les nodules et les feuilles et tous les processus biochimiques dans les feuilles. Il est donc possible qu'il y ait plusieurs mécanismes impliqués dans la régulation de la fixation N_2 de ces géotypes.

L'importance du manganèse dans le maintien de la fixation N_2 en réponse au déficit hydrique a été démontrée en serre (Purcell, 2000). Chez le cultivar de soja KS4895, la fixation N_2 sous stress hydrique modéré représente 30% par rapport au témoin sans apport de Mn et 111% avec apport de Mn au sol. Par contre chez Jackson, le taux de fixation N_2 pendant un stress modéré n'est pas affecté par le Mn alors que chez KS4895, cet ion provoque une diminution de la concentration en uréides dans les feuilles, accompagnée d'une augmentation de la fixation N_2 .

Les applications foliaires avec Mn-EDTA peuvent être plus efficaces que celles avec $MnSO_4$ pour augmenter la concentration du manganèse et diminuer le contenu en uréides dans les feuilles (Sinclair et *al.*, 2003).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la réponse de l'amidohydrolase aux différentes sources de manganèse et pour déterminer l'emplacement du pool du manganèse et des uréide dans la plante et comment un apport supplémentaire de manganèse et la sécheresse affectent ce pool.

Le stress hydrique modifie aussi la teneur en manganèse des feuilles. Il provoque une augmentation au premier jour de stress et une diminution au 14^{ème} jour de la concentration

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

en manganèse des feuilles (Purcell, 2000). Cette diminution serait due en partie à la remobilisation du manganèse des plus vieilles feuilles aux plus jeunes (Marschner, 1995).

Le mode d'action du manganèse dans le métabolisme des uréides et l'activité du nodule sont présentés dans le schéma 3.

En l'absence de manganèse suffisant dans les feuilles, l'activité de l'amidohydrolase de l'allantoate est diminuée, provoquant une accumulation des uréides dans les feuilles. Par feedback, ces uréides reviennent aux nodules dans la sève du phloème et leur accumulation provoque l'inhibition de la nitrogénase.

La présence d'une concentration suffisante en manganèse dans les feuilles peut accélérer le catabolisme des uréides et prévenir ainsi une inhibition par feedback de la nitrogénase dans les nodules.

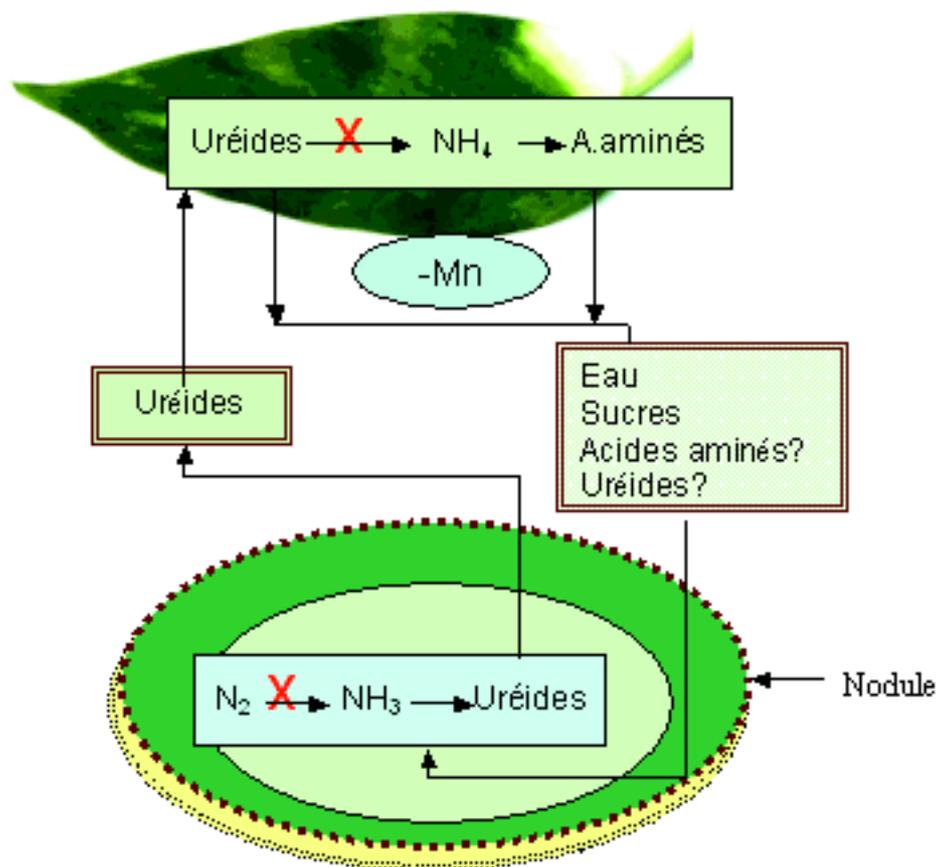


Schéma 3 Action du manganèse sur la dégradation des uréides

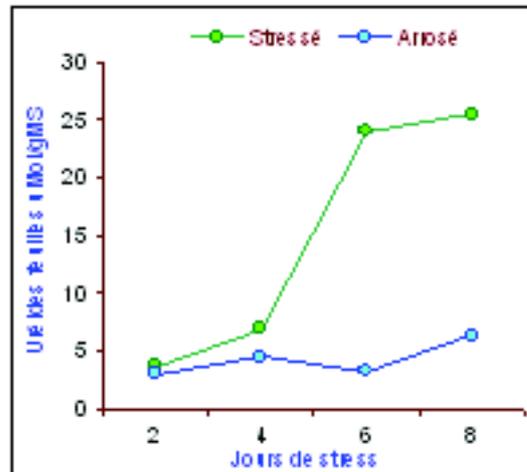


Figure 48 Effet du stress hydrique sur le contenu en uréides des feuilles au stade floraison chez des plantes stressées pendant 10 jours

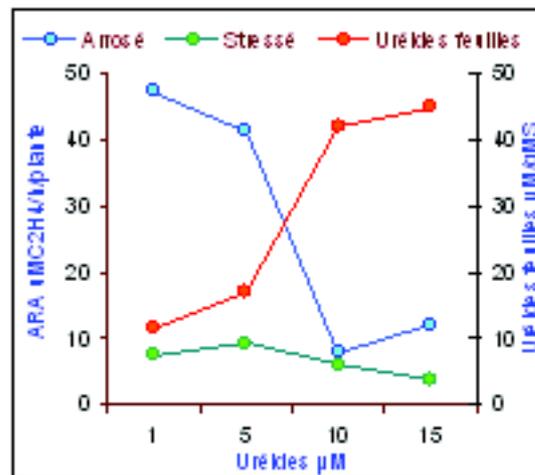


Figure 49 Effet des uréides sur l'ARA et l'accumulation des uréides des feuilles au stade floraison chez des plantes stressées pendant 10 jours

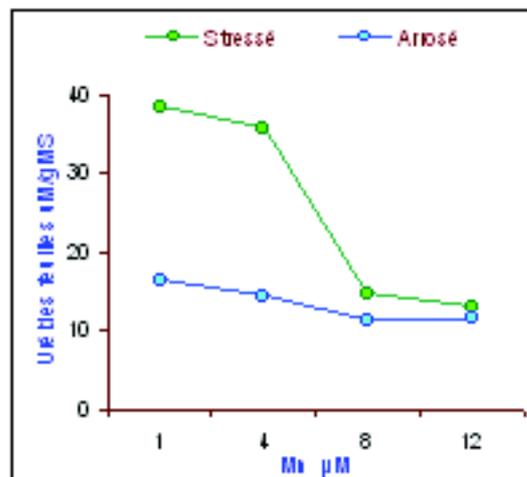


Figure 50 Effet du Mn sur le contenu en uréides des feuilles au stade floraison chez des plantes stressées pendant 10 jours

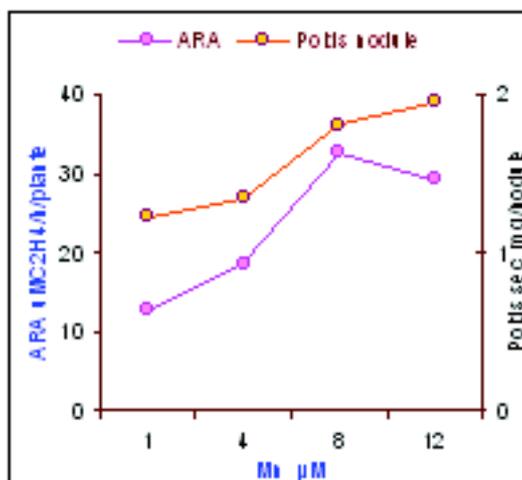


Figure 51 Effet du manganèse sur le poids sec d'un nodule et sur l'ARA au stade floraison chez des plantes stressées pendant 10 jours

II. Résultats

1. Effet du stress hydrique sur l'accumulation des uréides dans les feuilles

La figure 48 montre une accumulation très importante en uréides dans les feuilles de plantes soumises à une contrainte hydrique sévère. Les plantes bien arrosées gardent le même niveau en uréides pendant la contrainte hydrique. Cette accumulation serait due à une baisse de l'activité amidohydrolase responsable de la transformation des uréides en NH_3 (Winkler et al., 1987). L'effet du stress hydrique sur l'activité de cette enzyme est encore mal expliqué. Il a été observé chez le soja par Serraj et al. (1999b) qui ont trouvé une corrélation positive entre le stress hydrique et le taux d'accumulation des uréides dans les feuilles.

2. Effet des uréides sur l'activité réductrice d'acétylène

La figure 49 met en évidence une relation entre la fixation N_2 et le taux d'accumulation des uréides. L'augmentation de la concentration en uréides dans le milieu de culture se traduit par une forte accumulation de ce dernier dans les feuilles et une diminution brutale de l'ARA à partir de 5 mM. Serraj et al. (1999b) ont observé une baisse semblable de l'ARA après une application de 10 mM d'allantoate aux racines de soja cultivé en hydroponie. Néanmoins, le cultivar Jackson dont la fixation N_2 est tolérante à la sécheresse (Serraj et al., 1997; Purcell et al., 1997), accumule moins d'uréides dans les feuilles que le cultivar sensible KS4895 (Purcell et al., 2000).

3. Effet du manganèse sur le taux des uréides dans les feuilles

Le manganèse est un cofacteur de l'amidohydrolase qui catalyse la dégradation des uréides. Un apport supplémentaire de Mn permet une stimulation de l'activité de cette enzyme et par conséquent une accélération de la dégradation des uréides. La figure 50 montre bien l'action du Mn sur le contenu en uréides des feuilles. L'effet du Mn ne s'observe qu'à partir d'une concentration de 4mM de Mn qui provoque une chute brutale de la concentration en uréides des feuilles. Les mêmes observations ont été faites sur le

soja par Purcell et *al.* (2000) mais ils obtiennent une baisse du contenu en uréides à des concentrations plus faibles de Mn.

Il existe cependant, deux voies de dégradation des uréides, la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn.

Les géotypes de soja qui n'exigent pas le Mn pour la dégradation des uréides sont généralement tolérants à la sécheresse (Vadez et Sinclair, 2001). Ces résultats montrent la possibilité de sélectionner des géotypes qui possèdent une grande capacité de dégradation des uréides par la voie amidinohydrolase et qui présentent généralement une tolérance de la fixation N₂ au stress hydrique.

4. Effet du manganèse sur la masse du nodule et l'ARA

Le manganèse intervient indirectement sur la masse individuelle d'un nodule et l'ARA en agissant sur le taux d'accumulation des uréides. La figure 51 montre bien une augmentation de la masse d'un nodule et de l'ARA en fonction des concentrations croissantes de Mn dans le milieu de culture. Les concentrations supérieures à 8 µM ne semblent pas influencer sur l'ARA qui garde la même valeur. Ce résultat montre bien l'intérêt d'un apport supplémentaire de Mn pour améliorer la fixation N₂ sous contrainte hydrique.

III. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus confirment la complexité des modifications qui se déclenchent en réponse au déficit hydrique chez le pois chiche. Nous avons pu mettre en évidence des relations de cause à effet entre le stress hydrique, le Mn, les uréides et l'ARA. Notre but est de montrer qu'une dégradation plus forte des uréides pendant un stress hydrique peut se traduire par une diminution de leur concentration dans les feuilles. Cette diminution provoque l'interruption des signaux chimiques inhibiteurs entre les feuilles et les nodules et permet le maintien de la fixation N₂ (Serraj et *al.*, 1999a).

Nous avons pu confirmer chez le pois chiche que l'accumulation des uréides dans les feuilles, suite à un stress hydrique, se traduit par leur retour dans les nodules (feedback). Ce feedback provoque une accumulation des uréides, responsables de l'inhibition de l'activité nitrogénase dans les nodules. Cette hypothèse a été appuyée par plusieurs auteurs depuis les travaux de Winkler et *al.* en 1987 (Rice et *al.*, 1990 ; Lukaszewski, 1992 ; Graham et *al.*, 1995 ; de Silva et *al.*, 1996 ; Purcell, 2000 ; Sinclair et *al.*, 2003). Le dosage des uréides est utilisé actuellement comme test pour sélectionner les géotypes tolérants à la sécheresse. C'est une technique rapide qui permet le screening d'un grand nombre d'écotypes (Purcell, 2000).

Nous avons montré aussi le rôle du manganèse dans la dégradation des uréides. Le Mn est le cofacteur de l'amidohydrolase, enzyme responsable de la dégradation des uréides. Des apports croissants stimulent la dégradation des uréides et améliorent la fixation N₂ sous contrainte hydrique. Des résultats analogues ont été obtenus chez le soja par des apports racinaires ou des pulvérisations foliaires de Mn (Serraj et *al.*, 1997). Par contre, Vadez et Sinclair (2001) n'ont pas pu observer d'effet, après pulvérisation foliaire avec le Mn, sur l'accumulation des uréides. Ils ont attribué ceci à la présence de fortes concentrations en uréides qui masqueraient l'action du Mn. Les applications foliaires avec Mn-EDTA peuvent être plus efficaces que celles avec MnSO₄ à partir du milieu de culture, pour augmenter la

concentration du manganèse et diminuer le contenu en uréides dans les feuilles (Vadez et Sinclair, 2001)

Il existe cependant des contradictions quant à la réponse de l'amidohydrolase aux apports supplémentaires de Mn. Ces contradictions sont renforcées par l'existence de deux voies du catabolisme des uréides : la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn. Vadez et Sinclair (2001) ont pu montrer que les génotypes de soja qui dégradent les uréides par la voie amidinohydrolase sont généralement plus tolérants au stress hydrique.

L'application du manganèse chez le pois chiche a permis une augmentation de la masse du nodule individuel à partir d'une concentration de 4 mM. Cette augmentation s'accompagne d'un accroissement de l'ARA jusqu'à 8 mM de Mn. Purcell et *al.*, (1997) ont pu observer chez le cultivar jackson une augmentation de la taille du nodule 14 jours après application de 10 mM de Mn. La cause serait une faible concentration en uréides, ou un composé apparenté, transporté aux nodules dans le phloème. La diminution de la concentration en uréides dans la sève du phloème délivrée aux nodules, protège l'activité de la nitrogénase, assure la respiration des bactéroïdes et augmente le flux de l'eau et des photosynthétats; ce qui se traduit par une augmentation de la taille des nodules.

IV. Conclusion

Nos résultats montrent que le catabolisme des uréides dans les feuilles joue un rôle important dans la sensibilité de la fixation N₂ au stress hydrique. La voie amidinohydrolase de l'allantoate semble avantageuse et peut conférer au pois chiche une tolérance à la sécheresse, surtout dans les sols où la disponibilité du Mn est faible. Par contre les plantes qui utilisent la voie amidohydrolase ont besoin d'un apport supplémentaire de Mn pour accélérer la dégradation des uréides et préserver une activité normale de la fixation N₂.

Une autre approche de sélection serait d'évaluer les génotypes identifiés comme tolérants au manque du manganèse, et de rechercher ceux qui arrivent à maintenir de basses concentrations en uréides et dont la fixation N₂ est tolérante à la sécheresse sous conditions limitantes en manganèse.

Par conséquent, nous pouvons considérer que des apports supplémentaires de Mn (dans le sol ou par pulvérisation foliaire) de même que la sélection de cultivars qui accumulent moins d'uréides dans les feuilles, sont deux approches fiables pour améliorer la fixation N₂ sous contraintes hydriques.

Chapitre VIII Effet du stress thermique sur l'assimilation et la fixation de l'azote

I. Introduction

Les souches de rhizobium se comportent mieux quand elles se trouvent dans un environnement semblable à celui où elles ont été isolées (Zhang et *al.* 2002). Lipsanen et Lindstrom (1986) ont pu mettre en évidence une relation entre l'ARA, l'origine géographique

et la croissance à basse température. Prévost et *al.* (1987) ont trouvé que l'activité nitrégénase de cinq rhizobia arctiques était plus forte à basses températures que celle de souches isolées de milieu tempéré quand elles forment une symbiose avec le sainfoin. Hume et Shelp (1990) ont montré que l'inoculation du soja avec la souche 532C Hup⁻, mieux adaptée aux conditions froides, a permis une augmentation des rendements aux basses températures.

Le pois chiche est semé généralement au printemps. C'est une culture printanière qui exige des températures comprises entre 25 et 30°C au niveau de la rhizosphère pour exprimer l'optimum de son activité fixatrice N₂ (Zhang et *al.*, 1996). Aux températures inférieures, l'expression du gène nod est suboptimale et se traduit par un retard de la nodulation (Zhang et *al.*, 1996; Zhang et Smith, 1996).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la température sur l'activité de la nitrégénase responsable de la fixation de l'azote et de la 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).

Le pois chiche est cultivé traditionnellement au printemps mais la culture d'hiver procure de meilleurs rendements en Algérie. Ce décalage du cycle de la plante vers la période froide entraîne probablement des modifications plus ou moins importantes dans le métabolisme général de la plante et le métabolisme azoté en particulier.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la température sur la fixation et l'assimilation de l'azote, aux trois stades critiques du cycle de développement de la plante.

II. Résultats et discussion

1. Effet de la température d'incubation sur l'activité nitrate réductase

Dans cette étude, nous mettons en évidence l'importance de la température sur la vitesse de réaction de l'enzyme, car dans la méthode in-situ, l'ANR est mesurée par l'accumulation des nitrites dans une feuille entière après incubation à l'obscurité et en anoxie. La figure 52 montre bien une évolution très lente de l'ANR entre 0 et 10°C puis une augmentation rapide jusqu'à 25°C et ensuite une diminution assez brutale au delà de 30°C.

Comme pour toutes les réactions chimiques, la vitesse de réaction croît avec la température; mais pour une réaction enzymatique les phénomènes sont plus complexes car la température intervient aussi en favorisant la dégradation des protéines constitutives des enzymes. En effet, nous observons bien une chute de l'ANR à partir de 30°C qui peut traduire une destruction des structures de l'enzymes. Le pic d'activité est observé à 25°C. Cette température est d'ailleurs considérée comme l'optimum physiologique chez la plupart des végétaux. Des résultats analogues ont été obtenus par Hallark et Huffaker (1978) sur soja, par

Deroche et Babalar (1987) sur luzerne ainsi que par Macdowall et *al.* (1989) sur haricot, qui situent l'optimum de l'activité nitrate-réductase aux environs de 25°

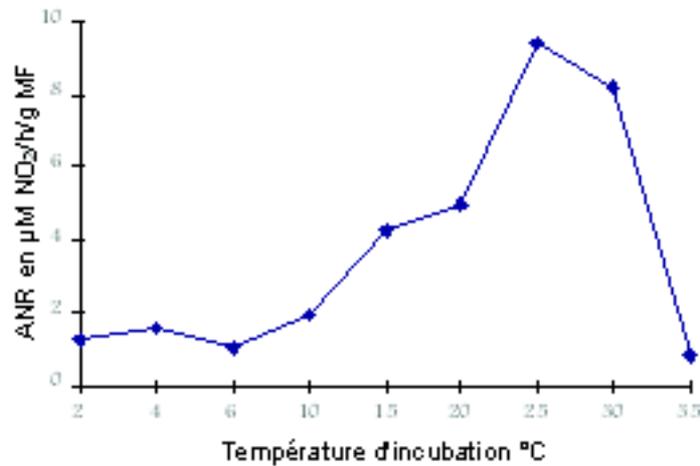


Figure 52 : Effet de la température d'incubation sur l'activité nitratre réductase

2. Effet de la température de traitement sur l'activité nitratre réductase

Dans cette étude l'ANR est révélée à 25°C sur des plantes ayant subies un traitement de 24 heures à différentes températures et après 14 heures d'obscurité. La figure 53 montre une forte activité chez les plantes ayant subies les basses températures. Nous constatons aussi une diminution de cette activité au fur et à mesure que la température de traitement augmente jusqu'à environ 15°C au delà de laquelle, elle reste faible ou pratiquement nulle.

L'activité de la nitratre réductase semble dépendre essentiellement de la quantité d'enzymes présente après le traitement à différentes températures. En effet, l'obscurité provoque une inactivation naturelle de cette enzyme alors que les basses températures la protègent contre cette action (Alofe et al. 1973). Ceci laisse présumer non seulement une protection de l'enzyme mais aussi une augmentation de sa synthèse en phase obscure (Deane-Drummond et al. 1980).

La même tendance est observée aux deux autres stades où nous constatons une corrélation négative entre l'ANR et les températures. On peut en outre s'attendre à ce qu'une plante qui a synthétisé et conservé une grande quantité d'enzyme aux basses températures, puisse réagir avec une forte activité enzymatique dès le rétablissement des températures modérées (environ 25°C) qui peut se produire pendant les heures chaudes de la journée en hiver.

3. Effet de la température d'incubation et de traitement sur l'activité nitratre réductase

La figure 54 met en relief l'action double de la température sur la quantité d'enzyme et sur la vitesse de réaction de cette même enzyme. Les basses températures préservent et augmentent la quantité d'enzyme mais diminuent leur vitesse de réaction pendant les mesures (Macduff et al., 1994). En effet, nous observons une activité très faible malgré la présence

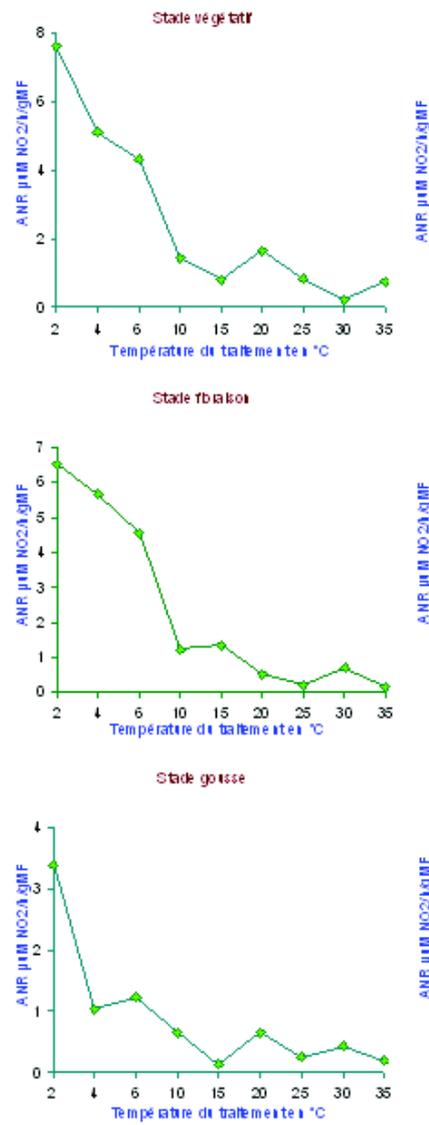


Figure 53 : Effet de la température sur l'ARN aux trois stades phénologiques

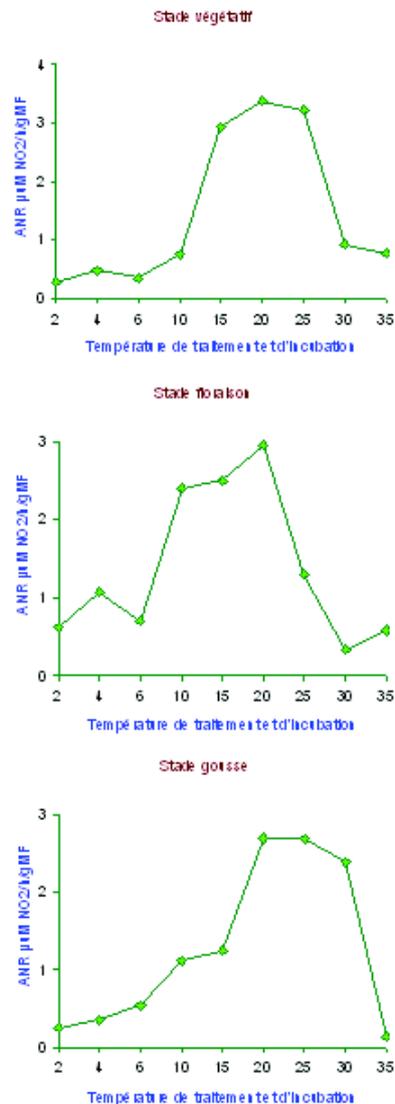


Figure 54 : Effet de la température de traitement et d'incubation sur l'ARN aux stades phénologiques

d'une forte quantité d'enzyme. Seule l'augmentation de la température d'incubation jusqu'à environ 25°C permet un accroissement de l'ANR qui traduit en fait le produit d'une quantité

d'enzyme décroissante avec la température(fig. 53) et d'une vitesse de réaction croissante avec la température (fig. 54). Cette tendance se retrouve aussi aux deux autres stades bien que les valeurs des activités obtenues soient plus faibles et correspondent en fait, à la régression de cette activité après le pic observé au stade végétatif.

4. Détermination d'un coefficient d'estimation de l'ANR en fonction de la température et de la quantité d'enzyme révélée à 25°C

Nous avons représenté dans la figure 55 l'évolution de l' ANR à différentes températures d'incubation en % de l'anr révélée à 25°C et l'évolution de l' ANR à différentes température

de traitement, révélée à ces mêmes températures et exprimée en % de l'anr révélée à 25°C, afin d'éliminer l'effet des quantités d'enzymes présentes.

Nous constatons dans la figure 43 que les courbes sont superposables, ce qui démontre que la température n'a pas d'effet sur la quantité d'enzyme présentes pouvant participer à la réaction. A partir de l'ensemble des points, nous pouvons obtenir une droite de régression, nous permettant de calculer les coefficients de passage de l'ANR révélée à 25°C à l'ANR in-situ mesurée à une température donnée. La droite de régression est composée de deux droites dont les pentes sont différentes: $Y_1 = 1.5 X + 5$ et $Y_2 = 3.9 X - 33$. L'existence de deux droites de pentes différentes et d'un point d'inflexion à 15°C rappelle la théorie de transition de phase des lipides membranaires qui pourraient jouer un rôle important dans les mesures in-situ que nous avons réalisées.

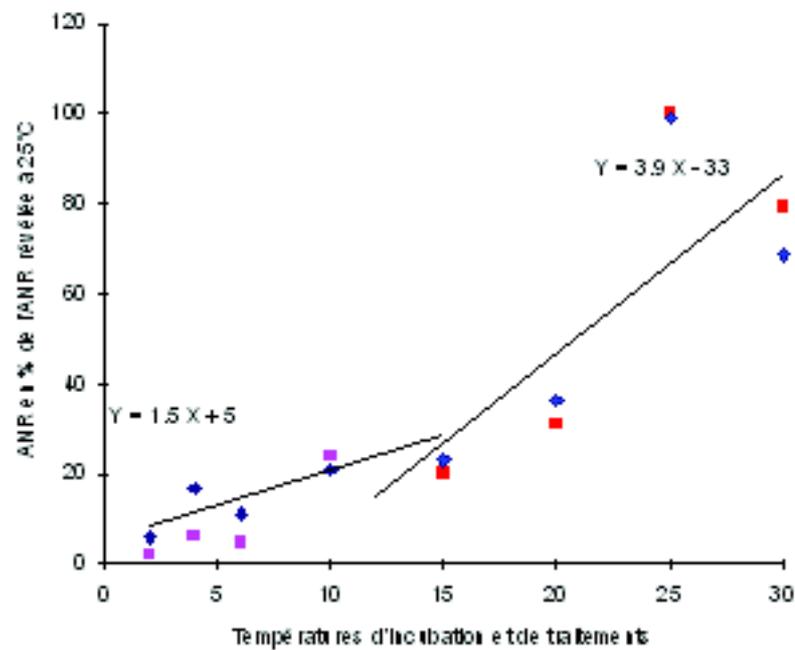


Figure 55 Droites de régression représentant les points de l'ANR en fonction de la température d'incubation et de l'anr en fonction de la température de traitement et exprimée en % de l'anr révélée à une température d'incubation de 25°C

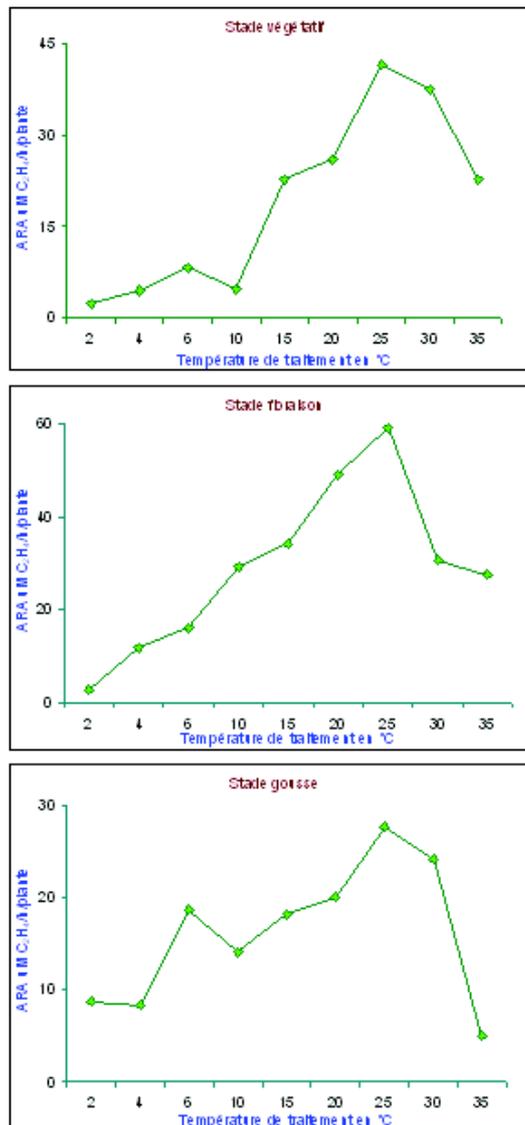


Figure 56 : Effet de la température de traitement sur l'ARA aux trois stades phénologiques

5. Effet de la température de traitement sur la fixation symbiotique de l'azote

La figure 56 qui nous montre l'évolution de l'ARA en fonction de la température de traitement appliquée aux trois stades phénologiques, laisse apparaître une activité assez faible aux basses températures (0 et 10 °C); mais dans tous les cas, nous remarquons un pic de forte activité aux environs de 25°C. Au delà de ce pic, nous constatons à tous les stades une chute brutale et importante. De même l'ARA est plus forte au stade floraison où la fixation atteint généralement son optimum d'activité chez la plupart des légumineuses cultivées et que ce caractère serait propre à l'espèce (Obaton ,1992).

Nous remarquons aussi que les plus fortes activités sont obtenues avec des températures comprises entre 20 et 30°C, ce qui représente une gamme relativement limitée par rapport aux variations qui peuvent se produire au cours d'une journée ou d'une période. Ceci montre manifestement une plus grande sensibilité de la fixation à la température.

La faible activité de la nitrogénase aux "basses" températures est attribuée soit à un effet direct sur la structure du nodule, soit à un effet indirect sur la photosynthèse. Selon Macdowall et *al.* (1989), les basses températures provoquent une modification de la membrane nodulaire entraînant ainsi une diminution de la diffusion d'oxygène nécessaire au fonctionnement des bactéroïdes. Par contre Tsonev et *al.* (2003) ont constaté une diminution de la photosynthèse aux basses températures qui se traduit par une chute de la fourniture du pouvoir réducteur nécessaire à la fixation.

De la même façon, les fortes températures (supérieures à 30°C) semblent affecter sévèrement le fonctionnement de la nitrogénase. Les causes avancées pour expliquer ce phénomène, sont:

-La réduction de la translocation des produits de la photosynthèse nécessaires à l'activité de cette enzyme (Mardowitch, et *al.*, 1986 ; McDonald et Paulsen, 1997). Par contre Lynch et Smith (1993), trouvent que la fixation peut être limitée par l'utilisation du carbone dans le nodule et non pas par la disponibilité des photosynthétats

-L' augmentation de la production d'hydrogène responsable de la baisse de l'activité nitrogénase (Bertelsen, 1985)

-Le détournement du pouvoir réducteur au détriment de la nitrogénase (Hungria et Franco, 1993)

6. Effet de la température sur différentes souches de rhizobium et son impact sur la nodulation et la fixation de l'azote

Les deux températures choisies sont considérées comme températures critiques du sol pour évaluer et sélectionner les souches adaptées aux basses températures (Zhang et *al.* 2002). Nos résultats indiquent que seules quelques souches (IC2018, C2248, C2243, C1422, C1453, C0712) ont pu se développer normalement à 15°C dans les boîtes de pétri et croître à des taux mesurables en culture liquide. Les autres souches se sont distinguées par un développement faible ou nul. Par contre toutes les souches se sont bien développer à 25°C (tab. 5). Ce résultat indique que les souches qui sont capables de se développer à basse température seraient susceptibles de former avec le pois chiche une association tolérante aux basses températures de plein champ.

EFFET DU STRESS HYDRIQUE ET THERMIQUE SUR LA NUTRITION AZOTEE CHEZ LE POIS CHICHE (*Cicer arietinum*)

Souches rhizobium	Croissance relative **	
	à 15°C	à 25°C
IC2018	0,023a *	0,035
C2251		0,031
C2260		0,041
C2248	0,021a *	0,036
C2234		0,037
C2243	0,024a *	0,041
C2223		0,040
C1412		0,034
C1423		0,035
C1443		0,039
C1422	0,034b *	0,038
C1434		0,036
C1453	0,032b *	0,039
C0723		0,035
C0731		0,039
C0743		0,036
C0712	0,015c *	0,036
C0732		0,037
C0734		0,035

Tableau 5 Effet de la température sur la croissance des souches en culture liquide

* Test de Newman et Keuls 0.05

**Croissance relative = $\ln(\text{DO}_{620}) \text{ jour } 7 - \ln(\text{DO}_{620}) \text{ jour } 1 / 7 \text{ jours}$.

La sélection de souches bactériennes adaptées aux conditions locales devrait minimiser les contraintes du milieu sur la nodulation et la fixation N₂ des légumineuses (Chinthapali et *al.*, 2003).

La limite inférieure de la température qui affecte la fixation N₂ est en grande partie due à la sensibilité de la plante mais celle-ci peut être améliorée par le rhizobium (Lynch et Smith, 1993). La nodulation et la fixation N₂ à une température donnée varient avec la souche bactérienne (Dart et *al.*, 1976; Lindemann et Ham, 1979). Plusieurs études ont essayé de corrélérer l'environnement d'origine et la croissance des souches des rhizobia avec leur efficacité symbiotique sous stress thermique. Zhang et *al.* (1996) ont trouvé que la performance des souches à basses températures est influencée par leur origine

géographique. Dans les régions froides, les basses températures du sol sont l'un des principaux facteurs limitants de la fixation N₂ (Zhang et Smith, 1996).

Parmi les souches qui sont capables de bien se développer à une température relativement basse, nous avons retenu les deux meilleures souches (C1422, C1453) et une souche contrastée(C0712) pour inoculer le pois chiche (tab. 2).

L'inoculation avec les souches C1422 et C1453 améliore le rendement en grain par rapport à la souche C0712 et procure aussi une augmentation de la teneur protéine du grain(tab. 6).

L'analyse des composantes du rendement, nous a permis de constater que le nombre de gousses et le nombre de graines ont augmentés plus avec C1422 et C1453 que C0712. Pour le poids des 100 graines, il n'y avait pas de différences parmi les souches étudiées. Donc, l'augmentation du rendement en grain est due à une combinaison du nombre de gousses et du nombre de graines. Généralement le nombre de gousses et le nombre de graines sont déterminés peu après la floraison, alors que le poids de 100 graines est déterminé pendant le stade remplissage du grain. Par conséquent, ces données suggèrent que l'avantage procuré par l'inoculation avec les deux souches C1422 et C1453 est en rapport avec le démarrage précoce de la fixation N₂. Cette hypothèse est appuyée par la surface des feuilles, le poids des graines et le taux de protéines totales qui sont plus importants chez C1422 et C1453 que chez les plantes inoculées avec C0712 (fig. 42).

Il paraît vraisemblablement que la meilleure performance des plantes inoculées avec ces souches soit due à leur plus grande faculté d'adaptation pour former une symbiose fixatrice d'azote sous contrainte thermique. La raison probable est que ces deux souches se développent et forment une symbiose, sous basses températures, plus rapidement que la souche C0712. Prévost et al. (1987) ont rapporté que l'activité nitrogénase des rhizobia isolés de régions froides était plus forte à basse température que celle des régions chaudes. Zhang et al. (2002) ont aussi trouvé qu'une souche isolée d'un environnement froid nodule mieux sous basses températures alors qu'une souche isolée d'un environnement plus chaud n'a pas cette capacité.

Les bons rendements obtenus avec ces deux souches traduiraient en fait une amélioration de la nodulation, de la formation des bactéroïdes et de l'activité nitrogénase, confirmée par une augmentation du contenu en protéines du grain (tab. 6).

Tableau 6 Effet des souches sur les composantes du rendement et la teneur en protéine des graines

	Nombre de Gousses/plante	Nombre de graines/plante	Poids de 100 graines	Protéine grain % de MS	Rendement grain qx/ha
C1422	45.25	44.52	31.54	23,12	38.14
C1453	40.32	38.21	32.24	20,54	37.54
C0712	34.47	30.65	30.14	17,34	29.78
ppds 0.05	5.54	6.32	5.65	4.05	6.35

III. Conclusion

La température agit différemment en fonction de son intensité et du stade phénologique où elle est appliquée. Elle modifie le métabolisme général de la plante et dans notre cas, la nutrition azotée du pois chiche.

Les basses températures comprises entre 2 et 10°C limitent fortement le fonctionnement de la nitrogénase qui développe une activité assez réduite ne représentant que 10 à 20 % de sa capacité optimale. Cette tendance est observée aux trois stades phénologiques.

Les fortes températures (au delà de 30°C) affectent de même la fixation de façon brutale et à partir de 35°C, il est probable d'atteindre une inhibition complète de cette enzyme. L'optimum de cette activité se produit sur une gamme de températures assez réduite comprise entre 20 et 30 °C.

Au niveau de l'assimilation de l'azote combiné du sol, les basses températures ont un effet favorable sur la nitrate réductase en protégeant cette enzyme contre sa dégradation naturelle pendant la phase obscure et en favorisant même sa synthèse. C'est un avantage qui conforte le décalage du semis de printemps vers l'hiver souvent recommandé pour améliorer les rendements du pois chiche. Les nuits fraîches suivies par des journées ensoleillées seraient très bénéfiques pour produire des grains de pois chiche riches en protéines. Les fortes températures par contre, dépriment fortement l'anr en participant à la dégradation des protéines structurales de cette enzyme.

La comparaison des deux activités ARA et ANR au cours des trois stades phénologiques laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces deux enzymes qui participeraient à un équilibre de la nutrition azotée en réponse à la température. En semis d'hiver le pois chiche peut donc assurer sa nutrition azotée par l'assimilation des nitrates du sol pendant la saison froide et par la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au printemps. Ce relais entre les deux voies de la nutrition azotée constitue à l'heure actuelle une voie de recherche dont le but est de permettre aux légumineuses de satisfaire leur besoin en azote, sous contrainte thermique au cours du cycle de la plante(Ounane, 2001). Les basses températures agissent aussi sur le microsymbiote. Il existe une variabilité dans la réponse des souches au stress thermique. Certaines d'entre elles sont capables de mieux tolérer ce stress et de former une symbiose à même d'assurer une production appréciable sous contrainte thermique.

Discussion générale et synthèse

La nutrition azotée a été abordée par l'étude de quelques enzymes du métabolisme de l'azote. Cette démarche devait nous permettre de comprendre les phénomènes globaux à travers l'étude de quelques enzymes clés, représentatives du métabolisme azoté. La nitrate réductase est la première enzyme de l'incorporation du nitrate dans ce métabolisme. Elle est aussi l'étape limitante par son K_m et la durée de sa demi-vie. La glutamine synthétase et la glutamate déshydrogénase catalysent les deux voies de l'incorporation du NH_4 dans les acides aminés. La nitrogénase est la seule enzyme qui réalise la fixation de l'azote atmosphérique en catalysant la réduction de N_2 .

La distribution de ces enzymes dans la plante varie en fonction de l'âge et de la position des organes.

Nous avons pu montrer que les différents étages foliaires de la plante à un stade déterminé présentent une analogie avec le développement d'une feuille. Le sommet représente les organes en développement, le milieu les feuilles en pleine maturité et la base de la plante les feuilles sénescents. Chaque étage foliaire peut donc être associé à une phase de l'ontogénie foliaire.

Les fortes teneurs en nitrate et en azote total ainsi que les pics d'activité nitrate réductase sont caractéristiques du début de la vie de la feuille ou des feuilles du sommet de la plante. Lorsque la feuille atteint sa maturité, l'activité GS et la teneur en chlorophylle sont maximales. Après la maturité de la feuille, nous observons une très faible activité NR ainsi qu'une très faible teneur en nitrate et azote total, une diminution de l'activité GS et de la teneur en chlorophylle et une très forte activité GDH.

L'activité GS évolue de la même façon que la matière fraîche et la teneur en chlorophylle. Elle est considérée comme une indicatrice de la maturité de la feuille. Nous avons utilisé cette activité enzymatique comme dénominateur commun des activités NR et NADH-GDH. Les rapports de l'activité NR/GS et de l'activité NADH-GDH/GS en fonction des étages foliaires à un stade donné du développement évoluent en sens contraire au début du remplissage des gousses. Ainsi, à chaque stade physiologique de la feuille peut être associé un paramètre métabolique : un rapport NR/GS entre 0,03 et 0,1 caractérise les organes en croissance exponentielle. Un rapport élevé NADH-GDH/GS entre 3 et 10 marque les organes sénescents, alors que les organes matures ou jeunes ont un rapport voisin de l'unité.

Le nitrate agit directement ou indirectement sur toutes les enzymes que nous avons étudiées. Il participe à la croissance et au développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est mobilisé surtout pour la production des gousses. Les plantes nodulées produisent proportionnellement davantage de gousses que les plantes non nodulées tandis que les plantes alimentées avec de l'azote minéral ont tendance à produire plus de matière verte.

La diminution de l'activité glutamine synthétase chez les plantes nodulées privées d'azote minéral peut être attribuée (comme pour l'activité nitrate réductase) à une diminution de l'absorption et/ou du transport du nitrate ainsi qu'à une diminution de la croissance de la partie aérienne au détriment du bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

Les plantes nodulées recevant de l'azote minéral ont une activité GS semblable à celles des plantes non nodulées et de ce fait, nous pouvons penser que la nodulation n'a pas un effet dépressif direct sur l'activité GS.

L'activité GDH augmente régulièrement et atteint son activité maximale chez la feuille sénescence. L'augmentation de l'activité GDH pourrait donc être une caractéristique du vieillissement foliaire.

L'effet positif de la privation d'azote minéral sur l'activité GDH ne peut être associé qu'à une accélération de la sénescence, provoquée par une mauvaise nutrition azotée.

Si l'on compare les résultats des activités GS et GDH des feuilles de plantes soumises aux différents traitements, il est possible de tirer une conclusion qui confirme certaines observations physiologiques et souligne l'intérêt de ces activités enzymatiques comme marqueurs du statut azoté de la plante. L'activité glutamine synthétase est bien liée à la croissance de la feuille et à l'alimentation nitrique, au moins partiellement.

En général, les activités nitrate réductase et nitrogénase paraissent antagonistes et leur pic maximum se succède au cours du cycle de développement de la plante. Par contre, nos résultats obtenus en serre montrent que les activités nitrate réductase et nitrogénase augmentent parallèlement à la croissance des plantes jusqu'à la fin de la floraison puis chutent au moment du remplissage des gousses. Des résultats semblables ont été obtenus chez le soja en assurant un apport régulier de nitrate au cours du cycle de développement.

La disparité de ces observations doit être attribuée à la complexité des facteurs qui régulent ces deux enzymes et qui fluctuent au cours de la vie de l'association symbiotique. La présence simultanée de ces deux activités suggère que dans certaines conditions lorsque l'énergie disponible est suffisante et l'apport de nitrate continu, les activités nitrate réductase et nitrogénase ne seraient pas antagonistes.

Le processus d'assimilation du nitrate dans les molécules organiques est exigeant en énergie, pouvoir réducteur et substrats carbonés. Il concurrence le fonctionnement des nodosités pour la fourniture en photosynthétats. L'inhibition de la fixation d'azote observée dès que l'alimentation nitrique est importante peut s'expliquer par un détournement des photosynthétats utilisés pour la réduction et l'assimilation du nitrate au détriment de l'approvisionnement nodulaire.

Sur un plan agronomique, les résultats obtenus en serre montrent que les deux voies d'assimilation de l'azote sont nécessaires pour obtenir un développement maximum en terme de matière sèche, d'azote total accumulé ou de production de graines. L'azote minéral a pour effet de stimuler la croissance et le développement de l'appareil végétatif tandis que l'azote fixé est surtout destiné à la production de gousses.

Le nitrate réduit la croissance des racines, la nodulation et la fixation. De même la nodulation peut limiter l'assimilation du nitrate par la feuille.

Nos résultats confirment la complexité des mécanismes déclenchés par la présence du nitrate chez les légumineuses. Des données contradictoires viennent encore compliquer la compréhension de ce phénomène. Nous avons pu cependant mettre en évidence le rôle majeur du nitrate dans la fixation symbiotique de l'azote. Sa double action se traduit par une stimulation aux faibles concentrations (1 à 3 mM NO_3) et une inhibition aux fortes concentrations (4 à 9 mM NO_3). Ce mode d'action s'observe dans la plupart des paramètres que nous avons étudiés notamment la nodulation, l'ARA et l'ASS. Nous avons pu montrer aussi l'existence d'une limite de concentrations aux environs de 3 mM qui sépare l'action stimulante et l'action inhibitrice du nitrate. Cette limite constitue un enjeu majeur pour la

fertilisation des cultures dans une optique de préservation de l'environnement. Tous les apports d'azote au delà de cette limite nuisent à la fixation N_2 et polluent le milieu. Un nouveau concept est entrain de se développer pour éviter les pertes d'azote dans la nature. C'est le « pilotage » de la fertilisation azotée dans les systèmes de culture et qui fait appel à une agriculture de précision propre et durable.

Les mécanismes invoqués pour expliquer l'action du nitrate sur la fixation N_2 sont nombreux du fait de la complexité des interrelations qui existent entre l'activité du nodule et d'autres processus biochimiques de la plante. Actuellement, la majorité des chercheurs sont d'accord sur le fait que le nitrate serait responsable de l'augmentation de la résistance de la barrière de diffusion à l'oxygène nécessaire à la respiration des bactéroïdes. On invoque aussi la présence d'une nitrate-reductase dans les nodules responsable de la réduction dissimilatrice du nitrate. L'activité de cette enzyme garantit un enlèvement rapide du nitrate dans la zone d'infection du nodule.

Il existe cependant une grande variabilité chez les légumineuses pour leur tolérance au nitrate. Quelques variétés de soja sont capables de fixer l'azote en dépit de la présence de concentrations relativement fortes de nitrate.

La recherche de couples variété-souche capables de fixer l'azote dans des sols riches en nitrates constitue un enjeu important pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche.

D'autres contraintes peuvent affecter les activités enzymatiques notamment le déficit hydrique qui peut affaiblir les fonctions vitales ou stimuler les réactions adaptatives qui permettent aux plantes de subsister pendant un stress prolongé.

Nous avons pu montrer que le stress hydrique provoque une diminution des deux activités enzymatiques et du poids des nodules. La réduction de l'activité nitrogénase dans les plantes stressées a déjà été rapportée chez plusieurs légumineuses. Pour la fixation, la diminution est plus importante au stade végétatif qui semble représenter une phase très sensible du cycle de la plante. Cette sensibilité se manifeste d'abord par une perte rapide de la réserve en eau des nodules et une baisse concomitante de la fixation.

La relation entre l'état hydrique des nodules et la fixation a été démontrée à plusieurs reprises, sans pour autant constituer la principale cause de la baisse de l'A.R.A. En effet, d'autres relations ont été mises en évidence, notamment entre la photosynthèse et la fixation.

L'application d'une contrainte progressive nous a permis de constater que le stress modéré affectait moins l'A.R.A. pendant la floraison et la formation des gousses. Nous avons pu expliquer ce fait par la présence en plus grand nombre, de gros nodules capables de développer une meilleure résistance à la déshydratation et de conserver une bonne activité nitrogénase. Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces notamment chez le soja et peut permettre une nouvelle approche pour étudier les mécanismes d'adaptation à la sécheresse.

L'assimilation des nitrates est moins déprimée par le stress hydrique, tout au moins pour les contraintes faibles ou modérées. Par contre, les contraintes sévères provoquent d'abord une légère augmentation de l'A.N.R. suivie par une chute brutale.

La levée de la contrainte se traduit par une reprise de l'activité nitrogénase et nitrate réductase quand le stress est faible ou modéré alors que le stress sévère provoque une inhibition irréversible de ces deux activités.

La comparaison des deux activités sous contrainte hydrique laisse entrevoir une sensibilité plus grande de la fixation par rapport à l'assimilation et une compensation qui s'établit pour assurer une alimentation régulière en azote de la plante. La plante réajuste sa nutrition par une augmentation de l'A.N.R. au moment où la fixation diminue sous l'effet du stress hydrique.

Les bases physiologiques pour la tolérance au stress hydrique ne sont pas bien connues chez la symbiose légumineuse-Rhizobium. Le rôle que peut jouer la souche dans cette association pour améliorer la fixation en conditions de stress hydrique est primordial dans notre région. Nous avons pu montrer la supériorité de la souche IC2018 en conditions normales et de la souche C2260 pendant une contrainte hydrique en ce qui concerne la fixation de l'azote. Cet avantage est mieux exprimé pendant le stade floraison où le pois chiche fixe le maximum d'azote grâce au pic d'activité de la nitrogénase.

L'existence d'une forte corrélation entre la fixation de l'azote et le contenu en eau du nodule montre l'importance de la relation qui peut exister entre cet organe et la diffusion de l'eau et de l'air nécessaire au bon fonctionnement des bactéroïdes.

Nous avons aussi mis en évidence la supériorité de la souche C2260 pour la production de matière sèche des feuilles, de tiges et de gousses pendant une contrainte hydrique. Ces paramètres contribuent à la formation du rendement et par conséquent conditionnent la productivité du pois chiche. De ce fait, nous pouvons penser que cette souche peut présenter un intérêt pour inoculer le pois chiche susceptible d'être cultivé dans les régions où les contraintes hydriques constituent un facteur limitant de la production végétale

Dans la symbiose, la plante hôte contrôlerait les principaux mécanismes impliqués dans la tolérance des légumineuses à la sécheresse. Les résultats obtenus en serre et au champ ont montré un effet inhibiteur important de la contrainte hydrique sur la nodulation. Dans tous les cas, le nombre et le poids sec des nodules, par rapport au témoin arrosé, ont diminué sous l'effet du stress hydrique. De même, nous avons observé une variabilité dans la réponse des cultivars au stress hydrique. Dans les deux essais, en serre et au champ, le cultivar FLIP87-7C se distingue par sa capacité à conserver le maximum de matière sèche nodulaire sous contrainte hydrique.

Le changement dans le poids sec moyen d'un nodule individuel peut constituer une indication intéressante qui peut être corrélée à la capacité de la plante à maintenir une bonne fixation de l'azote sous contrainte hydrique. Pour beaucoup de cultivars, y compris ILC, ce paramètre était le même ou légèrement plus petit que celui des plantes témoins bien arrosées

La distribution des tailles de nodules pour ILC a montré une forte baisse dans le nombre de grands nodules et une augmentation dans le nombre de petits nodules. En revanche, FLIP présente une augmentation dans le poids sec d'un nodule par rapport à celui du témoin bien arrosé et maintient une distribution assez constante du nombre de nodules de la classe 3 et 4. Il semblerait que la réduction du nombre de nodules soit compensée par l'apparition de nodules plus grands pouvant bénéficier d'une plus grande provision en hydrates de carbone capable de fournir de l'énergie et des squelettes carbonés nécessaires à la fixation de l'azote. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs auteurs qui ont montré une plus grande accumulation de la biomasse et allocation de photosynthétats aux nodules pendant un déficit hydrique. De ce fait, la variation dans la sensibilité de la fixation à la sécheresse peut être associée à la réponse du nodule dans sa croissance sous contrainte hydrique.

Les essais en serre ont montré une grande variabilité parmi les cultivars de pois chiche, dans la sensibilité de la nodulation au stress hydrique. Ces observations ont été confirmées

au champ et sont en accord avec les observations sur la tolérance à la sécheresse signalées par plusieurs auteurs. Ils montrent l'intérêt de certains cultivars qui peuvent maintenir et garder le maximum de matière sèche nodulaire lors d'un déficit hydrique. La présence de gros nodules constitue aussi un mécanisme d'adaptation pouvant permettre à ces cultivars de mieux surmonter les contraintes hydriques.

Les résultats que nous avons obtenus confirment la complexité des modifications qui se déclenchent en réponse au déficit hydrique chez le pois chiche. Nous avons pu mettre en évidence des relations de cause à effet entre le stress hydrique, le manganèse, les uréides et l'ARA. Une dégradation plus forte des uréides pendant un stress hydrique peut se traduire par une diminution de leur concentration dans les feuilles. Cette diminution provoque l'interruption des signaux chimiques inhibiteurs entre les feuilles et les nodules et permet le maintien de la fixation N_2 .

Nous avons pu confirmer chez le pois chiche que l'accumulation des uréides dans les feuilles, suite à un stress hydrique, se traduit par leur retour dans les nodules (feedback). Ce feedback provoque une accumulation des uréides, responsable de l'inhibition de l'activité nitrogénase dans les nodules. Le dosage des uréides est utilisé actuellement comme test pour sélectionner les géotypes tolérants à la sécheresse. C'est une technique rapide qui permet le screening d'un grand nombre d'écotypes.

Nous avons montré aussi le rôle du manganèse dans la dégradation des uréides. Le Mn est le cofacteur de l'amidohydrolase, enzyme responsable de la dégradation des uréides. Des apports croissants stimulent la dégradation des uréides et améliorent la fixation N_2 sous contrainte hydrique. Les applications foliaires avec Mn-EDTA peuvent être plus efficace que celles avec le $MnSO_4$ à partir du milieu de culture, pour augmenter la concentration du manganèse et diminuer le contenu en uréides dans les feuilles.

Il existe cependant, des contradictions quant à la réponse de l'amidohydrolase aux apports supplémentaires de Mn. Ces contradictions sont renforcées par l'existence de deux voies du catabolisme des uréides : la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn. Les géotypes de soja qui catalysent les uréides par la voie amidinohydrolase sont généralement plus tolérants au stress hydrique.

L'application du manganèse chez le pois chiche a permis une augmentation de la masse du nodule individuel à partir de 4 mM. Cette augmentation s'accompagne d'un accroissement de l'ARA jusqu'à 8 mM de Mn. La cause serait une faible concentration en uréides des feuilles, transporté aux nodules dans le phloème. La diminution de la concentration en uréides dans la sève du phloème délivrée aux nodules, protège l'activité de la nitrogénase, assure la respiration des batéroïdes et augmente le flux de l'eau et des photosynthétats; ce qui se traduit par une stimulation de la croissance et une augmentation de la taille des nodules.

La température agit différemment en fonction de son intensité et du stade phénologique où elle est appliquée. Elle modifie le métabolisme général de la plante et la nutrition azotée en particulier. Les hautes températures sont généralement associées au stress hydrique.

Les basses températures comprises entre 2 et 10°C limitent fortement le fonctionnement de la nitrogénase qui développe une activité assez réduite ne représentant que 10 à 20 % de sa capacité optimale. Cette tendance est observée aux trois stades phénologiques.

Les fortes températures (au delà de 30°C) affectent de même la fixation de façon brutale et à partir de 35°C, il est probable d'atteindre une inhibition complète de cette enzyme. L'optimum de cette activité se produit sur une gamme de températures assez réduite comprise entre 20 et 30 °C.

Par contre, les basses températures ont un effet favorable sur la nitrate réductase en protégeant cette enzyme contre sa dégradation naturelle pendant la phase obscure et en favorisant même sa synthèse. C'est un avantage qui conforte le décalage du semis de printemps vers l'hiver, souvent recommandé pour améliorer les rendements du pois chiche. Les nuits fraîches suivies par des journées ensoleillées seraient très bénéfiques pour produire des graines de pois chiche riches en protéines. Les fortes températures par contre, dépriment fortement l'anr en participant à la dégradation des protéines structurales de cette enzyme.

La comparaison des deux activités ARA et ANR au cours des trois stades phénologiques laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces deux enzymes qui participeraient à un équilibre de la nutrition azotée en réponse à la température. En semis d'hiver, le pois chiche peut donc assurer sa nutrition azotée par l'assimilation des nitrates du sol pendant la saison froide et par la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au printemps. Ce relais entre les deux voies de la nutrition azotée constitue à l'heure actuelle une voie de recherche dans le but est de permettre aux légumineuses de satisfaire leur besoin en azote, sous contrainte thermique au cours du cycle de la plante. Les basses températures agissent aussi sur le microsymbiote. Il existe une variabilité dans la réponse des souches au stress thermique. Certaines d'entre elles sont capables de mieux tolérer ce stress et de former une symbiose efficace sous contrainte thermique.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons essayé de comprendre les modifications du métabolisme azoté qui surviennent dans la plante chez le pois chiche cultivé sous contraintes du milieu. L'approche que nous avons utilisée nous a permis d'étudier l'effet du statut azoté de la plante sur les enzymes de la fixation de N_2 et de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium. Elle nous a permis aussi de définir la signification de l'activité de ces enzymes considérées comme des marqueurs du métabolisme azoté.

Pour cette étude, nous avons retenu la nitrogénase, responsable de la réduction de l'azote atmosphérique, la nitrate réductase, pour l'assimilation du nitrate, les activités glutamine synthétase et glutamate déshydrogénase, enzymes d'assimilation de l'ammonium.

Nous avons suivi la distribution de ces activités enzymatiques, en fonction de l'âge, du type d'alimentation azotée, et de la nature des contraintes du milieu. Elle varie en fonction de l'âge et de la position des organes. Les étages foliaires de la plante, présentent une analogie avec le développement d'une feuille. Le sommet représente les organes en développement, le milieu les feuilles en pleine maturité et la base de la plante les feuilles sénescentes. Chaque étage foliaire peut donc être associé à une phase de l'ontogénie foliaire.

L'activité GS évolue de la même façon que la matière fraîche et la chlorophylle et peut être considérée comme une caractéristique de la maturité de la feuille.

Les rapports des activités NR/GS et NADH-GDH/GS varient considérablement, en fonction de la position de la feuille à un stade donné. Pour chaque étage foliaire (ou stade physiologique), on peut donc associer un paramètre métabolique: une haute activité NR (ou du rapport NR/GS) pendant la phase de croissance et une haute activité NADH-GDH (ou du rapport NADH-GDH/GS) pendant la phase de sénescence. Ces rapports montrent aussi que :

- Dans la jeune feuille l'activité glutamine synthétase est 10 fois plus élevée que l'activité nitrate réductase et 100 fois plus élevée dans la feuille âgée. Ceci confirme le caractère limitant de la première étape de réduction de l'azote nitrique par rapport à l'assimilation de l'ammonium mais surtout, que la capacité à utiliser cet ammonium s'est accrue d'un facteur 10 avec l'âge par rapport aux besoins strictement issus du nitrate.

- Dans la jeune feuille l'activité glutamine synthétase est du même ordre de grandeur que celle de la glutamate déshydrogénase, qui dans la feuille âgée, est par contre 10 fois plus importante que la GS pour assurer l'assimilation de l'ammonium.

La complexité des mécanismes déclenchés par la présence du nitrate chez les légumineuses, ainsi que les données contradictoires qui s'y rapportent, compliquent davantage la compréhension de ce phénomène. Nous avons montré le rôle majeur du nitrate dans la fixation symbiotique de l'azote. Son action bénéfique qui se traduit par une stimulation de la fixation N_2 aux faibles concentrations (1 à 3 mM NO_3) alors que les fortes concentrations (4 à 9 mM NO_3) provoque une inhibition de cette activité. Ce mode d'action s'observe dans la plupart des paramètres que nous avons étudiés notamment la nodulation, l'ARA et l'ASS. De ce fait, la limite entre les deux concentrations (3mM) qui sépare l'action

stimulante et l'action inhibitrice du nitrate constitue un enjeu majeur pour la fertilisation des cultures dans une optique de préservation de l'environnement. Au delà de cette limite, les apports d'azote nuisent à la fixation N₂ et polluent le milieu.

Les mécanismes invoqués pour expliquer l'action du nitrate sur la fixation N₂ sont nombreux du fait de la complexité des interrelations qui existent entre l'activité du nodule et d'autres processus biochimiques de la plante. Actuellement, la majorité des chercheurs sont d'accord sur le fait que le nitrate serait responsable de l'augmentation de la résistance de la " barrière de diffusion" à l'oxygène nécessaire à la respiration des bactéroïdes dans le nodule.

Les symbioses capables de fixer l'azote dans des sols riches en nitrates constituent un enjeu important pour améliorer la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche.

D'autres contraintes peuvent affecter les activités enzymatiques notamment le déficit hydrique qui peut affaiblir les fonctions vitales ou stimuler les réactions adaptatives qui permettent aux plantes de subsister pendant un stress prolongé.

Les contraintes hydriques modérées affectent moins l'ARA pendant la floraison et la formation des gousses. Nous avons pu expliquer ce fait par la présence en plus grand nombre, de gros nodules capables de développer une meilleure résistance à la déshydratation et de conserver une bonne activité nitrogénase. Ce phénomène a été observé chez plusieurs espèces notamment chez le soja et constitue une nouvelle approche pour étudier les mécanismes d'adaptation à la sécheresse.

L'assimilation des nitrates est moins déprimée que la fixation N₂ par le stress hydrique, tout au moins pour les contraintes faibles ou modérées. Par contre, les contraintes sévères provoquent d'abord une légère augmentation de l'ANR suivie par une chute brutale.

Une fois la contrainte levée les activités nitrogénase et nitrate réductase reprennent une activité normale quand le stress est faible ou modéré alors que le stress sévère provoque une inhibition irréversible de ces deux activités.

La comparaison de ces deux activités sous contrainte hydrique laisse entrevoir une sensibilité plus grande de la fixation par rapport à l'assimilation. Mais la plante réajuste sa nutrition par une augmentation de l'ANR au moment où la fixation diminue sous l'effet du stress hydrique.

Les bases physiologiques pour la tolérance au stress hydrique ne sont pas bien connues chez la symbiose légumineuse-Rhizobium. L'existence d'une forte corrélation entre la fixation de l'azote et le contenu en eau du nodule montre l'importance de la relation qui peut exister entre cet organe et la diffusion de l'eau et de l'air nécessaire au bon fonctionnement des bactéroïdes dans le nodule.

Nous avons aussi mis en évidence la supériorité de la souche native C2260 pour la production de matière sèche des feuilles, des tiges et des gousses pendant une contrainte hydrique. Ces paramètres contribuent à la formation du rendement et par conséquent conditionnent la productivité du pois chiche. De ce fait, nous pouvons penser que cette souche peut présenter un intérêt pour inoculer le pois chiche susceptible d'être cultivé dans les régions où les contraintes hydriques constituent un facteur limitant de la production végétale.

Dans la symbiose, la plante hôte contrôlerait les principaux mécanismes impliqués dans la tolérance des légumineuses à la sécheresse. Les résultats obtenus en serre et au champ ont montré un effet inhibiteur important de la contrainte hydrique sur la nodulation. Dans

tous les cas, le nombre et le poids sec des nodules, par rapport au témoin arrosé, ont diminué sous l'effet du stress hydrique. De même, nous avons observé une variabilité dans la réponse des cultivars au stress hydrique. Dans les deux essais, en serre et au champ, le cultivar FLIP87-7C se distingue par sa capacité à conserver le maximum de matière sèche nodulaire sous contrainte hydrique. Il semblerait que la réduction du nombre de nodules soit compensée par l'apparition de nodules plus grands, capables de mieux surmonter le stress hydrique.

Les essais en serre ont montré une grande variabilité parmi les cultivars de pois chiche, dans la sensibilité de la nodulation au stress hydrique. Ces observations ont été confirmées au champ et sont en accord avec les observations sur la tolérance à la sécheresse signalées par plusieurs auteurs. Ils montrent l'intérêt de certains cultivars qui peuvent produire de gros nodules dont la masse est mieux adaptée pour tolérer les contraintes hydriques.

Il existe des relations de cause à effet entre le stress hydrique, le manganèse, les uréides et l'ARA. Nous avons pu confirmer chez le pois chiche que l'accumulation des uréides dans les feuilles, suite à un stress hydrique, se traduit par leur retour dans les nodules (feedback) et leur accumulation serait responsable de l'inhibition de l'activité nitrogénase.

Le manganèse est le cofacteur de l'amidohydrolase, enzyme responsable de la dégradation des uréides. Des apports croissants en Mn peuvent stimuler la dégradation des uréides et éviter leur retour aux nodules et par conséquent préserver la fixation N_2 sous contrainte hydrique.

Il existe cependant des contradictions quant à la réponse de l'amidohydrolase aux apports supplémentaires de Mn. Ces contradictions sont renforcées par l'existence de deux voies du catabolisme des uréides : la voie amidohydrolase qui nécessite la présence du Mn et la voie amidinohydrolase qui peut fonctionner sans Mn. Les géotypes qui catalysent les uréides par la voie amidinohydrolase sont généralement plus tolérants au stress hydrique.

L'application du manganèse chez le pois chiche a permis une augmentation de la masse du nodule individuel à partir de 4 mM. Cette augmentation s'accompagne d'un accroissement de l'ARA jusqu'à 8 mM de Mn. La cause serait une diminution de la concentration en uréides dans la sève du phloème qui arrive aux nodules et qui protégerait l'activité de la nitrogénase.

La température agit sur le métabolisme général de la plante et la nutrition azotée en particulier. Les hautes températures sont généralement associées au stress hydrique.

Les températures comprises entre 2 et 10°C limitent fortement le fonctionnement de la nitrogénase qui ne représente plus que 10 à 20 % de sa capacité optimale.

Les fortes températures affectent de même la fixation de façon brutale et à partir de 35°C, il est probable d'atteindre une inhibition complète de cette enzyme. L'optimum de cette activité se produit sur une gamme de températures assez réduite comprise entre 20 et 30 °C.

Par contre, les basses températures ont un effet favorable sur la nitrate réductase en protégeant cette enzyme contre sa dégradation naturelle pendant la phase obscure et en favorisant même sa synthèse. C'est un avantage qui conforte le décalage du semis de printemps vers l'hiver, souvent recommandé pour améliorer les rendements du pois chiche.

La comparaison des deux activités ARA et ANR au cours des trois stades phénologiques laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces deux enzymes qui participeraient à un équilibre de la nutrition azotée en réponse à la température.

En semis d'hiver, le pois chiche peut donc assurer sa nutrition azotée par l'assimilation des nitrates du sol pendant la saison froide et par la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au printemps. Ce relais entre les deux voies de la nutrition azotée constitue à l'heure actuelle une voie de recherche dans le but est de permettre aux légumineuses de satisfaire leur besoin en azote, sous contrainte thermique au cours du cycle de la plante. Il existe une variabilité dans la réponse des souches au stress thermique. Certaines d'entre elles sont capables de mieux tolérer ce stress et de former une symbiose efficace sous contrainte thermique.

Cette étude nous a permis de montrer l'intérêt des marqueurs enzymatiques pour la compréhension des différents mécanismes impliqués dans la tolérance du pois chiche aux contraintes du milieu. Une recherche de la variabilité au niveau des deux partenaires de la symbiose peut nous permettre de sélectionner les couples plante-bactérie susceptibles de bien fonctionner sous les contraintes des milieux arides. Une stratégie d'amélioration de la fixation serait de sélectionner parmi les souches natives, mieux adaptées à notre région, celles qui sont capables de tolérer au mieux le stress hydrique, thermique ou chimique.

La mise au point de test rapide et fiable à partir notamment du dosage des uréides pétiolaires nous permettrait de cribler un grand nombre de couples afin d'identifier ceux qui présentent un caractère de tolérance pour l'amélioration de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et de la culture du pois chiche dans des conditions difficiles.

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- Abd-El Baki GK, Siefritz F, Man HM, Weiner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM, 2000. Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell and Environment*, 23, 515-521.
- Alcantar-Gonzales GM, Migianac-Maslow A, Champigny ML, 1988. Effect of nitrate supply on energy balance and acetylene reduction and nitrate reductase activities of soybean root nodules infected with *Bradyrhizobium japonicum*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 307, 145–52.
- ALOFÉ CO, SCHRADER LE , SMITH RR, 1973. Influence of high day and variable night temperatures on nitrate reductase activity of young corn (*Zea mays* L) plants. *Crop Sci.*, 13 , 625 - 629.
- Arnon AL, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Arrese-Igor C, Garcia-Plazaola JI, Hernandez A, Aparicio-Tejo PM, 1990. Effect of low nitrate supply to nodulated lucerne on time course of activities of enzymes involved in inorganic nitrogen metabolism. *Physiol Plant*, 80,185–90.
- Arrese-Igor C, Minchin FR, Gordon AJ, Nath AK, 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 48, 905–91.
- ASLAM M, OARS A, HUFFAKERRG, 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.*, 58, 588-591.
- ATKINSON DS, 1970. Adenine nucleotides as universal stoichiometric metabolic coupling agents. *Adv. Enzyme Regulation*, 9, 207-219.
- BALANDREAU J et DOMERGES Y, 1971. Mesure in situ de l'activité nitrogénase. *C.R.Acad.Sci.Paris*,273,2020-2023.
- Banfalvi ZA, Nreuwkoop M, Schell L, Best P, Stacey G, 1988. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.*, 214,420–424.
- BARASH I, SADON T, Mohr H, 1973. Induction of a specific isoenzyme of glutamate dehydrogenase by ammonia in oat leaves. *Nature*, 244, 150-152.
- BARDIN R, 1982. Influence du déficit hydrique sur l'activité nitrate-réductase et nitrogénase chez le soja. *C.R. Acad. Sci. Paris, Serie III* ,294, 1006-1012.
- BARRIERE I et BERANGER FB, 1982. Coûts énergétiques de quelques cultures du nord de la France. *Agronomie*, 2, 8, 741-744.
- Becker TW, Carrayol E, Hirel B, 2000. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. *Planta*, 211, 800-806.
- BEEVERS L and HAGEMAN RH, 1972. The role of light in nitrate metabolism in higher plants. *Phytophysiology*, 7, 85-113.

- BEEVERS L, HAGEMAN RH, 1980. Nitrate and nitrite reduction . In *The Biochemistry of Plants*, Vol. V, Stumpf P.K. and Conn E.E. eds., Academic Press, New York, 115-168.
- BENNET JM, CORTES PM, LORENS GF, 1986. Comparison of water potential components measured with a thermocouple psychrometer and pressure chamber and effects of starch hydrolysis. *Agron.J*,78,239-244.
- BERGENSEN FJ, 1961. Hemoglobin content of legume root nodules. *Biochem. Biophys Acta*, 50, 576-578.
- BERGENSEN FJ, 1966. Some properties of nitrogen fixing breis prepared from soybean root-nodules. *Bioch. Biophys.*, 130, 304-312.
- BERGENSEN FJ and TURNER GL, 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Bioch. Biophys. Acta*, 141, 507515.
- BERGENSEN F J, 1971. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Rev. Plant Physiol.*, 22, 121-140.
- BERGENSEN FJ, 1981. Root nodule of legume: structure and fonction. *Research Studies Press. J Wiley and Sons*, pp164.
- Berry JA and Björkman O, 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 31, 491-543.
- BERTELSEN H, 1985. Effect of temperature on H₂ evolution and acetylene reduction in pea nodule and in isolated bacteroids. *Plant Physiology*, 77, 335 - 338.
- BETHLENFALVA GS, ABU-SHAKRA SS, PHILLIPS DA, 1978. Interdependence of nitrogen fixation and photosynthesis in *Pisum sativum* L. I. Effects of combined nitrogen on symbiotic nitrogen fixation and photosynthesis. *Plant Physiol.*,62,127-130.
- Bhuvaneshwari, TV, Goodman RN, Bauer WD, 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum*: I Location of infectible root cells. *Plant Physiol.*, 66, 1027-1031.
- BISELING T, VAN DEN BOS BC , VAN KAMMEN A, 1978. The effect of ammonium on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by *Rhizobium leguminosarum*. *Bioch. Biophys Acta*, 539, 1-11.
- BOUHAOUCHINE L, DJEBRANI M, ZAGHOUANE O, AIT ABDELLAH F, KHALDOUN S, KAHELARRAS Y, 1998. Synthèse de l'étude sur les possibilités de réhabilitation et de développement des légumineuses alimentaires en Algérie. *Céréaliculture (itgc)*,33,20-26.
- BOUNIOLS A, CHALAMET A , LAGACHERIE B., MERRIEN A, OBATON M, 1986. Nutrition azotée du Soja. Limites et améliorations de la fixation symbiotique. in *Le Soja*. eds. Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains. 24-32.
- BOYAT A et ROBIN P, 1977. Relations entre productivité, qualité, quantité du grain et activité nitrate réductase chez les céréales. *Ann. Amélior. Plant.*, 27, 389-410.
- BROWN GN and DILWORTH MJ, 1975. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroides. *J. Gen. Microbiol.*, 86, 39-48.

- BRUNETTI N and HAGEMAN RH, 1976. Comparaison of in vivo and in vitro assays of nitrate reductase in wheat seedlings. *Plant Physiol.*, 58, 583-587.
- BRYAN JR, 1976. Amino acid biosynthesis and its regulation. In *Plant Biochemistry*. Bonner J. and Varner J.E. eds. Academic Press New York, 525-560 .
- BULLEN WA, BURNS RC , Le COMPTE JR, 1965. Nitrogen fixation hydrosulfite as electron donor with cell free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 53, 532-536.
- BURIAS N, PLANCHON C, PAUL MH, 1990. Phenotypic and genotypic of nodules on soybean roots system inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain G49. *Agronomie*, 10, 57-62.
- CALLE P, MARTIN N, SABATIER B, 1986. Cytoplasmic and mitochondrial localization of the glutamate dehydrogenase induced by senescence in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.*, 66, 451-56.
- CAMMAERTS D and JACOBS A, 1983. A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.*, 31, 65-73.
- CAMMAERTS D and JACOBS M, 1985a. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 163, 517-526.
- CAMMAERTS D and JACOBS M, 1985b. A study of the polymorphism and the genetic control of the glutamate dehydrogenase isozymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.*, 31, 65-73.
- Campbell WH, 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and
- CHAILLOU S, MOROT-GAUDRY JF, SALSAC L, LESAIN C, JOLIVET E, 1986. Compared effects of NO₃ and NH₄ on growth and metabolism of french bean. *Physiol. Vég.*, 24, 679-687.
- Chamber-Perez MA et Serrano A, 1991. C-N balance, nitrate and nitrite reductases in nodules exposed to nitrate, and the relationships to nitrogenase activities. *J Plant Physiol.*; 139: 70–5.
- Chamber-Perez MA, Camacho-Martinez M, Soriano-Niebla JJ ,1997. Nitrate-reductive activities of *Bradyrhizobium sp.* in tropical legumes: effects of nitrate on O₂ diffusion in nodules and carbon costs of N₂ fixation. *J. Plant Physiol*, 150, 92–96.
- CHATTERJEE SB, POKHRYAL TC, ABROL YP, 1981. Nitrogen economy of the main shoot of field grown barley (*Hordeum vulgare L*) II In vivo nitrate reductase activity during growth. *J. Exp. Bot.*, 32, 701-712.
- Chinthapalli B, Murmu J, Raghavendra A, 2003. Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C3 and C4 plants. *J. Exp Bot.*, 54, 383, 707-714.
- CHOU KH, and SPLITISTOESSR W, 1972. Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons. Characterization and isoenzymes. *Plant Physiol.* 49, 550-556.

- COKER GT and SCHUBERT ZB, 1981. Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules I. Characterisation and comparison with N₂ fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. *Plant Physiol.*, 67, 691-696.
- CONEJERO G, 1981. Contribution à l'étude biochimique, physiologique et agronomique de la réduction du nitrate chez le Soja; Thèse Docteur Ingénieur. Univ. des Sci. et Tech. du Languedoc. Montpellier, France.
- Cotelle V, Meek SEM, Provan F, Milne FC, Morrice N, MacKintosh C, 2000. 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO Journal* 12, 2869–2876.
- CROY L I and HAGEMAN RH, 1970. Relationships of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. *Crop Sci.*, 10, 280-285.
- Dart P, Day J, 1971. Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant Soil*, 35, 167–184.
- Dart P, Day J, Islam R, Döbereiner J, 1976. Symbiosis in tropical grain legumes: Some effects of temperature and the composition of the rooting medium. p. 361–383. In P.S. Nutman eds. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- DART PJ, HUXLEY PA, EAGLESHAM AR, MINCHING FR, SUMMERFIELD RJ, DAY JM, 1977. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). II Effects of inorganic nitrogen on growth and yield of nodulated and non nodulated plants. *Expl. Agric*, 13, 241-252.
- DAVIES DD and TEIXEIRA AN, 1975. The synthesis of glutamate and the control of glutamate dehydrogenase in pea mitochondria. *Phytochemistry*, 14, 647-656 .
- DAVIES C L, TURNER D W, DRACUP M, 2000. Yellow lupin (*Lupinus luteus*) tolerates waterlogging better than narrow-leaved lupin (*L. angustifolius*) I. Shoot and root growth in a controlled environment. *Aust. J. Agric. Res.*, 51, 701-709.
- Day DA, Carroll HJ, Delves AC, Oressoff F M, 1989. Relationship between autoregulation and nitrate inhibition of nodulation in Soybeans. *Physiol. Plantarum*, 75, 37-42
- Dazzo FB and Brill WI, 1978. Regulation by fixed nitrogen of host symbiont recognition in the Rhizobium-Clover symbiosis. *Plant Physiol.*, 62, 18-21.
- DE SILVA M, PURCELL LC, KING CA, 1996. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Sci.*, 36, 611-616.
- De VIENNE D, 1980. Relation entre la structure et les formes multiples de la glutamate déshydrogénase du pollen de luzerne. *C R Hebd. Seances Acad. Sci. Paris. Ser. D*, 291, 885-888.
- De VIENNE D, 1983. La glutamate déshydrogénase de la luzerne: aspects cytologiques, structuraux et évolutifs. *Can J. Gen. Cytol.*, 25, 517-526.
- DEANE DRUMOND CE, CLARKson DT, JOHNSON CB, 1980. The effects of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity assayed in vivo and in vitro. *Planta*, 148,455-461.

- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C, 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 13454-13459.
- DEMOLON A, 1968. Nutrition azotée des végétaux cultivés. in *Principes d'agronomie. Tome II. Croissance des végétaux cultivés*. eds. Dunod Paris, 190-216.
- Denarie J et Truchet G, 1979. La Symbiose Rhizobium légumineuse : Rôles respectifs des deux partenaires. *Physiol. Veg.*, 17, 4, 643-667
- DENISON RF, MEISK PR, SINCLAIR TR, 1985. Variably among plant in dinitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field grown soybean. *Agron. J.*, 77, 947-950.
- DEROCHE ME, BABALAR M, 1987. La nitrate réductase in vivo dans les différents organes de la luzerne. *La nutrition azotée des légumineuses*. eds. INRA, Paris, Les colloques de l'INRA, 37, . 121 -133.
- Diaz del Castillo L, Hunt S, Layzell DB, 1994. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. *Plant Physiology*, 106, 949-955
- DIAZ-DEL CASTILLO K and LAYZEL A, 1995. Drought stress permeability to O₂ diffusion and the respiratory kinetics of soybean root nodules. *Plant Physiology*, 107, 1184-1194.
- Dilworth MJ, 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixation preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta*, 127, 285- 294.
- Djekoun A, 1991. Photosynthèse, fixation symbiotique de l'azote et résistance à la sécheresse chez le soja (*Glycine max L. Merrill*). Thèse doctorat, Université Toulouse, p.145
- DODDEMA A, STULEN I, HOFSTRA JJ, 1986. The distribution of nitrate reductase in tomato (*Lycopersicum esculentum*) leaves as affected by age. *Physiol. Plantarum*, 68, 615-619.
- Dommergues Y et Mangenot P, 1970. *Ecologie microbienne du sol*. eds Masson, Paris, 595-634
- Drevon JJ, Gerhand A, Roy G, El-Hilali R, 1990. Diffusion de l'oxygène et fixation symbiotique de l'azote dans la symbiose rhizobium-légumineuse. *C.R. Acad. Agri. Fr. Paris*. 294, serie III, 1007-1012.
- Drevon JJ, Derensard C, Iretki H, Payre H, Roy G, Serraj R, 1995. La salinite abaisse la conductance des nodosités à la diffusion de l'oxygène. In *Facteurs Limitant la Fixation Symbiotique de l'Azote dans le Bassin Méditerranéen*. eds, Drevon JJ. INRA, Paris.
- DUCROQ M, 1990. Les bases de l'irrigation. eds. Michel Ducroq, Paris, pp350.
- DUKE SH, FRIEDRICH, JW, SCHRADER LE, KOUKKARI WL, 1978. Oscillations in the activities of enzymes of nitrate reduction and ammonia assimilation in *Glycine max* and *Zea mays*. *Physiol. Plant*, 42, 269-276.
- DUNN SD and KLUCAS RV, 1973. Studies on possible routes of ammonia assimilation in soybean root nodules bacteroids *Can J Microbiol*, 19, 1493-1499.

- DURAND JL, SHEEY JE, MINCHIN FR, 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation . J.Exp.Bot., 38,311-321.
- EADY RB and POSTGATE JR, 1974. Nitrogenase. Nature, 249, 805-810.
- EADY RB, SMITH BE, COOR KA , POSTGATE JR, 1972. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of component proteins. Bioch. J., 128, 655-675.
- EHMKE A and HARTMANN T, 1976. Properties of glutamate dehydrogenase from *Lemna minor*. Phytochemistry, 15, 1611-1617.
- EVANS HJ and NASON A, 1953. Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiol., 28, 233-254.
- EVSTIGNEEVA ZG, PUSHKIN AB, SOVONIEVA NA, GOLOVA TV, KRETIVICH WL, 1982. Effect of lighth in the formation of multiple molecular forms of glutamine synthetase in plants. Mol. Cell Biochem., 40, 123-125.
- FAWOLE MO, 1977. Glutamate dehydrogenase from *Vicia faba*. Can. J. Bot., 55, 1850-1856.
- Ferrario-Mery S, Hodges M, Hirel B, Foyer CH, 2002. Photorespiration-dependent increases in phosphoenolpyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine-alpha-ketoglutarate aminotransferase. Planta, 214, 877-886.
- Fernandez D, 1987. Etude de la compétition entre deux souches de *Bradyrhizobium japonicum* et analyse de leurs profils de nodulation. Thèse Doct. 3ème cycle. ENSA Montpellier.
- Figueiredo M VB, Burity H A, de FranÇA F P, 1998. Water deficit stress effects on N₂ fixation in cowpea inoculated with different *Bradyrhizobium* strains. Can. J. Plant Sci., 78 , 577-582.
- FINN MH and BRUN WA, 1982. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on growth, non structural carbohydrate content and root nodule activity in soybean. Plant Physiol.,69,327-331.
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J, 2000. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. The Plant Journal 23, 817–824.
- Foyer C H, Martin P, Graham N,2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. Journal of Experimental Botany, 54, 382, 585-593.
- Fujikake H, Yamazaki O, Ohtake T, Sueyoshi K, Matsuhashi S, Ito T, Mizuniwa C, Kume T, Hashimoto S, Ishioka N-S, Watanabe S, Osa A., Sekine T, Uchida H, Tsuji A , Ohyama T, 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. Journal of Experimental Botany, 54, 386, 1379-1388.
- GAYLER RB and MORGAN WB, 1976. An NADP-dependent glutamate dehydrogenase in chloroplasts from marine green alga. *Caulerpa simpliciuscula*. Plant Physiol., 58, 283-287.

- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M, 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment*, 22, 1177–1199.
- GIBSON AH and PAGAN JD, 1977. Nitrate effects on the nodulation of legume inoculated with nitrate reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta*, 134, 17-22.
- Gonzalez GA, 1987. Contribution à l'étude de l'action inhibitrice du nitrate sur la symbiose soja-*Rhizobium japonicum*. Relation avec l'activité nitrate réductase des bactéroïdes. Thèse Doct.3ème cycle. ENSA Montpellier.
- Gonzalez, E M, Gordon, A J, James, C L, Arrese-Igor C, 1995 . The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* 291, 1515-1523 .
- Gordon AJ, Minchin FR, Skøt L, James CL, 1997. Stress-induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology*, 114, 937–946.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O, 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiology*, 120, 867–877.
- Gordon AJ, Skot L, James CL and Minchin FR, 2002. Short-term metabolic responses of soybean root nodules to nitrate. *Journal of Experimental Botany*, 53, 368, 423-428.
- Graham MJ, Nickell CD, Hoefft RG, 1995. Inheritance of tolerance to manganese deficiency in soybean. *Crop Sci.*, 35, 1007-1010.
- GUERIN V, TRINCHANT JC, RIGAUD L, 1990. Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by broad bean (*Vicia faba* L.) nodules and bacteroids under water-restricted conditions. *Plant Physiol.*, 92, 595--601.
- Guerin V, Pladys D, Trinchant C , Rigaud J, 1991. Proteolysis and nitrogen fixation in faba-bean (*Vicia faba*) nodules under water stress. *Physiol. Plant.* 82, 360-366.
- GUERRERO MG, VEGA JM , LOSADA M, 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32, 169-204.
- GUIZ C, HIBEL B, SHEDLOFSRY G , GADAL P, 1979. Occurrence and influence of light on the relative proportion of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Sci. Lett.*, 15, 271-277.
- HADFIELD L and BULEN WA, 1969. Adenosine triphosphate requirement of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 8, 5103-5108.
- HAGEMAN RH and BURRIS BH, 1978. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *roc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 2699-2702.
- HAGEMAN RH, 1979. Integration of nitrogen assimilation in relation to yield. In *Nitrogen assimilation of plants*. Hewitt EJ et Cutting CV, eds. , Academic Press, New York, 591-612.
- HAGEMAN RH and REED AT, 1980. Nitrate reductase from higher plants. *Eth. Enzymol.*, 69, 270-280.

- Hall AE, 1993. Physiology and breeding for heat tolerance in cowpea, and comparisons with other crops. *In* Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress: Proceedings of an International Symposium. Taiwan, 13-18 August 1992. eds. C G Kuo. pp 271-284.
- HALLARK W B , HUFFAKER, 1978 . The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in sudangrass seedling . *Physiol. plant*, 44 ,147-152.
- HARDY RWF and BURNS RC, 1973. Comparative biochemistry of ion-sulfur proteins and dinitrogen fixation. Iron sulfur-protein. eds. W Lovenberg , Acad. Press, NY, 65-110.
- HAREL E, LEA PJ , MIFLIN BJ, 1977. The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activity during greening. *Planta*, 134, 195-200.
- HARPER JE and HAGEMAN BH, 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine max L Merr*). *Plant Physiol.*, 49, 146--156
- HARPER JG, NICHOLAS JG , HAGEMAN RH, 1972. Seasonal and canopy variation in nitrate reductase activity of soybean (*Glycine max L Mer*) varieties. *Crop Sci.*, 12, 382-386.
- HARPER JE and NICHOLAS JC, 1976. Control of nutrient solution pH with an ion exchange system. Effect on soybean nodulation. *Physiol. Plant.*, 38, 24-28.
- HARPER JC and GIBSON AH, 1983. Nitrate inhibition of nodulation among soybean cultivar x Rhizobium strains combinations. *Plant Physiol.*,71,157-163
- Hartwig UA,1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1, 92–120.
- Heckman MO, Drevon JJ, 1987. Nitrate metabolism in soybean root nodules. *Physiol Plant*, 69, 721–725.
- HEINS B and SCHENK M, 1986. Nitrate-uptake characteristics of root as affected by nitrate supply. in. *Developments in plant and soils sciences: fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. eds. HL Lambers, JJ Neetensen et I. Stulen; Mactinus Nijhoff publishers pp 45.
- HENIN S, 1980. Rapport du groupe de travail . Activités agricoles et qualité des eaux. Ministère de l'agriculture et Ministère de l'environnement et du cadre de la vie. pp294.
- HERRIDGE DF, and ROSE IA, 1994. Heritability and repeatability of enhanced N₂ fixation in early and late inbreeding generations of soybean. *Crop Sci.*, 34, 360-367.
- HIREL B, and GADAL P, 1980. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves. *Plant Physiol.*,66, 619-623.
- HIREL B, VIDAL J, GADAL P, 1982. Evidence for a cytosolic dependant light induction of chloroplastic glutamine synthetase in etioled rice leaves. *Planta*, 155, 17-23.
- HSIAO TC, 1973 . Plant responses to water stress *Annu. Rev plant physiol*,24,519-570.
- Huang CY, Boyer JS , Vanderoef LN, 1975. Limitation of acetylene reduction by photosynthesis in soybean having low water potentials. *Plant Physiol.*,56,228-232.
- Hume DJ andShelp BJ, 1990. Superior performance of the hup-*Bradyrhizobium japonicum* strain 532C in Ontario soybean field trials. *Can J Plant Sci*, 70, 661–666.

-
- HUNGRIA M, FRANCO AA , 1993. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* . Plant and soil , 149 , 95-102.
- HUNTER WJ, 1983. Soybean root and nodule nitrate reductase Physiol plant., 59, 471-475.
- Irekti H, 1989. Influence des nitrates sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois-chiche (*Cicer arietinum* L) Thèse d'Ing., INA, Alger, pp47.
- Ismade J, 1991. Regulation of the nodule efficiency by the undisturbed soybean plant. JExp Bot, 42, 687-91.
- JATIMLIANSKY JR, CHAMPIGNY ML, PRIOUIL JL, BISMITH E, MOYSE A, 1982. Influence du nitrate sur la croissance et la photosynthèse nette du Soja pourvu ou non de nodosités. Physiol. Vég., 20, 407-422.
- Jessop RS, Hetherington SJ, Hoult EH, 1984. The effect of soil nitrate on the growth, nodulation and nitrogen fixation of chickpeas. (*Cicer arietinum* L) Plant and Soil, 82, 205-214.
- JOHNSON HS et HUME DJ, 1973. Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybean by nodules weight, leghemoglobine content and acetylene reduction. Can J Microbiol., 19, 1165-1168.
- JONES RW and SHEARD RW, 1975. Phytochrome, nitrate movement and induction of nitrate reductase in etiolated pea terminal buds. Plant Physiol., 55, 954-959.
- JOY RW, 1973. Control of glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* roots. Phytochemistry, 12, 1031-1040.
- Kaiser WM, Huber SC, 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. J Exp Bot., 52, 1981-9.
- KANAMORI T and MATSUMOTO B, 1972. Glutamine synthetase from rice plant roots. Arch. Bioch. Biophys., 125, 404-412.
- Kandlbinder A, Weiner H, Kaiser WM 2000. Nitrate reductase from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L) and spinach (*Spinacia oleracea* L) have different regulatory properties. Journal of Experimental Botany, 51, 1099-1105.
- KANG S and TITUS JJ, 1980. Activity profiles of enzymes involved in glutamine and glutamate metabolism in the apple during autumnal senescence. Physiol Plant, 50, 291-297
- Kato K, Okamura Y, Kanahama K, Kanayama Y, 2003. Nitrate-independent expression of plant nitrate reductase in *Lotus japonicus* root nodules. Journal of Experimental Botany, Vol. 54, 388, 1685-1690.
- KEYS AJ, BIRD IF, CORNELIUS MF, LEA PJ, WALLSGROVE RM, MIFLIN BJ, 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. Nature, 275, 741-742.
- KIMOU A, 1984. Influence de l'azote combiné et du recyclage de l'hydrogène sur l'activité et l'efficacité relative dans la symbiose *Glycine max-Rhizobium japonicum*. Thèse de Docteur Ingénieur. ENSAM, Montpellier, France.
- KIMOU A, DREVON JJ, SALSAC L, 1985. Effets de l'azote combiné sur l'efficacité relative apparente de la nitrogénase chez le soja. Physiol. Vég., 23, 3, 249-256.
-

- King ca and Purcell LC, 2001. Soybean Nodule Size and Relationship to Nitrogen Fixation Response to Water Deficit . *Crop Science*, 41, 1099-1107
- Kirda C Danso SK , Zapata F, 1989. Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean. *Plant Soil*, 120, 49-55.
- KRETOWICH WL, EVSTIGNEVA ZG, PUSHKIN AP, DZOKHARIDZE TZ, 1981. Two forms of glutamine synthetase in leaves of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry*, 20, 625-629.
- Lang P, Martin R, Golvano MP, 1993. Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in root nodules of *Lupinus albus*. *Plant Physiol Biochem.*, 31, 639-48.
- LARA M, CULLIMORE JV, LEA PJ, MIFLIN BJ, JOHNSTON AWB, IAMB JW, 1983. Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* (L). *Planta*, 157, 254-258.
- LARA M, POTA H, PADILLA J, FOLCH J, SANCHEZ F, 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L *Plant Physiol.*, 76, 1019-1023.
- LARRY EW, DEJORN TM, PHILLIPS DA, 1981. Carbon and nitrogen metabolism of soybean seedling development. *Plant. Physiol.*, 68, 1206-1209.
- Latimore M, Giddens JR, Ashley DA, 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthetate supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop Sci*, 17, 399-404.
- LATIMORE M, GIDDENS JR, ASHLEY DA, 1977. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthetate supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop Sci*, 17, 399-404.
- LAURIERE C and DAUSSANT J, 1983. Identification of the ammonium dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiol. Plant.*, 58, 89-92.
- LAURIERE G, 1983. Enzymes and leaf senescence. *Physiol. Vég.*, 21,6, 1159-1177.
- LAURIERE G, and DAUSSANT J, 1983. Identification of the ammonium dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiol. Plant.*, 58, 89-92.
- LAURIERE G, WEISMAN N , DAUSSANT J, 1981a. Glutamate dehydrogenase in the first leaf of wheat: (I) Antigenic polymorphism. *Physiol. Plant.*, 52, 146-150.
- LAURIERE G, WSISMAN N , DAUSSANT J 1981b. Glutamate dehydrogenase in the first leaf of wheat: (II) De novo synthesis upon darknes stress and senescence. *Physiol. Plant.*, 52, 151-155.
- Layzell DB and Hunt S, 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol Plant*, 80, 322-327.
- LEA PJ and MIFLIN BJ, 1974. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251, 614-616.
- LEA PJ and MIFLIN J, 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. V, STUMPF P.L. et CONN EE eds. Academic Press, New York, 596-608.

- LECOEUR J, WERY J, TURC O, 1992. Osmotic adjustment as a mechanism of dehydration postponement in chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves. *Plant and soil*, 144, 177-189.
- LEES EL and DENMS DT, 1981. Glutarate dehydrogenase in developing endosperm, chloroplasts and roots of Castor bean. *Plant Physiol.*, 68, 827-830.
- Lindemann, WC, Ham GE, 1979. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 1134-1137.
- Lipsanen P Lindstrom K, 1986. Adaptation of red clover rhizobia to low temperatures. *Plant Soil*, 92, 55-62.
- Lipsanen P and Lindstrom K, 1986. Adaptation of red clover rhizobia to low temperatures. *Plant Soil*, 92, 55-62.
- LORIMER GH and ANDREWS TJ, 1981. The chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 8. Stumpf PK et Conn EE eds., Academic Press, 330-375.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Fara A., Randall RJ, 1951. Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LOYOLA VVM and SANCHEZ JE, 1986. Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen assimilation enzymes during callus growth of maize. *Plant Physiol.*, 125, 235-242.
- Lukaszewski K.M., Blevins DG, Randall DD, 1992. Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese-dependent allantoate amidohydrolase. *Plant Physiol.*, 99, 1670-1676.
- Lucinski R, Polcyn W, Ratajczak L, 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium-legumes*. *Acta Biochim. Pol.*, 49, 537-546.
- Lynch DH, and Smith DL, 1993. Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂-fixation as affected by exposure to low root-zone temperature. *Physiol. Plant.*, 88, 212-220.
- MACDOWALL FD, LAYZELL DB, WASH KB, 1989. Physiological acclimations to chilling temperature in symbiotically grown alfalfa. *Can. J. Bot.* 67, 352-359.
- MACDUFF JH, JARVIS SC, COCKBURN JE, 1994. Acclimation of NO₃⁻ fluxes to low root temperature by *Brassica napus* in relation to NO₃⁻ supply. *J. Exp. Bot.*, 45 (277), 1045 - 1056.
- MAHART JB and WONG PP, 1979. Nitrate reductase activities of *Rhizobium* and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.*, 25, 1169-1174.
- Mahoney J, 1991. Field pea. In *New Crops: Agronomy and Potential of Alternative Crop Species*. eds. R S Jessop and R L Wright. pp 53-62. Inkata Press, Melbourne.
- MALDONADO JM, NOTTON BA, HBWITT EJ, 1980. The reactivation of nitrate reductase from spinach (*Spinacea oleracea* L) inactivated by NADH and cyanide, using trivalent manganese either generated by illuminated chloroplasts as manganipyrophosphate. *Planta*, 150, 242-248.

- MANN AF, PENTSM PA , STSWART GR, 1979. Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). Biochem. Biophys. Res. Comm., 88, 515-521.
- 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 - 2342.
- Marschner H, 1995. Mineral nutrition of higher plants, second edition. New York: Academic Press.
- Masefield G B, 1961. The effect of irrigation on nodulation of some leguminous crop,. Empire J. Exp. Agric, 29, 51-59.
- MATSUMOTO T, YATATAWA M , YAMAMOTO Y, 1978. Allantoin metabolism in soybean plant as influenced by grafts, a delayed inoculation with rhizobium and late supply of nitrogen compounds. Plant Cell Physiol., 19, 1168-1178.
- MATSUMOTO T, YATATAWA M, YAMAMOTO Y, 1977a. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non nodulating soybean plants. Plant Cell Physiol., 18, 353-359.
- MATSUMOTO T, YATATAWA T, YAMAMOTO Y, 1977b. Incorporation of ¹⁵N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with N₂. Plant Cell Physiol., 18, 459-462.
- MAZLIAK P, 1981. Régulation à court terme et à long terme de l'activité des enzymes membranaires par la température. Physiol. Vég. Fran., 19, 4, 543 - 563.
- McCLURE PB and ISRAEL DW, 1979. Transport of nitrogen in xylem of soybean plants. Plant Physiol., 64, 411-416.
- McDonal GK and Paulsen GM, 1997. High temperature effects on photosynthesis and water relation of grain legumes. Plant and soil, 196, 47-58.
- McKENZIE L A and LESS EM, 1981. Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation as characterization of three forms of the enzyme. Arch Biochem. Biophys., 212, 290-297.
- McNALLY S and HIREL B, 1983. Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Physiol. Vég. 21,4, 761-774.
- McNALLY S, HIREL B, GADAL P, MANN AF , STEWART GB, 1983. Glutamine synthetase of higher plants: Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. Plant. Physiol. 72, 22-25.
- McNEIL, DL, 1982. Variations in ability of *Rhizobium japonicum* strains to nodulate soybean and maintain fixation in the presence of nitrate. Appl. Envir. Microbiol., 44, 647-652.
- MEEK JC, WOLR CP, SCHILLING N, SHAPHER P, AVISSAR Y, CHIEN WS, 1978. Initial organic products of fixation of N dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). Plant Physiol., 61, 980-983.
- Mengel K and Kirkby, 1982. Principes of plant nutrition. International potash institut, Bern. pp 655.

-
- MIFLIN BJ, LEA PJ, 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15, 873-885.
- MIFLIN J, and LEA PJ, 1977. Amino acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, 299-329.
- MIFLIN BJ, 1980. Nitrogen metabolism and amino acid biosynthesis in crop plants. In the biology of crop productivity. Carlsan PS eds. Academic Press NY, 255-296.
- MIFLIN BJ and LEA PJ, 1980. Ammonia assimilation. In *The Biochemistry of Plants*, vol. V, Stumpf PK et Conn EE, eds, Academic Press, New York, pp202.
- Minchin FR, Minguez MI, Sheehy JE, Witty JF, Skøt L, 1986a. Relationship between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *Journal of Experimental Botany*, 37, 1103–1113.
- Minchin FR, Sheehy JE, Witty JF, 1986b. Further errors in acetylene reduction assay: Effects of plant disturbance. *J Exp. Bot*, 37, 1581–91.
- Minchin FR, 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol Biochem.*, 29, 881–8.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE, 1996. Statistiques agricoles, Serie B. Alger
- Ministère de l'Agriculture, 1998. Statistiques agricoles. Serie B., Alger.
- MIQUEL M, OBATON M, CONEJERO G, ROBIN P, SALSAC L, DOMENACH AM, BARDIN B, 1980. Détermination de l'activité nitrate réductase et nitrogénase chez le soja au champ. Colloque International sur le Contrôle de l'alimentation des plantes. Castelfranco venetto Treviso.
- MORTENSENET LE, MORRIS JA, JENG D Y, 1967. Purification, metal composition and properties of molybdo ferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen fixing system of *Clostridium pasterianum*. *Bioch. Biophys. Acta*, 141, 516-522.
- MUNNS DN, 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I Acid sensitive step. *Plant and Soil*, 28, 129-146.
- NAICK MS, ABROL YP, NAIR TV B, ROMARRO GS, 1982. Nitrate assimilation. Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochem.* 21, 495-504.
- NASRULLHAQ-BOYCE A and JOHNS OTG, 1977. The light-induced development of nitrate reductase in etiolated barley shoots. An inhibitory effect of laevulinic acid. *Planta*, 137, 77-84.
- NAUEN W and HARTMANN T, 1980. Glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* L localization of the multiple forms and of glutamate formation in isolated mitochondria. *Planta*. 148, 7-16.
- Neo HH and Layzell DB, 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology*, 113, 259–267.
- O'Hara GW and Daniel RM, 1985. Rhizobial denitrification: A review. *Soil Biol Biochem.*, 17, 1–9.
- OBATON M, 1992. Facteurs pédoclimatiques agissant sur la nutrition azotée des légumineuses. Sixième cours international sur la fixation, ENSA-INRA, 45pp.
-

- OBATON M, MIQUEL M, ROBIN P , CONEJERO G, DOMENACH AM , BARDIN B, 1982. Influence du déficit hydrique sur l'activité nitrate réductase et nitrogénase chez le Soja (*Glycine max* L Merr. cv Hodgsoni.). CR Acad. Sci., Paris., 294, serie III, 1007-1012.
- OGHOGHORIE CCO and PATE JJ, 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated pea (*Pisum arvense* L) Technic for measurements and evaluation in physiological terms. Plant and Soil, special volume, 185-202.
- O'NEAL D and JOY RW, 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. Arch. Biochem. Biophys., 159, 113-122.
- Oti-Boateng C and Salsbury JH, 1993. The effect of exogenous amino-acid on acetylene reduction activity of *Vicia faba* L. cv. Fiord. Annals of Botany, 71, 71-74.
- OUNANE SM , 1994. Effet du stress hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois chiche . Les colloques de l'INRA, 77,269-276.
- OUNANE SM , 1998. Effet du stress hydrique sur la fixation et l'assimilation de l'azote chez le pois chiche. Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach, 19,1et 2,114-124.
- OUNANE SM and SALSAC L, 1999. Nitrogenase activity and nodulation of chickpea inoculated with differents strains of *Rhizobium ciceri*. Field crops Aus.,57, 157-161.
- OUNANE S.M 2001. Influence du stress thermique sur la nutrition azotée chez le pois chiche. Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach Alger. 21,1-2, 98-110. Alger.
- OUNANE SM, 2002. Influence des nitrates sur la nutrition azotée du pois chiche. Annales de l'Institut National Agronomique El Harrache Alger. 22,1-2,147-167.
- Ounane SM, Irekti H , Bacha F, 2003. Effet du déficit hydrique sur la fixation de l'azote et la biomasse chez le pois chiche (*Cicer arietinum*) inoculé avec différentes souches de *Mesorhizobium ciceri*. Les colloques .eds I.N.R.A. Paris , 100, 69-80.
- Pankhurst, CE, and Sprent JI, 1975. Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. J. Exp. Bot., 26, 287-304.
- Parsons, R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI, 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. Plant Cell Environ., 16, 125-136.
- PATE JS, ATKINS GA, WHITE ST, RAINBIRD RN, WOOL KC, 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. Plant Physiol., 65, 961-965.
- PATES JS, 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. Soil Biol. Biochem., 5, 109-119.
- PATE JS, GUNNING BES , BRIARTY LG, 1969. Ultrastucture and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. Planta, 85, 11-34.
- Patterson RP and Hudak CM, 1996. Drought-avoidant soybean germplasm maintains nitrogen-fixation capacity under water stress. Plant and Soil, 186, 39-43.
- PAUL MH and PLANCHON C , 1990. Chlorophyll fluorescence as a tool in soybean improvement for N₂ fixation efficiency. Euphytia,45,43-47.

- Paulsen GM, 1994. High temperature responses of crop plants. *In* Physiology and Determination of Crop Yield. eds. K J Boote, J M Bennett, T R Sinclair, and G M Paulsen., 365-389. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Pazdernik D L, Graham P H, Vance C P , Orf J H, 1996. Host genetic variation in the early nodulation and dinitrogen fixation of soybean. *Crop Sci.*, 36, 1102-1107.
- Pazdernik DL, Graham PH, Vance CP, Orf JH, 1997. Variation in the pattern of nitrogen accumulation and distribution in soybean. *Crop Sci.*, 37, 1482-1486.
- Polcyn W, Lucinski R, 2001. Functional similarities of nitrate reductase from yellow lupine bacteroids to bacterial denitrification system. *J. Plant Physiol.*, 158, 829–834.
- POSTGATE RJ, 1976. Fixation biologique de l'azote. *La Recherche*, 66,7, 335-347.
- Postgate RJ**, 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- POSTIUS G, RLEHNE B, JACOBI G, 1976. Dark starvation and plant metabolism. VI. Comparative studies on the alternation of enzyme activities during dark starvation and senescence. *Z Pflanzenphysiol.*, 78, 122-132.
- Prévost, D, Antoun H, Bordeleau LM, 1987. Effects of low temperature on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 205–210.
- Provan F, Aksland LM, Meyer C, Lillo C, 2000. Deletion of the nitrate reductase N-terminal domain still allows binding of 14-3-3 proteins but affects their inhibitory properties. *Plant Physiology*, 123, 757–764.
- PUPPO A and RIGAUD J, 1979. A possible reduction pathway from leghemoglobin in vivo. *FEBS Lett.*, 108, 124-132.
- Purcell L C , King C A, 1996. Drought and nitrogen source effects on nitrogen nutrition, seed growth, and yield in soybean. *J. Plant Nutr.*, 19, 969-993.
- Purcell L C, de Silva M, King CA, Kim wH, 1997. Biomass accumulation and allocation in soybean associated with genotypic differences in tolerance of nitrogen fixation to water deficits. *Plant Soil*, 196, 101-113.
- Purcell LC and Sinclair TR, 1995. Nodule gas exchange and water potential response to rapid imposition of water deficit. *Plant Cell Environ.*, 18, 179-187.
- Purcell LC, Serraj R, de Silva M, Sinclair TR, Bona S, 1998. Ureide concentration of field-grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. *J Plant Nutr.*, 21, 949-966.
- Purcell LC, King CA, Ball RA, 2000. [Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition.](#) *Crop Sci.*, 40, 1062-1070.
- Purcell LC, Serraj R, Sinclair TR, De A, 2004. Soybean N₂ Fixation Estimates, Ureide Concentration, and Yield Responses to Drought. *Crop Sci.*, 44, 484-492.
- RADIN SW, 1978. A physiological basis for the division of nitrate assimilation between roots and leaves. *Plant Sci. Lett.*, 13, 21-25.
- RAISSAC de M, 1992. Mécanisme d'adaptation à la sécheresse et maintien de la productivité des plantes cultivées. *Agro. Trop.*, 46, 29-39.

- RATAJCZAK L, RATAJCZAK W, MAZUBOWA H, 1981. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiol. plant*, 51, 277-280.
- Ratajczak L, Ratajczak W, Mazurowa H, WoŹny A, 1996. Respiratory activity of bacteroids and mitochondria in root nodules of yellow lupine. *Biol. Bull. Poznań.*, 33, 35-40.
- Rawsthorne S, Hardy F, Summerfield RJ, Ropers EH, 1985. Effect of supplemental nitrate and of chickpea (*Cicer arietinum* L). II. Symbiotic development and nitrogen assimilation. *Plant and Soil.*, 83, 279-293.
- REDINBAUGH MG and CAMPBELL WH, 1985. Quaternary structure and composition of squash NADH-nitrate reductase. *J. Biol. Chem.*, 260, 6, 3380-3385.
- REED AJ and HAGEMAN RA, 1980. The relationship between nitrate uptake, nitrate flux and nitrate reduction in four maize (*Zea mays* L.) genotypes I. Genotypic variation. *Plant Physiol.*, 66, 1179-1183.
- REMLER JL and CAMPBELL WB, 1986. Regulation of corn leaf nitrate reductase II. Synthesis and turnover of enzyme's activity and proteins. *Plant Physiol.*, 80, 442-447.
- RHODES D, RENDON GA, STEWART G, 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta*, 129, 203-210.
- Rice CF, Lukaszewski KM., Walker S, Blevins DG, Winkler RG, Randall DD, 1990. Changes in ureide synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. *J Plant Nutr.*, 13, 1539-1553.
- Ridge PE and Pye DL, 1985. The effects of temperature and frost at flowering on the yield of peas grown in a Mediterranean environment. *Field Crops Res.*, 12, 339-346.
- Rigaud J, 1976. Effet des nitrates sur la fixation d'azote par les nodules de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Physiol. Vég.*, 14, 297-308.
- Rigaud J and Puppo A, 1977. Effect of nitrite upon leghemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 497, 702-706.
- ROBIN P, 1983. Contribution à l'étude de la réduction du nitrate chez les plantes cultivées. Thèse d'état. Univ. Sci. et Tec. du Languedoc, Montpellier.
- ROBIN P et SALSAC L, 1985. Colloque: nutrition des légumineuses. Versailles 19-21 Novembre 1985. Thème II Physiologie de la plante entière: les échanges métaboliques. pp 22.
- ROBIN P, BLAYAC D, SALSAC L, 1979. Influence de l'alimentation nitrique sur la teneur en nitrate et de l'activité nitrate reductase des racines et des feuilles de plantules de maïs. *Physiol. Vég.*, 17, 55-66.
- Robin P, Conejero G, Tranchant JP, Passama L, Salsac L, 1983. Mesures de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol. Vég.*, 21, 123-128.
- Robin P, Conejero G, Tranchant JP, Passama L, Salsac L, 1983. Mesures de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol. Vég.*, 21, 123-128.
- Robin P, Shamsun-Noor CL, Guckert a, 1989. Effect of potassium on the tolerance to PEG-induced water stress of two white clover varieties (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil*, 120, 143-158.

- ROSSION P, 1980. En attendant les céréales qui poussent sans engrais. Science et vie, 758, 102-104.
- ROY S K, RAHAMANZ S M L, SALAHUDDIN A BM, 1995. Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen on nodulation, growth and seed yield of gram (*Cicer arietinum*). Indian Journal of Agricultural Sciences, 65,12, 853-857.
- SALL K , 1981. Influence du déficit hydrique sur les activités nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glicine max. L Merrill*) . Thèse Doctorat, INP-ensa Toulouse, pp140.
- SALL K, 1987. Influence du déficit hydrique sur les activités nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glicine max. L Merrill*) . Thèse Doctorat, INP-ensa Toulouse, pp140.
- Sall K, and Sinclair T R, 1991. Soybean genotypic difference in sensitivity of symbiotic nitrogen fixation to soil dehydration. Plant Soil, 131, 31-37.
- SALSAC L, DREVON JJ, ZENGBE M, CLEYET-MAREL JC, OBATON M, 1984. Energy requirement of symbiotic N₂ fixation. Physiol. Vég., 22, 4, 509-521.
- SAXENA MC, 1990. Status of chickpea in the mediterranean bassin .In Options Méditerranéennes. Série Séminaire CIHEAM Paris, 9,17-24
- SAXENA NP, JOHANSEN MC, SAXENA MC, SILIM SN, 1993. Selection for drought and salinity tolerance in cool-season food legumes, in : Singh K.B.,Saxena M.C.eds Breeding for Tolerance in Cool-season Food Legumes, 245-270.
- SCANDALIOS JG, 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 225-258.
- Scholander P F, Hammel H T, Emmingsen E A, Bradstreet, H D, 1964. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. Proc. Nat. Acad. Sci., 52,119-125.
- SCHRADER LE, DONSKA D, JONG PE, PETERSON LA, 1972. Uptake and assimilation of ammonia-N and nitrate-N and their influence on the growth of corn (*Zea mays L*). Agron. J, 64, 690-695.
- SCHRADER LE, CATALDO DA, PETERSON DM, VOGELLANG BD, 1974. Nitrate reductase et glucose 6-phosphate dehydrogenase activities as influenced by leaf age and addition of protein to extraction media. Physiol. Plant., 32, 337-341.
- SCHUBERT RR and COKER GT, 1981. Nitrogen and carbon assimilation in N -fixing plants. Short-term studies using ¹³N and ¹⁴C. In advances in chemistry series 197. JWRoot and KA Krohn. eds. Amer. Chem. Soc., 317-339.
- SEETHALAKSHMI. and APPAJI-RAO N, 1979. Regulation of the activity mung bean (*Phaseolus aureus*) glutamine synthetase by amino acids and nucleotides. Arch. Biochem. Biophys., 196, 588-597.
- Serraj R and Sinclair TR, 1996a. Inhibition of nitrogenase activity and nodule oxygen permeability by water deficit. Journal of Experimental Botany,47, 1067-1073.
- Serraj R and Sinclair TR,1996b. Nitrogen fixation insensitivity to drought in soybean cultivar "Jackson". Crop Sci., 36, 961-968.

- Serraj R and Sinclair T R, 1997. Variation among soybean cultivar in dinitrogen fixation response to drought. *Agron. J*, 89, 963-969.
- Serraj R and Sinclair T R, 1998. Soybean cultivars variability for nodule formation and growth under drought. *Plant and soil* ,202,159-166.
- Serraj R, Drevon JJ, Obaton M, Vidal A, 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) Bradyrhizobium symbiosis. *J Plant Physiol.*, 140, 366–71.
- Serraj, R, Fleurat-Lessard P, Jaillard H, Drevon JJ, 1995. Structural changes in the intercortex cells of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ.* 18,455-462.
- Serraj R, Bona S, Purcell LC , Sinclair T R, 1996. Nitrogen fixation response to water-deficits in field-grown Jackson soybean. *Field Crops Res.*, 52,109-116.
- Serraj R, Bona S, Purcell LC, Sinclair T R, 1997. Nitrogen fixation response to water-deficits in field-grown Jackson soybean. *Field Crops Res.*, 52,109-116.
- Serraj R Allen HR , Sinclair T R, 1998. Soybean nodulation and N-fixation response to drought under carbon dioxide enrichment. *Plant Cell Environ.*, 31, 56-63.
- Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC, 1999a. Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.*, 50, 143-155 .
- Serraj R, Vadez V, Denison RF, Sinclair TR, 1999b. Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol.* ,119, 289-296.
- Serraj R, Vadez V, Purcell LC, Sinclair TR, 1999c. [Recent advances in the physiology of drought stress effects on symbiotic N₂ fixation in soybean.](#) In Highlights of Nitrogen Fixation Research . eds. Martinez and Hernandez. Kluwer Academic, New York, 49-55.
- Serrano A, Chamber-Perez MA, 1990. Nitrate reduction in *Bradyrhizobium sp (Lupinus)* strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.*, 136, 240–246.
- SERRES E, 1983. Ureides glyoxyliques et asparagine du soja: leur rôle dans le transport de l'azote. Thèse 3eme cycle. Université Paul Sabatier, Toulouse pp 67.
- SHANER DL and BOYER, 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays L*) leaves. *Plant Physiol.*, 58, 499-504.
- SIMPSON R J et DALLING J, 1981. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum L*) III Enzymology a transport of amino acids from senescing flag leaves. *Planta*, 15, 447-456.
- Sinclair TR, 1986. Water and nitrogen limitations in soybean grain production. I. Model development. *Field Crops Res.*,15,125-141.
- SINCLAIR TB and GOUDRIAN J, 1981. Physiological and morphological constraints on transport in nodule. *Plant Physiol.*, 67, 143-145.
- Sinclair T R, Muchow R C, Bennett J M, Hammond L C, 1987. Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation to drought in field-grown soybean. *Agon. J*, 79, 986-991.
- SINCLAIR TR, ZIMET AR, MUCHOW RC, 1988. Changes in soybean nodule number and weight in response to drought . *Field Crops Res.*,18,197-202.

- Sinclair TR, Soffes AR, Hinson K, Albrecht SL, Pfahler , 1991. Genotypic variation in soybean nodules number and weight. *Crop Sci.*, 31, 301-304.
- Sinclair TR, Purcell LC, Vadez , Serraj R, King CA, Nelson RV, 2000. Identification of Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Water Deficits. *Crop Science*, 40, 1803-1809.
- Sinclair T R, Vadez V, Chenu K, 2003. Ureide Accumulation in Response to Mn Nutrition by Eight Soybean Genotypes with N₂ Fixation Tolerance to Soil Drying. *Crop Sci.*, 43, 592-597.
- SINGH KB, 1993. Problems and prospects of stress resistance breeding, in chickpea, in : Singh KB, Saxena MC. eds , *Breeding for Tolerance in Cool-season Food Legumes*, 17-35.
- SLOANE RJ, PATTERSON M , CARTER TE, 1990. Field drought tolerance of soybean plant introduction. *Crop. Sci.*, 30, 118-123.
- SMIRNOF N, TODD P, STEWART GR, 1984. The occurrence of nitrate reduction in leaves of woody plants. *Ann. Bot.*, 54 , 363-374.
- Smith, L T, Pocard J A, Bernard T, Le Rudulier D, 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 170, 3142-3149.
- SOUALMI-BODJEMAA , MOYSE A, CHAMPIGNY ML, 1985. Modulation of nitrate reductase in wheat shoot and roots by nitrate. *Physiol. Vég.*, 23, 5, 869-875.
- SPRENT J I , 1971 . Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil*, special volume, 225-228.
- SPRENT J I , 1972 . The effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. IV. Effects on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. *New Phytol.*, 71, 603-611.
- SPRENT J I , 1981. Nitrogen fixation. PALEG LG , ASPINAL D eds *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants* . Academic press, New York, 131-143.
- SPRENT J I, AND SPRENT P, 1990. Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman and Halleds. London, United Kingdom .
- Stamford, N, Santos, D R, Silva, V M, Santos, C E R S , Monteiro, M C, 1990. Fixação do N₂ matéria seca do caupi em dois solos de semi-árido brasileiro submetido a deficiência hídrica. *R. bras. Ci. Solo.*, 14, 283-290.
- Stanfield B, Ormrod DP, Fletcher HF, 1991. Response of peas to environment. II. Effects of temperature in controlled environment cabinets. *Can. J. Plant Sci.*, 46, 195-203.
- STEPHENS B Det NEYRA CA, 1983. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.*, 71, 731-735.
- STEWART GB, and RHODES D, 1977. A comparison of the characteristics of glutamine synthetase and glutamate deshydrogenase from *Lemna minor* L. *New Phytol.*, 79, 257-268.
- STEWART GB, MANN AF , FENTEM PA, 1980. Enzymes of glutamate formation: Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase. In the *Biochemistry of plants*. Stumpf et Conn eds, 5, 271-328.

- Stitt M, Krapp A, 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment*, 22, 583–621.
- STOREY R and BEEVERS L, 1978. Enzymology of glutamine metabolism related to senescence and seed development in pea (*Pisum sativum* L). *Plant Physiol.*, 61, 494-500.
- Streeter J, 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical of reviews , Plant sciences , 7, 1, 1-21.*
- STREETER JC, 1972. Nitrogen nutrition of field-grown soybean plants: II Seasonal variations in nitrate reductase, glutamate dehydrogenase and nitrogen constituents of plant parts. *Agronomy J*, 64, 315-319.
- STREETER JC, 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.*, 63, 478-480.
- Streeter JG, 1981. Effect of nitrate in the rooting medium on carbohydrate composition of soybean nodules. *Plant Physiol.*, 63, 840-844.
- Streeter JG, 1982. Synthesis and accumulation of nitrite in soybean nodules supplied with nitrate. *Plant Physiol.*, 69, 1429-1434.
- STREIT L and FELLER U, 1982. Changing activities of nitrogen-assimilating enzymes during growth and senescence of Dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Z Pflanzenphysiol.*, 108, 273-281.
- STREIT L and FELLER U, 1983. Changing activities and different resistance to proteolytic activity of two forms of glutamine synthetase in wheat leaves during senescence. *Physiol. Vég.*, 21, 103-108.
- SUZUKI A, and GADAL P, 1982. Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiol.*, 69, 848-852.
- TALLEY DJ, WHITE LH, SCHMIDT RB, 1972. Evidence for NADH and NADPH-specific isozymes of glutamate dehydrogenase and the continuous inducibility of the NADPH-specific isozyme throughout the cell cycle of eucaryote *Chlorella*. *J Biol. Chem.*, 247, 7927-7935.
- TALOUIZTE A, GUIRAUD G, MOYSE A MORAL C, CHAMPIGNY ML, 1984. Effect of previous nitrate deprivation on ¹⁵N-nitrate absorption and assimilation by wheat seedlings. *J Plant Physiol*, 116, 113-122.
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C, 1994. Can glutamine synthetase activity levels be modulated in transgenic plants by the use of recombinant DNA technology. *Biochemistry Society Transaction*, 22, 915-920.
- Temple SJ, Heard J, Ganter G, Dunn K, Sengupta-Gopalan C, 1995. Characterization of a nodule-enhanced glutamine synthetase from alfalfa: nucleotide sequence, in situ localization and transcript analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 218–227.
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C, 1998a. Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant Molecular Biology*, 37, 535-547.
- Temple SJ, Vance CP, Gantt JS, 1998b. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends. Plant Science*, 3, 51–56.

- THIBODEAU PS and JAWORSKI EG, 1975. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. *Planta*, 127, 133-147.
- THOMAS H and STODDART JL, 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 83-111.
- TIRADO JL, 1987. Contribution à l'étude des activités glutamine synthétase et glutamine deshydrogénase comme marqueurs du métabolisme azoté chez la feuille de soja. Thèse doctorat ,Université de Montpellier, pp201.
- TRAVIS RL , REY JL, 1971. Correlation between polyribosome level and ability to induce nitrate reductase in dark-grown corn seedlings. *Plant Physiol.*, 48, 617-620.
- Treger A , Lecorre J, 1975. Manuel d'analyses des sels nutritifs dans l'eau de mer. Université de Bretagne occidentale. 11-22.
- TRIBOI-BLONDEL MM, 1978. Effet des différents régimes hydriques sur l'activité in vivo de la nitrate réductase dans les feuilles de dactyl. *CR Acad. Sc. Paris*, t.286 Serie D, 1795-1798.
- Trijbels F and Vogel GD, 1966. Dégradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 113, 292–301.
- TRINCHANT JC and RIGAU D J, 1982. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1385-1388.
- TSENOVA EN, 1972. Isolation and properties of glutamate deshydrogenase from pea chloroplasts. *Enzimologia*, 397-408.
- Tsonev T Velkova V, Georgieva K, Hyde PF, Jones HG, 2003. Low temperature enhances photosynthetic down-regulation in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Ann. Bot.*,91, 3, 343-352.
- Turner N C, 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil*, 58, 339-366.
- Udomprasert NL, Davis PH , Markitart DH, 1995. Effects of root temperatures on leaf gas exchange and growth at high air temperature in *Phaseolus acutifolius* and *Phaseolus vulgaris*. *Crop Sci.*, 35, 490-495.
- Uden G , 1997. Alternative respiratory pathways of E coli: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochem Biophys Acta.*, 1320, 217-34.
- Vadez V, Sinclair T R, 2001. Leaf ureide degradation and N₂ fixation tolerance to water deficit in soybean. *J. Exp. Bot.* ,1,52 (354), 153 - 159.
- Vance CP, Gregerson RG, Robinson DL, Miller SS, Gantt JS, 1994. Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Science* 101, 51–64.
- Vance CP, Miller SS, Gregerson RG, Samac DA, Robinson DL, Gantt JS, 1995. Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *The Plant Journal*, 8, 345–358.
- VENKATESWARLU B, MAHESWARI M, SAHARAN N, 1989. Effects of water deficit on N₂ (C₂ H₄) fixation in cowpea and groundnut. *Plant Soil.*, 114, 69-74.

- Vessey JK, Waterer J, 1992. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant*, 84, 171-176.
- VIGNES D , DJEKOUN A , PLANCHON C , 1986. Réponses de différents génotypes de soja au déficit hydrique. *Can. J. Plant. Sci.*, 66,247-255.
- Vincent JM, 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Sci. Publ., Oxford, UK.
- VINCENT JM, 1971. A manual for the practical study of root nodule bacteria (IBP) Handbook No 15, Blackwell Scientific Publication.
- Walsh KB, McCully ME, Canny MJ, 1989. Vascular transport and soybean nodule function: Nodule xylem is a blind alley, not a through way. *Plant Cell. Environ.*, 12, 395-405.
- Wanek W , and Arnold A, 2002. Difference in 15N signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N₂ fixation to plant N. *Journal of Experimental Botany*, 53, 371, 1109-1118.
- Wasfi M, 1983. Analyse de l'inhibition de la fixation symbiotique des légumineuses lors d'un apport de nitrate. Thèse Doct. 3eme Cycle, Université Paris-Sud, Orsay.
- Weiner H and Kaiser WM, 2000. Binding of 14-3-3 proteins is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters* 480, 217-220.
- WEISSMAN G, 1972. Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower. *Plant Physiol.*, 49, 138-141.
- Weisz PR, and Sinclair TR, 1987. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen. I. Role of nodule respiration. *Plant Physiol.*, 84, 900-905.
- Weisz PR, and Sinclair TR, 1988. A rapid non-destructive assay to quantify soybean nodule gas permeability. *Plant Soil*, 105, 69-78.
- Weisz PR, Denison RF, Sinclair TR, 1985. Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybeans. *Plant Physiol.*, 78, 525-530.
- WERY J, DESCHAMPS M, CRESSON-LEGER N, 1988. Influence of some agroclimatic factors and agronomic practices on nitrogen nutrition of chickpea (*Cicer arietinum L*). BECK DP and MATERON LA eds. Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture, I CARDA Netherlands, 287-299.
- Winkler RD, Blevins DG, Polacco JC, Randall DD, 1987. Ureide catabolism in soybeans. II. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. *Plant Physiol.*, 83, 585-591.
- WINTER BC and BURRIS RH, 1968. Stoichiometry of the adenosine triphosphate requirement for N fixation and H₂ evolution by a partially purified preparation of *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.*, 243, 940-944.
- WITTENBACH VA, ACKERSON RG, GIAQUINTA RT , HEBERT BB, 1980. Changes in photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase, proteolytic activity, and ultrastructure of soybean leaves during senescence. *Crop Sci.*, 20, 225-231.
- Witty JF, Minchin FR, Skot L, Sheehy JE, 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surveys Plant Molec Cell Biol.*, 3, 275-314.

-
- Wong PF, 1980. Nitrate and carbohydrates effects on nodulation and nitrogen fixation (acetylen reduction) activity of lentil (*Lense sculenta Moench*). Plant Physiol., 65, 78-81.
- WOORG and OSMOND BG, 1982. Stimulation of ammonia and 2-oxoglutarate dependent evolution in isolated chloroplasts by decarboxylation and the role of the chloroplast in photorespiratory nitrogen recycling. Plant Physiol., 69, 591-596.
- WYCH RDet RAINS DW, 1978. Simultaneous measurement of nitrogen fixation estimated by acetylen-etylene assay and nitrate absorption by soybean. Plant Physiol., 62, 443-448.
- YATES MG, 1980. Biochemistry of nitrogen fixation. In the biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol 5. Miflin eds. Academ Press NY, 1-63.
- Yoshioka H, Gregerson RG, Samac DA, Hoevens KC, Trepp G, Gantt JS, Vance CP, 1999. Aspartate aminotransferase in alfalfa nodules: Localization of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. Molecular Plant Microbe Interactions, 12, 263–274.
- YUE S, 1969. Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants. Plant Physiol., 44, 453-457.
- ZENGBE M, 1984. Contribution à l'étude du métabolisme des uréides chez le Soja (*Glycine max (L) Merr.*). Thèse de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier. pp190.
- ZENGBE M, OBATON M , SALSAC L, 1982. Evolution de l'activité nitrogénase et de la teneur en uréides chez le Soja (*Glycine max (L) Merr*). CR Acad. Sci. Paris, 294 serie III, 1113-1118.
- Zhang F and Smith DL, 1996. Inoculation of soybean (*Glycine max (L.) Merr.*) with genistein-preincubated *Bradyrhizobium japonicum* or genistein directly into soil increases soybean protein and dry matter yield under short season conditions. Plant Soil 179:233–241.
- Zhang F, Charles TC, Pan B, Smith DL, 1996. Inhibition of the expression of B. japonicum nod genes at low temperatures. Soil Biol. Biochem., 28, 1579–1583.
- ZHANG H. TREVOR C., CHARLES TC, BRIAN T DRISCOLL L, BALAKRISHNAN P, DONALD L S, 2002 . Low Temperature-Tolerant *Bradyrhizobium japonicum* Strains Allowing Improved Soybean Yield in Short-Season Areas. *Agronomy Journal* , 94, 870-875.