

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
En vue de l'obtention du Diplôme de Magistère en Sciences Agronomiques
Spécialité : Production Végétale
Option : Sciences et Techniques des Productions Végétales

***Effet de la Salinité sur la Physiologie
de la Fixation Symbiotique de l'Azote
Atmosphérique chez le Haricot (*Phaseolus
vulgaris L.*)***

Présente par : M. IREKTI Hocine

Directeur de Thèse : M. OUNANE S.M. (Professeur ENSA).

Année Universitaire 2010/2011

Membres du Jury : Président : M. AIDAOUI A. (Professeur ENSA). Examineur : M. KHELIFI L.
(Professeur ENSA). Examinatrice : Melle. BACHA F. (Chercheur INRA.A)

Table des matières

RESUME . . .	5
ABSTRACT . . .	6
ص غ ل م . . .	7
INTRODUCTION . . .	8
I- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE . . .	10
I.1- FORMATION ET STRUCTURE DES NODOSITES . . .	10
I.1.1- Formation des nodosités: . . .	10
I.1.2- Structure d'une nodosité de type déterminé. . .	11
I.2- FONCTIONNEMENT DES NODOSITES. . .	12
I.2.1- La nitrogénase. . .	12
I.2.2- L'approvisionnement des nodosités en substrats carbonés. . .	13
I.2.3- L'oxygène dans le nodule. . .	13
I.3- Barrière corticale à la diffusion de l'oxygène. . .	14
I.3.1- Adaptation de la conductance nodulaire . . .	14
I.4- PHYSIOLOGIE DES PLANTES SOUS STRESS SALIN . . .	15
I.4.1- Stress salin et hydrique et l'ajustement osmotique . . .	15
I.4.2- L'osmoprotection des plantes en présence de NaCl . . .	16
I.4.3- Rôle de l'acide abscissique et du potassium en conditions de stress salin . . .	16
I.4.4- Le stress salin au niveau cellulaire . . .	17
I.5- INFLUENCE DE NaCl SUR LE PROCESSUS D'INFECTION ET LA FORMATION DES NODOSITES. . .	18
I.5.1- Effet de NaCl sur les Rhizobium à l'état libre . . .	18
I.5.2- Effets de NaCl sur le processus d'infection et sur la formation nodulaire. . .	20
I.6- INFLUENCE DE NaCl SUR LA STRUCTURE ET LE FONCTIONNEMENT NODULAIRE. . .	21
I.6.1- Effet de NaCl sur la structure nodulaire. . .	21
I.6.2- Effet de NaCl sur l'activité nitrogénase. . .	21
I.6.3- Effets de NaCl sur la respiration et la diffusion de l'oxygène dans les nodosités. . .	22
II- MATERIEL ET METHODES. . .	23
II.1- Matériel biologique. . .	23
II.1.1- Matériel bactérien et préparation de l'inoculum. . .	23
II.1.2- Matériel végétal et culture des plantes. . .	23
II.2- mesure des échanges gazeux . . .	25
II.2.1- Principe de la mesure. . .	25
II.2.2- Analyse et dosage des gaz. . .	26
II.2.3- Méthode de calcul de l'éthylène (C ₂ H ₄) produit (ARA): . . .	27
II.2.4- Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) in-vivo en flux ouvert. . .	28
II.2.5- Traitement salin lors de la mesure de l'ARA. . .	28

II.3- Préparation des Coupes Nodulaires ET Analyse d'Images. . .	28
II.3.1- Traitements des plantes et prélèvement des nodosités . .	29
II.3.2- Différentes étapes de la préparation des coupes de nodosités . .	30
II.4- L'ANALYSE D'IMAGE . .	32
II. 4.1- Principe de l'analyse d'image . .	32
II.5- DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) dans les nodosités et les racines de haricot . .	33
II.5.1- Protocole d'extraction de l'ABA des racines et des nodosités de haricot . .	33
II.5.2- Principe du dosage Radio-Immunologique (RIA) de l'ABA. . .	34
II.6- TRAITEMENT DES PLANTES PAR L'ACIDE ABSCISSIQUE . .	35
II.6.1- Préparation de la solution mère d'ABA . .	35
III- RESULTATS ET DISCUSSIONS . .	37
III-1 EFFET DE LA SALINITE (NaCl) SUR L'ACTIVITE NITROGENASE DANS LES NODOSITES DE HARICOT . .	37
III.1-1- Effet du stress salin sur l'activité nitrogénase . .	37
III.1-2- Réponse de la nitrogénase à l'oxygène . .	38
III.1-3- Recherche de la pression en oxygène optimum pour l'activité nitrogénase . .	40
III.2- LA MORPHOMETRIE DES CELLULES DU CORTEX NODULAIRE PAR ANALYSE D'IMAGES . .	41
III.2-1- Effet du traitement NaCl sur les cellules du cortex nodulaire . .	41
III.3- IMPLICATION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) DANS L'OSMO-CONTRACTION DES CELLULES CORTICALES INDUITES PAR NaCl . .	46
III.3-1- Dosage de l'ABA dans les racines et les nodosités de haricot sous stress salin . .	46
III.3-2- Effet de l'apport d'ABA exogène sur l'activité nitrogénase . .	47
CONCLUSION GENERALE . .	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	51

RESUME

Le stress salin est l'un des principaux facteurs qui limite la production des légumineuses dans les régions arides et semi-arides particulièrement quand la nutrition azotée dépend principalement de la fixation symbiotique de l'azote.

Dans ce travail nous avons étudié l'effet à court terme de la salinité (NaCl) sur la fixation de l'azote chez le haricot cultivé en hydroponie.

Dans nos résultats, l'application de 0,1M NaCl dans la solution nutritive inhibe immédiatement l'activité réductrice d'acétylène (ARA). Cette inhibition peut être levée par une augmentation progressive de la pression d'oxygène externe (pO_2). Ceci indique que l'inhibition de l'activité nitrogénase est associée à la baisse de la perméabilité nodulaire à la diffusion de l'oxygène.

Pour comprendre le mécanisme de cette inhibition nous avons utilisé la technique de l'analyse d'image assistée par ordinateur sur des coupes semi-fines de nodosités de haricot. Il ressort que le traitement salin (0,1MNaCl) induit des changements morphométriques dans le cortex nodulaire interne obstruant ainsi les espaces intercellulaires et réduisant la perméabilité à la diffusion de l'oxygène dans le nodule.

Dans notre recherche de facteurs qui provoqueraient ces changements de formes cellulaires, il apparaît que l'acide abscissique (ABA), dosé en quantité importante dans les nodosités traitées par NaCl, est impliqué en tant que signal dans le mécanisme de changements morphométriques cellulaires. Ce résultat est confirmé par la baisse de l'activité nitrogénase (ARA) sous l'effet d'un apport exogène d'ABA.

Nos résultats, nous permettent de conclure que le traitement salin provoque une rétraction généralisée des cellules du cortex nodulaire interne ce qui limite la diffusion de l'oxygène dans le nodule. Les chaînes respiratoires des bactéroïdes vont ainsi avoir une production déficiente en ATP provoquant une baisse de l'activité nitrogénase.

MotsClés : Fixation d'Azote ; Nitrogénase ; NaCl ; Cortex nodulaire ; Diffusion d'oxygène ; Analyses d'images ; Acide Abscissique.

ABSTRACT

Salt stress is one of the major factors limiting legume production in arid and semi-arid region particularly when nitrogen nutrition depends upon symbiotically fixed nitrogen.

In this work, the effects of short term (NaCl) salinity on nodules of bean were studied on hydroponically-grown plants.

Acetylene reducing activity (ARA), were immediately inhibited by the application of the 0,1M NaCl in the nutrient solution. The stimulation of the nitrogenase activity by rising the external partial pressure of oxygen recovered this inhibition. This result indicated that the salt-stress is associated with a decrease in nodule permeability to oxygen diffusion.

Morphometric computation carried out using an image analysis technique on semi-thin nodules sections showed that the salt treatment induced a morphometric changes in the inner-cortex cells. These changes occlude the intercellular spaces and reduced the nodule permeability to oxygen diffusion.

The dosage of the abscissic acid (ABA) in salt-treated nodules indicate that the ABA is implied in the mechanism changes in cells morphometry. This result was confirmed by the decrease in the nitrogenase activity under exogenous abscissic acid application in root-nodules compartment.

Our results lead up to conclude that salt-stress induced a cells collapse in the inner cortex, resulting in low permeability to oxygen diffusion which induce a deficiency in the bactroides respiration and ATP production so, the nitrogenase activity was inhibited.

Key-words: Nitrogen fixation; Nitrogenase; NaCl; Nodular Cortex; Oxygen diffusion; Image analysis; Abscissic acide.

ص خلم

يعتبر الإجهاد الملحي أحد العوامل الرئيسية الذي يحد من إنتاج البقوليات في المناطق الجافة و شبه الجافة و خاصة عندما تعتمد التغذية الأزوتية أساسا على التثبيت التعايشي (Symbiotique) للأزوت. في هذا العمل قمنا بدراسة أثر على المدى القصير لملاح كلوريد الصوديوم (NaCl) على تثبيت الأزوت عند نبات الفاصوليا المزروعة عبر تقنية الزراعة المائية .

ضمن نتائجنا تبين أن تطبيق 0.1 مول من NaCl في المحلول الغذائي للنبات يبطئ فورا النشاط الإرجاعي للأستيلان (ARA) هذا التثبيت يمكن إزالته بواسطة زيادة تدريجية لضغط الأوكسجين الخارجي .

هذا يبين أن تثبيط نشاط النيتروجيناز يكون مرفوقا بانخفاض النفاذية الغدية لانتشار الأوكسجين. لفهم آلية هذا التثبيت استعملنا تقنية تحليل الصورة بالإستعانة بالحاسوب على قطع شبه رقيقة لعدت الفاصوليا. يتبين أن المعالجة الملحية (0.1 مول NaCl) تؤدي إلى تغيرات مورفومترية في النسيج الغدي الداخلي مما يتسبب في سد الفراغات ما بين الخلايا فتتخفض سماحية انتشار الأوكسجين في العدة.

في بحثنا عن العوامل التي قد تسبب هذه التغيرات لأشكال الخلايا، يبدو أن حمض الأبسيسيك، الموجودة بكمية كبيرة في العدة المعالجة بواسطة كلوريد الصوديوم (NaCl)، يتدخل بصفته إشارة في آلية التغيرات المورفومترية الخلوية. تم تأكيد هذه النتيجة بواسطة انخفاض نشاط النيتروجيناز تحت فعل إضافة خارجية لحمض الأبسيسيك .

نتخلص، من خلال نتائجنا هذه، أن المعالجة الملحية تسبب إنكماش معمم لخلايا النسيج الداخلي للعدت مما يحد من انتشار الأوكسجين في العدة.

و هكذا فإن السائل التنفسي للبكتيريوم سيشهد نقصا في إنتاج الـ ATP مما يتسبب في انخفاض نشاط النيتروجيناز.

الكلمات الدالة : تثبيت الأزوت ، نيتروجيناز ، كلوريد الصوديوم NaCl ، نسيج غدي، انتشار الأوكسجين ، تحاليل الصور ، حمض الأبسيسيك .

INTRODUCTION

Parmi les facteurs connus qui affectent les rendements des cultures, la salinité occupe la troisième position après le stress hydrique et la carence azotée. De plus, les contraintes salines et hydriques sont souvent rencontrées dans les mêmes milieux édapho-climatiques. Dans ces conditions, l'irrigation semble être une issue pour rétablir les rendements, malgré les risques de remontée progressive de sel en surface et son accumulation. Les concentrations atteintes deviennent alors non seulement toxiques pour la croissance des plantes mais dégradent aussi la structure des sols par, notamment, la dispersion des argiles. Il est alors très difficile de remédier à ce type de situation et pratiquement aucune culture ne peut être installée. Il s'ensuit donc, comme c'est le cas dans les pays du Maghreb, une désertification progressive de ces régions. Les surfaces cultivées menacées par ce fléau sont en constante augmentation et il apparaît donc nécessaire de remédier aux problèmes des cultures en sols salins, notamment par l'étude et la compréhension de certains mécanismes physiologiques du sel sur les plantes.

De fortes concentrations en sel peuvent réduire le développement des plantes, par l'augmentation du coût énergétique de la croissance des plantes (Yeo, 1983 ; Ashref et *al.*, 2008), par l'effet osmotique, par des effets ioniques spécifiques ou à travers des effets toxiques (Sanchez-Diaz et *al.*, 1982 ; Meloni et *al.*, 2008).

En présence de NaCl, plusieurs mécanismes physiologiques de la plante peuvent être modifiés et la plante doit faire face à trois principales contraintes : assurer un ajustement de la turgescence cellulaire, synonyme d'accumulation de solutés, maintenir un équilibre de nutrition minérale et éviter une accumulation excessive de sel.

Chez les légumineuses, la symbiose par son développement et son fonctionnement entre en compétition pour les disponibilités en carbones avec les besoins en maintenance de la plante (Schone et Gale, 1983 ; Mahajan et Tuteja, 2005). La photosynthèse est rapidement inhibée par le NaCl, principalement par l'augmentation de la résistance stomatique et la perturbation de la diffusion du CO₂ (Schone et Gale, 1983 ; Mahajan et Tuteja, 2005). Si le stress est modéré, il y a fermeture des stomates, ce qui provoque un stress thermique, conséquence de l'absence de transpiration, ainsi qu'un stress carboné (Sanchez-Diaz et *al.*, 1982).

La nutrition minérale des plantes peut aussi être perturbée par le NaCl. Souvent, le sodium (Na⁺) inhibe l'absorption de K⁺, Ca⁺⁺ et Mn⁺⁺ (Al-Khateeb, 2006), ou entre en compétition avec eux dans certaines structures, notamment celles des protéines. L'ion chlore (Cl⁻), quant à lui, réduit le transport du nitrate (NO₃⁻) (Dajic, 2006). Velagaleti et *al.* (1990) indiquent une forte accumulation de Cl⁻ dans les nodules soumis au stress salin mais qui ne semble pas avoir d'effet sur la fixation de N₂ ; le rôle de cette accumulation n'est pas encore bien connu.

Malgré toutes ces difficultés, beaucoup de plantes arrivent à s'adapter aux sols salés par des changements morphologiques, anatomiques, physiologiques et biochimiques (Kylin et Quatrano, 1975; Poljakoff-M, 1975 ; Ashref et *al.*, 2008). Ainsi, même chez les glycophytes, il existe une très large variabilité d'adaptation (Bayuelo-Jiminéz et *al.*, 2002),

allant des plantes les plus sensibles aux tolérantes (Greenway et Munns, 1980 ; Ashref et *al.*, 2008).

Les légumineuses sont caractérisées par leur capacité à s'associer avec des bactéries du genre *Rhizobium*. Cette symbiose leur confère une disponibilité directe de l'azote atmosphérique qui est réduit dans les nodosités par la nitrogénase des bactéroïdes. Leur intérêt est d'autant plus important que, dans les pays en voie de développement, l'utilisation d'engrais azotés très coûteux reste peu accessible, alors que les pays développés ont souvent abusé de l'utilisation de ces engrais pour augmenter leur production, mais au prix d'une pollution par les nitrates des sols, des cours d'eau et des nappes phréatiques.

Toutefois, dans des conditions de stress, telle la salinité, la fixation de l'azote devient l'une des fonctions physiologiques de la plante des plus vulnérables et plusieurs fonctions du métabolisme nodulaire seraient fortement perturbées.

Ainsi la nitrogénase, qui nécessite beaucoup d'énergie en forme d'ATP pour la fixation de l'azote atmosphérique, contraint néanmoins le nodule à réguler la quantité d'oxygène qui approvisionne les chaînes respiratoires, car tout excès de ce gaz altérerait la protéine de la fixation.

Ceci nous suggère d'entreprendre, dans le cadre de ce travail, la compréhension des mécanismes par lesquels le sel inhibe la fixation de l'azote. Cette compréhension nous permettra de mieux saisir les mécanismes de son interaction avec les facteurs de l'environnement, dans le but de contribuer à optimiser l'expression de la fixation symbiotique chez les légumineuses en général et chez le haricot en particulier.

Nous essayerons donc tout d'abord de mettre en évidence l'inhibition de la fixation de l'azote par NaCl. Nous rechercherons alors la relation de cette inhibition avec la diffusion de l'oxygène, élément très important, dans le nodule. Nous étudierons, par la suite, les mécanismes par lesquelles le sel agit sur cette diffusion ainsi que leur localisation dans les tissus nodulaires. Nous rechercherons, enfin, les facteurs qui seraient susceptibles d'induire ces mécanismes au niveau nodulaire.

I- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- FORMATION ET STRUCTURE DES NODOSITES

I.1.1- Formation des nodosités:

Plusieurs étapes caractérisent la formation des nodosités des légumineuses.

a. L'initiation nodulaire: Elle correspond à la fixation des bactéries sur les poils absorbants des racines de la légumineuse. Des signaux moléculaires sont échangés entre la plante et les rhizobium (Lerouge et *al.*, 1990). Ainsi la plante émet des flavonoïdes qui servent de chémoattracteurs pour les rhizobium spécifiques, qui à leur tour, émettent une protéine glycolipidique spécifique. Ainsi le nombre de rhizobium s'accroît et il se produit une colonisation des poils absorbants, leur courbure et l'induction de la division des cellules corticales de la racine.

b. Invasion bactérienne : Les bactéries pénètrent dans le poil absorbant et forment un cordon d'infection qui progresse à l'intérieur des cellules de la plante et parvient au niveau du cortex racinaire. Elles se multiplient intensivement dans ce cordon d'infection et provoquent sa rupture.

c. Maturation des bactéries: Les bactéries pénètrent individuellement par endocytose dans les cellules du cortex racinaire et forment des symbiosomes. Elles changent de forme et subissent une maturation qui leur confère la capacité de fixer l'azote; elles sont alors appelées bactéroïdes. Ces derniers sont entourés par une membrane plasmalémique dite membrane pér bactéroïdale. Les bactéroïdes continuent à se diviser en même temps que les cellules corticales, infectées ou non, qui se spécialisent alors pour former une nodosité fonctionnelle (Brewin, 1991).

d. La sénescence nodulaire : Cette phase représentant l'arrêt de l'activité fixatrice est caractérisée par une coloration verdâtre de la zone nodulaire infectée. Il s'en suit alors la dégénérescence des nodosités et la libération des bactéroides au niveau du sol.

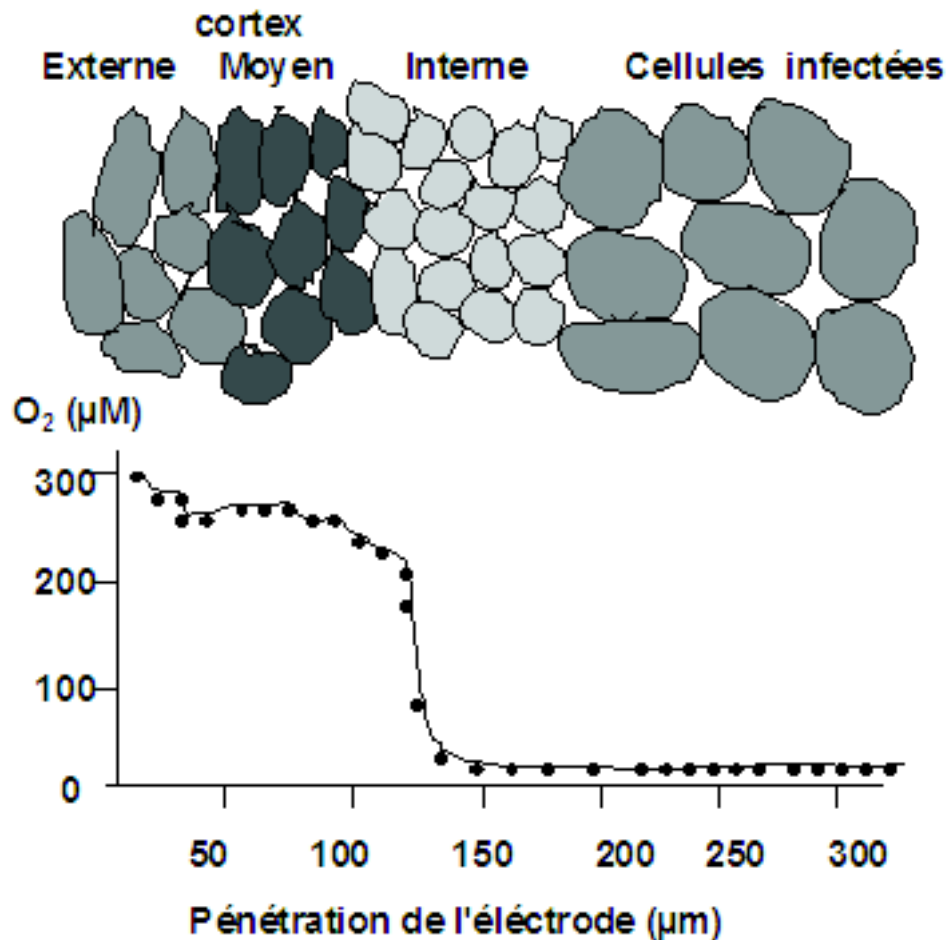


Figure I-1: Disposition des différents tissus du cortex nodulaire et détection de la concentration en oxygène avec une microélectrode en platine (électrode de Clark) (D'après Witty et al., 1986).

I.1.2- Structure d'une nodosité de type déterminé.

Il existe deux types de nodosités, les nodosités de type indéterminé (luzerne, pois, acacia...) qui sont dotées d'un méristème apical persistant assurant une croissance continue; les nodosités de type déterminé (Haricot, soja...) dans lesquelles le méristème cesse sa croissance à maturation (Newcomb et al., 1979), elles sont constituées alors d'une succession de couches cellulaires formant ainsi les différents cortex nodulaires (figure I-1).

a. Le cortex

Le cortex des nodosités peut être scindé en trois tissus distincts, disposés en couches concentriques et qualifiés de, cortex externe, moyen et interne (Van Cauwenberghe et al., 1993).

Le cortex externe est compris entre la surface externe de la nodosité et une couche de cellules sclérifiées à grosses parois qui le sépare du cortex moyen. Il est constitué principalement de cellules parenchymateuses et recouvert d'une matrice hydrophobe qui empêcherait l'adhésion de l'eau aux nodosités (Webb et Sheehy, 1991).

Le cortex moyen est compris entre les cellules sclérifiées du cortex externe et une couche de cellules très jointives appelées «boundary layer». Les cellules de ce cortex ont généralement des parois plus épaisses que les autres cellules, et les espaces intercellulaires forment 2 à 3 % du volume de la zone (Parson et Day, 1990). Ces espaces peuvent être occlus par des glycoprotéines (James *et al.*, 1991). Les traces vasculaires sont situées entre le cortex moyen et le cortex interne (Serraj *et al.*, 1994). Elles sont composées principalement d'éléments phloémiens et sont entourées par un endoderme et un péricycle de plusieurs couches cellulaires. Elles se terminent sans continuité au voisinage de l'apex de la nodosité (Walsh *et al.*, 1989).

Le cortex interne s'étend jusqu'à la zone centrale des cellules infectées. Il comprend la «boundary layer», constituée généralement d'une à trois assises de cellules disposées régulièrement, ne comprenant que de très petits méats gazeux (Bergersen et Goodchild, 1973 ; Weeb et Sheehy, 1991), et la zone limitrophe de la zone centrale comprenant 5% en volume d'espaces intercellulaires (Parson et Day, 1990).

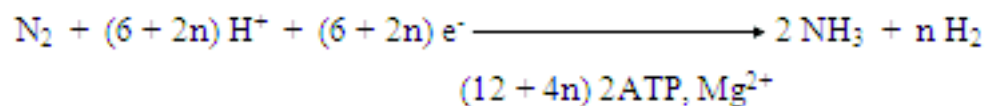
b. La zone centrale.

La zone centrale comprend les cellules infectées de grande taille comprenant les bactéroïdes à l'intérieur, et les cellules non infectées plus petites. Dans cette zone les espaces intercellulaires occupent 3 à 4 % du volume (Parson et Day, 1990) et constituent un réseau gazeux qui assure une aération homogène de la zone infectée (Bergersen et Goodchild, 1973a).

I.2- FONCTIONNEMENT DES NODOSITES.

I.2.1- La nitrogénase.

La nitrogénase est l'enzyme de la fixation qui permet aux bactéroïdes de réduire l'azote moléculaire en ammoniac. Elle n'est synthétisée qu'en microaérobie. Cette protéine est un complexe enzymatique à deux composants: la dinitrogénase réductase, qui est une ferroprotéine, d'environ 65 KD, et la dinitrogénase qui est une protéine de 200 à 270 KD, contenant généralement du fer et du molybdène (Bishop *et al.*, 1990). La réaction générale de la formation de l'ammoniac s'écrit de la manière suivante :



Cette réaction consiste en un transfert d'électrons de la ferrédoxine à la dinitrogénase réductase, puis à la dinitrogénase, et enfin au substrat. Deux molécules d'ATP sont hydrolysées par électron transféré. La réduction de l'azote est donc une réaction très coûteuse en énergie, elle consomme au moins 16 molécules d'ATP pour une molécule de N₂ réduite (Yates, 1980 ; Salsac *et al.*, 1984).

Certaines molécules ayant des similitudes avec N₂, peuvent servir de substrat à la nitrogénase. Ainsi, sous une pression de 10 Kpa d'acétylène, tous les électrons de la nitrogénase sont orientés vers la réduction de l'acétylène (C₂H₂) en éthylène (C₂H₄)

dosable par chromatographie en phase gazeuse. Ceci fournit une méthode simple de l'estimation de l'activité nitrogénase par l'activité réductrice d'acétylène (ARA) (Hardy *et al.*, 1968).

L'ammoniaque produit par la nitrogénase est libéré par les bactéroïdes dans le cytoplasme des cellules végétales, où il est assimilé sous forme de glutamine et de glutamate. Les formes d'exportation de l'azote sont principalement les amides chez les légumineuses tempérées et les uréides chez les légumineuses d'origines tropicales (Vance et Heichel, 1991).

I.2.2- L'approvisionnement des nodosités en substrats carbonés.

L'activité nodulaire constitue un puits important pour les substrats carbonés issus de la photosynthèse. Ainsi les nodosités utilisent 3 à 7% de la production journalière de photosynthétats (Warembourg, 1984).

Les photosynthétats parviennent à la nodosité sous forme de saccharose (Reibash et Streeter, 1983) et la grande majorité du carbone absorbé par les nodosités est utilisée soit par les chaînes respiratoires, soit réexportée avec les produits de l'assimilation de l'azote (Gordon *et al.*, 1985). Une faible proportion est incorporée dans les structures nodulaires, ou dans les réserves de carbohydrates, principalement sous forme de grains d'amidons (Kouchi et Yonema, 1984). Ces grains d'amidons s'accumulent principalement dans les cellules du cortex interne ou des cellules non infectées de la zone centrale de la nodosité (Hostak *et al.*, 1987). Ils ne sont pas mobilisés pendant la phase nocturne, où la nodosité utilise les réserves de la plante (Walsh *et al.*, 1987) mais lors d'une élévation excessive de la concentration en oxygène dissous pour stimuler la respiration et réabsorbé l'oxygène en excès nuisible à la nitrogénase (Naisbit et Sprent, 1993). La capacité fixatrice des nodosités n'est cependant pas stimulée à court terme par une élévation de la disponibilité en carbone, ce qui indique que celui-ci n'est pas le premier facteur limitant du fonctionnement des nodosités (Heckmann et Drevon, 1988).

I.2.3- L'oxygène dans le nodule.

Selon les mêmes auteurs (Heckmann et Drevon, 1988), les besoins énergétiques de la fixation nécessitent un niveau d'oxygénation suffisant des chaînes respiratoires pour produire et fournir l'ATP nécessaire à la réduction de l'azote moléculaire. Néanmoins, la nitrogénase nécessite un environnement microaérobie pour sa synthèse, ainsi que pour son fonctionnement, car le contact direct avec l'oxygène provoque l'inactivation de la nitrogénase. Ceci suggère l'existence dans les nodosités d'éléments régulateurs de la concentration en oxygène.

a. Les leghémoglobines.

Les leghémoglobines sont des ferroprotéines présentes dans le cytoplasme des cellules infectées des nodosités (Appleby, 1984), ainsi que dans les cellules non infectées à moindre concentration (Vandenbosh et Newcomb, 1988). Ces protéines ferreuses ont une très forte affinité pour l'oxygène moléculaire (Wittenberg *et al.*, 1972).

Le rôle de ces leghémoglobines est d'assurer l'approvisionnement en oxygène, en accélérant le flux diffusif d'O₂ en solution dans le cytoplasme vers les bactéroïdes et peut être vers les mitochondries des cellules infectées (Appleby, 1984). En effet, le faible flux diffusif de l'oxygène libre est complété par un flux de leghémoglobines oxygénées

qui migrent contre le gradient de concentration de l'oxygène de la surface des cellules infectées vers les bactéroïdes. Les leghémoglobines assurent ainsi une alimentation stable et soutenue en O₂, tout en réduisant simultanément les risques d'inactivation de la nitrogénase par O₂ libre (Hunt et *al.*, 1988).

b. Les chaînes respiratoires

Un des éléments majeurs dans l'établissement des conditions de microaérobie nécessaire à la fixation de l'azote, est le puits en oxygène que constitue la respiration. Selon Bergersen et Turner (1980) les bactéroïdes posséderaient 4 cytochromes oxydase d'affinité différente vis à vis de l'oxygène. Elles sont d'autant plus couplées à la synthèse de l'ATP que leur affinité à l'oxygène est forte. Elles assurent ainsi une protection de la nitrogénase contre l'oxygène libre en excès tout en étant adaptées aux besoins énergétiques important de la fixation (Bergersen et Turner, 1975). Cependant, la capacité d'adaptation des nodosités aux fortes variations de la pression d'oxygène externe dépendrait plus de phénomènes liés à la modification de la conductance corticale à l'oxygène, que de ces alternatives respiratoires (Weisz et Sinclair, 1987a ; Wilson et *al.*, 2006).

I.3- Barrière corticale à la diffusion de l'oxygène.

L'oxygène constitue pour la symbiose fixatrice d'azote un antagonisme par ces exigences contradictoires. Bien que la nitrogénase soit irréversiblement inactivée par l'oxygène, des quantités importantes d'O₂ au niveau des chaînes respiratoires bactéroïdales sont nécessaires pour produire l'ATP abondamment consommé par cette enzyme. Par conséquent, la plante a élaboré un système capable de fournir un flux important en oxygène aux bactéroïdes, tout en maintenant une atmosphère presque anaérobique dans l'environnement immédiat de la nitrogénase.

En faisant pénétrer une micro-électrode à oxygène à l'intérieur d'une nodosité de soja, Tjepkema et Yocum, (1974), et Witty et *al.* (1987), ont mis en évidence une zone de forte résistance à la diffusion de l'oxygène au niveau du cortex nodulaire (figure I-1). En effet, la concentration en oxygène décroît rapidement, au fur et à mesure de la pénétration de la micro-électrode dans le cortex interne, et devient indétectable dans la zone centrale. Ceci démontre l'existence d'un gradient en oxygène très important qui reflète le rôle primordial du cortex interne des nodosités dans le maintien des conditions de microaérobie, nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase par une résistance à la diffusion de l'oxygène (Dakora et Atkins, 1989 ; Layzell et Hunt, 1990).

I.3.1- Adaptation de la conductance nodulaire

Les nodosités sont en mesure d'adapter physiologiquement leur résistance corticale à la diffusion de O₂ : en réponse à des changements de pression d'oxygène, ou en présence de conditions qui interagissent avec l'activité nodulaire, tel le stress hydrique ou salin (Witty et *al.*, 1987; Hunt et Layzell, 1993; Roy, 1994). Ces variations de la résistance reflètent l'ajustement de la conductance nodulaire à l'oxygène dont sont capables les nodules.

Ainsi, quand la pression d'oxygène extérieure (pO₂) augmente, la nodosité protège sa nitrogénase en abaissant sa conductance à O₂ et, inversement, la nodosité est capable de

l'élever en cas d'appauvrissement du milieu en oxygène, mais avec un temps de latence (Criswell et al., 1977; Weisz et Sinclair, 1987b; Roy, 1994). Witty et al. (1984) illustrent bien cette adaptation de la barrière corticale à l'oxygène; lors d'une transition rapide d'un milieu gazeux à 21 Kpa (pression atmosphérique) à un mélange à 81 Kpa, il y a arrêt de l'activité fixatrice suite à une inactivation de la nitrogénase par l'oxygène; par contre, lorsque cette transition se fait d'une manière progressive l'activité nitrogénase (ARA) n'est pas inhibée à une pression de 85 kpa. La barrière de diffusion à l'oxygène serait donc modulable et participerait à la régulation de l'activité fixatrice. Sa modulation serait due à des modifications au niveau des espaces intercellulaires (Sheehy et al., 1985 ; Wilson et al., 2006).

Plusieurs auteurs expliquent que ces espaces pourraient être gazeux ou emplis d'eau. Ainsi Hunt et al. (1988), associent l'adaptation de la conductance nodulaire à l'oxygène à l'épaisseur de la phase liquide qui obstrue les espaces intercellulaires par des variations de longueur des espaces aqueux. Denison (1992) explique que cette phase liquide correspondrait en réalité à des mouvements d'eau entre de minuscules pores dans les cellules et les méats avoisinants. Cette sortie d'eau pourrait être à l'origine de déformation des cellules bordant les méats ce qui réduirait le volume de ces derniers et, de même, la diffusion de l'oxygène (Minchin et al., 1988 ; Naidoo et al., 2008).

Les mécanismes responsables de la migration de l'eau des cellules vers le compartiment apoplastique, pourraient être liés à la fourniture des photosynthétats (Vessey et al., 1988). La diminution du flux phloémique est responsable de l'accumulation des produits de la fixation de l'azote et de la baisse de la concentration du saccharose symplasmique, ceci peut être à l'origine de la sortie de l'eau dans les espaces intercellulaires (Walsh et al., 1989 ; Hasegawa et al., 2000).

Enfin, la nature exacte de la barrière à la diffusion de l'oxygène, sa localisation précise, et ses mécanismes physiologiques de contrôles, restent pour l'instant sujet à controverses et à études.

I.4- PHYSIOLOGIE DES PLANTES SOUS STRESS SALIN

I.4.1- Stress salin et hydrique et l'ajustement osmotique

Les stress salin et hydrique abaissent le potentiel hydrique du milieu externe et réduisent ainsi la croissance des plantes, mais selon des mécanismes physiologiques différents (Flowers et Yeo, 1986 ; Passioura, 1986 ; Erdei et al., 1990 ; Ahmed et al., 2005). Bien que l'ajustement osmotique ne soit pas accompli de la même manière pour ces deux cas de stress, la capacité relative des plantes à accumuler des solutés dans leurs tissus (ajustement osmotique) détermine partiellement leur capacité à tolérer ces deux types de stress (Richardson et McCree, 1985 ; Ghoulam et al., 2002). Dans le cas d'un stress hydrique, la plante effectue son ajustement osmotique en synthétisant des substances organiques (Hsiao et al., 1976), par contre, sous stress salin, l'ajustement est réalisé principalement par l'absorption d'ions inorganiques directement de la solution du sol (Prat et Fathi-Ettai, 1990).

Chez les légumineuses, le potentiel hydrique nodulaire est fonction du potentiel hydrique de la solution dans laquelle baignent les racines, indépendamment du potentiel

foliaire (Singleton et Bohlool, 1983, Maggio et *al.*, 2007). Sprent (1985) a montré que les effets des stress salin et hydrique sur la fixation de N₂ étaient différents, en comparant l'ARA de racines nodulées de soja immergées, soit dans une solution saline de chlorure de potassium (KCl) ou de sodium (NaCl), contrôlant ainsi le potentiel osmotique, soit dans une solution de mannitol qui permet de contrôler le potentiel matriciel et osmotique. Les sels inhibent très rapidement l'ARA en quelques minutes, et il y a réversibilité progressive s'ils sont éliminés par lavage intense (Sprent, 1985).

I.4.2- L'osmoprotection des plantes en présence de NaCl

Le premier problème pour tout organisme vivant dans des conditions de stress hydriques ou salins est de maintenir son état hydrique. Souvent ceci est réalisé par l'accumulation de solutés. Ces solutés accumulés ne doivent donc être, ni toxiques, ni gênants pour les fonctions métaboliques. Ils ne doivent pas, non plus, interférer avec les structures des protéines ou avec leurs fonctions (Ahmed et Ashref, 2008).

Un nombre limité de composés organiques (osmoprotectants) possèdent ces possibilités (Yancey et *al.*, 1982 ; Naidoo et *al.*, 2008). Parmi les substances organiques solubles les plus rencontrées, on retrouve la proline (Stewart et Lee, 1974), la glycine bêtaïne (Storey et Wyn Jones, 1975) et des carbohydrates à faible poids moléculaire, tels les sucres et les acides aminés (Popp, 1984). Ainsi il a souvent été constaté, lors d'un stress salin ou hydrique, qu'il y avait une accumulation de proline dans les tissus (Hasegawa et *al.*, 1984; Chandler et Thorpe, 1986 ; Slama et *al.*, 2008). Son addition dans un milieu salin améliore la croissance et la survie des cellules chez plusieurs espèces (Handa et *al.*, 1986). Elle est aussi citée comme étant impliquée dans l'osmorégulation cytoplasmique (Pollard and Wyn Jones, 1979), la stabilisation des protéines (Scobert et Tschesche, 1982), des membranes (Jolivet et *al.*, 1982) et permet aussi l'accumulation de l'azote et de substrats respiratoires pour faciliter la reprise en post-stress (Aspinall et Paleg, 1981). Néanmoins il a été suggéré que la proline ne serait qu'une substance symptomatique des stress (Hanson et Hirtz, 1982).

Chez les légumineuses, Pocard et *al.*, (1991) constatent après un stress salin de quelques jours, qu'il y a un passage de la glycine bêtaïne des racines vers les nodosités où il s'effectue une accumulation relative. Ils indiquent aussi que la glycine bêtaïne dans les nodosités stressées se dégrade plus rapidement que chez le témoin non traité et pourrait donc constituer un apport en carbone et en azote.

I.4.3- Rôle de l'acide abscissique et du potassium en conditions de stress salin

Il a été démontré que l'acide abscissique (ABA) participe dans de nombreux processus physiologiques chez les plantes. Notamment la stimulation des mouvements stomatiques (fermeture), l'augmentation de la croissance racinaire et l'accumulation de proline (Crelman et *al.*, 1990; Handa et *al.*, 1986; Raschke, 1975).

Plusieurs travaux montrent que lors d'un stress salin, la concentration d'ABA dans les feuilles augmente très significativement. Chez le sorgho, l'adaptation au stress salin pour le maintien de l'équilibre ionique et de la croissance est améliorée, sensiblement, par un apport exogène d'ABA (Amzallag et *al.*, 1990). De même, dans la racine de maïs, il existe une nette relation entre le stress hydrique et le niveau d'ABA (Ribaut et Pilet, 1991; Saab et

al., 1992). Toutes ces indications appuient le rôle de l'ABA dans l'augmentation du potentiel hydrique et de la régulation du transport de l'eau et des ions en présence d'un stress salin (Song *et al.*, 2008).

L'expression et la synthèse des protéines impliquées dans la régulation osmotique (osmotines), sont régulées par plusieurs mécanismes. Chez le tabac comme chez plusieurs espèces, l'ABA exogène induit la synthèse d'osmotines (Singh *et al.*, 1987 (3)). De plus, en présence d'ABA, il y a une forte accumulation de K^+ , ce qui induit l'augmentation du rapport K^+/Na^+ . Ceci suggère que la performance à tolérer relativement les stress salin ou hydrique chez certaines plantes, pourrait être liée à leur capacité à accumuler de fortes concentrations en K^+ (Rejili *et al.*, 2008).

Chez les légumineuses le maintien de la concentration en potassium de la plante permet une meilleure reprise de l'activité nodulaire en cas de retrait du sel du milieu (Wilson, 1970., Silva *et al.*, 2008). La synthèse de l'ABA, en engendrant une grande accumulation de potassium chez les plantes lors d'un stress salin (Rejili *et al.*, 2008), pourrait être un indicateur de tolérance à la salinité et engendrer ainsi la reprise de l'activité fixatrice d'azote dans les nodules.

I.4.4- Le stress salin au niveau cellulaire

Quand les plantes sont exposées à la salinité, les ions, particulièrement Na^+ et Cl^- , abaissent le potentiel osmotique externe. Il en résulte une réduction de la turgescence, et une accumulation excessive de ces ions dans les cellules, conduisant à l'inhibition de la croissance des plantes et de leur développement (Greenway et Munns, 1980). Les cellules procèdent alors à leur ajustement osmotique en se basant sur les solutés organiques et les ions (Rhodes, 1987; Maathius *et al.*, 1992). Néanmoins, l'ajustement doit se faire sans qu'il y ait accumulation importante des ions impliqués dans l'effet salin. Ceci est apparemment réalisé par les mécanismes qui régulent la sélectivité du K^+ par rapport au Na^+ , le transport de Cl^- à travers la membrane plasmique et la compartimentation de Na^+ et de Cl^- dans les vacuoles (Flowers *et al.*, 1977; Greenway et Munns, 1980; Binzel *et al.*, 1988).

Le stress salin (NaCl) n'a pas seulement un effet osmotique qui empêche l'absorption de l'eau, mais aussi d'autres effets qui peuvent perturber plusieurs fonctions ou constituants de la cellule. Souvent le Na^+ se substitue au Ca^{2+} dans le plasmaleme, il perturbe aussi l'intégrité de la membrane en occasionnant des changements dans sa structure (Blumental-Goldschmidt et Poljakoff-Mayber, 1986), sa composition en lipides et en protéines membranaires (Kuiper, 1984).

Les racines constituent la barrière primaire de l'absorption de Na^+ et de Cl^- par les plantes (Pitman, 1984; Flowers *et al.*, 1986; Clarkson, 1991). L'entrée des ions dans le cytoplasme est régulée par la membrane plasmique des cellules épidermiques, corticales ou endodermiques (Clarkson, 1991).

Maintenir une intégrité membranaire normale sous NaCl constitue une indication importante quant à la capacité d'une plante à tolérer le sel (Epstein 1980; Dwividi *et al.*, 1981; Morsche, 1985). Ainsi, plusieurs espèces répondent au stress par un changement des propriétés de leurs parois cellulaires. Il est souvent suggéré que la turgescence d'un tissu n'est pas impliquée dans la limitation de la croissance des plantes en conditions de

stress. Par contre, il est fait référence à l'implication des changements d'élasticité des parois cellulaires dans la diminution de la croissance (Termaat *et al.*, 1985; Erdei et Talinski, 1993). L'élasticité globale des tissus est un paramètre déterminant ; elle est plus développée chez le sorgho, plus tolérant au stress hydrique et salin, que chez le maïs plus sensible.

Dans les conditions de stress salin il y a accumulation excessive de Na^+ dans le cytoplasme (Katsuhara et Tazawa, 1986; 1988), ce qui provoque l'acidification du cytoplasme des cellules des plantes sensibles (Katsuhara *et al.*, 1989). Au contraire, les cellules des plantes tolérantes maintiennent une faible concentration en Na^+ (Lazfo et Cheeseman, 1986; Cheeseman, 1988) et un pH physiologique normal dans leur cytoplasme (Kuchitsu *et al.*, 1989 ; Haoula *et al.*, 2007).

Les ATPases protoniques (H^+ ATPases), associées aux membranes plasmiques et tonoplastiques, jouent un rôle déterminant dans la régulation du pH cytoplasmique (Serrano, 1984; Kurkdjian et Gurn, 1989). Ainsi, les activités ATPases de ces deux membranes pourraient être impliquées dans le phénomène d'adaptation des cellules au stress salin (Lerner *et al.*, 1983; Braun *et al.*, 1986; Reuveni *et al.*, 1990).

Le maintien du gradient de concentration de Na^+ et Cl^- à travers les membranes plasmique et tonoplastique est facilité par le gradient du potentiel électrochimique de H^+ ($-\mu\text{H}^+$), généré par l'ATPase à H^+ dans ces deux membranes (Sze, 1985 ; Reinhold *et al.*, 1989). Ce gradient est présumé fournir la force motrice pour la régulation intracellulaire de l'absorption de Na^+ et du Cl^- . L'idée dominante, d'après les connaissances actuelles, est que dans les conditions physiologiques, la sortie de Na^+ à travers la membrane plasmique se réalise grâce à un antiport Na^+/H^+ . Le Cl^- quant à lui est exclu par un phénomène passif, une simple diffusion accélérée par création d'un gradient électrochimique favorable à sa sortie, à travers la membrane plasmique, en utilisant l'énergie libre générée par l'ATPase à H^+ (Hameed et Ashref, 2008).

I.5- INFLUENCE DE NaCl SUR LE PROCESSUS D'INFECTION ET LA FORMATION DES NODOSITES.

I.5.1- Effet de NaCl sur les Rhizobium à l'état libre

Les partenaires de la symbiose répondent différemment aux contraintes salines et hydriques. Les bactéries tolèrent des potentiels hydriques nettement plus faibles que les cellules des plantes supérieures. Plusieurs raisons ont été invoquées par Sprent (1984), pour expliquer cette différence, notamment que les cellules bactériennes ne sont pas vacuolées et ne se plasmolysent pas; qu'une proportion relativement élevée de l'eau qu'elles contiennent est liée par des forces matricielles, une proportion plus faible servant de solvant; et enfin, contrairement aux cellules végétales, chez lesquelles la pression de turgescence est un facteur d'expansion des cellules, les cellules bactériennes peuvent se développer que leur contenu soit hypo, iso, ou hypertonique, par rapport à leur environnement (Tawfik, 2008).

L'inhibition, due à NaCl chez les rhizobium, passe principalement par l'inhibition de l'activité spécifique des enzymes par les ions impliqués, en plus de l'augmentation du potentiel osmotique du milieu, selon Elsheikh et Wood (1990).

Face aux fluctuations de l'osmolarité de l'environnement, les micro-organismes ont développé des stratégies adaptatives essentielles à leur survie et/ou à leur croissance. Ces stratégies d'adaptation sont contrôlées par la mise en œuvre d'activités métaboliques ou de transports spécifiques notamment pour le potassium, en plus de l'accumulation de divers solutés (Le Rudelier, 1993). Plusieurs micro-organismes accumulent lors d'un stress salin, des ions inorganiques tel le K^+ , des acides aminés, la bétaine ou des carbohydrates (Csnoka, 1989; Smith and Smith, 1989), le glutamate, la glutamine et la proline (Chien et al., 1992), ainsi que la glycine-bétaine (Le Rudelier, 1993 ; Patel et Pandey, 2007).

Dans les sols sodiques à pH élevé (pH = 10,5), la plupart des Rhizobium ne survivent pas, mais plusieurs espèces ou souches arrivent à survivre juste en dessous de ce niveau de pH (Bharkwaj, cité par Kassem et al., 1985).

Une large variation de la tolérance à la salinité peut être retrouvée chez des souches qui appartiennent à un même groupe d'inoculation (Steinborn et Roughley, 1975). Kassem et al. (1985) ont montré que la croissance de deux souches de Rhizobium meliloti était seulement ralentie par 600 mM NaCl. En travaillant sur la souche de Rhizobium meliloti (Be 151) Sauvage et al. (1983) ont observé que sa croissance n'est pas inhibée pour une concentration de 75 mM NaCl. Ils indiquent que l'inhibition apparaît à partir de 150 mM mais la souche reste viable à une concentration de 600 mM. Bernard et al. (1986), montrent pour leur part, que certaines souches de Rhizobium meliloti et d'*Azospirillum tumefaciens* peuvent tolérer des concentrations de NaCl de 1 M. Néanmoins, il est généralement admis, que la tolérance à NaCl, chez différentes espèces de rhizobium, varie de 0,1 à 0,65 M (Tu, 1981; Bernard et al., 1986 ; Tawfik, 2008).

Les souches de rhizobium isolées des sols salés sont généralement plus tolérantes à la salinité et elles arrivent plus facilement à établir la symbiose avec leurs plantes hôtes dans ces conditions (Rupela et Rao, 1987). Néanmoins Subbarao et al. (1990a), indiquent que chez les souches de rhizobium qui nodulent le pigeonpea (*Cajanus cajan*), les plus aptes à former des symbioses effectives ne sont pas nécessairement celles issues des sols salés.

D'après Singleton et al. (1982), il n'existe pas de relation directe entre le type de croissance rapide ou lente des souches et leur tolérance au sel. Mais les travaux d'Elsheikh et Wood (1990), sur des souches qui nodulent le pois chiche, et d'autre qui nodulent le soja, montrent que les souches à croissance rapide sont plus tolérantes que celles à croissance lente.

Enfin il ressort que la plus grande partie des souches de rhizobium tolérantes ou sensibles à la salinité, peuvent croître et survivre à des concentrations en sel qui sont inhibitrices voire létales pour la majorité des légumineuses vivrières et fourragères. Singleton et al. (1982) suggèrent, en effet, que la possibilité des rhizobium à croître et à survivre n'est donc pas un facteur limitant pour la fixation de N_2 . De même, Velagalati et Marsch (1989) n'ont pas trouvé de corrélation nette entre l'halotolérance intrinsèque d'une souche de rhizobium évaluée ex-planta et l'halotolérance de la symbiose. Par conséquent dans la recherche des causes d'inhibition de la fixation symbiotique de l'azote par NaCl, l'accent doit être porté principalement sur les aspects de la symbiose autres que la survie des souches de Rhizobium, c'est à dire sur les aspects physiologiques de la fixation (Parvaiz et Satyawati, 2008).

I.5.2- Effets de NaCl sur le processus d'infection et sur la formation nodulaire.

L'infectivité nodulaire dans la symbiose rhizobium-légumineuses nécessite une interaction complexe entre les poils absorbants racinaires de la plante hôte, la souche de rhizobium et le milieu environnant. Le sel affecte les différentes phases de la symbiose, la survie et la croissance dans la rhizosphère des rhizobium et de la plante hôte, l'infectivité des poils racinaires, l'initiation et le développement nodulaire (Subbarao et *al.*, 1990b).

D'après Velagalati et *al.* (1990), l'initiation nodulaire est moins sensible à la salinité que le développement ultérieur des nodosités. De plus, l'infection est moins sensible à la salinité lorsque celle-ci est de type intracellulaire que lorsqu'elle se fait via les poils absorbants (Sprent et Zahran, 1988). Néanmoins, la sensibilité de la nodulation au sel pourrait être due à un effet sur l'interaction pour la symbiose entre la bactérie et son hôte (Berstein et Ogata, 1966). Les processus d'adhésion et de prolifération des rhizobium à la surface racinaire qui précèdent l'infection des cellules de la plante hôte sont sensibles à la salinité (Singleton et Bohlool, 1984). En effet, le sel provoque une baisse de la colonisation des rhizobium et un raccourcissement des poils absorbants racinaires (Tu, 1981), une diminution de leur nombre et leur déformation (Rupela et Rao, 1987), une inhibition de leur développement (Sprent et Zahran, 1988), la formation d'un mucilage autour des racines (Lakshmi-Kumari et *al.*, 1974), ainsi que la baisse de la sensibilité de ces derniers au rhizobium (Tu, 1981), ce qui affecte l'infection et réduit la nodulation.

La salinité affecte aussi le nombre et la masse nodulaire (Berstein et Ogata, 1966; Singleton et Bohlool, 1984) mais la diminution du nombre de nodules par plante est partiellement compensée par l'augmentation de la taille des nodosités (Youcef et Sprent, 1983; Singleton et Bohlool, 1984). Selon les espèces, l'inhibition du poids nodulaire par la salinité est variable. Chez alfalfa elle peut atteindre 80% aux fortes concentrations en NaCl, alors que chez le soja elle n'est que de 23% en moyenne (Berstein et Ogata, 1966).

L'apparition de nouvelles générations de nodosités est aussi affectée par le sel qui à fortes concentrations, provoque des nécroses nodulaires (Youcef et Sprent, 1983). Néanmoins, dans le cas où le stress serait levé, il peut y avoir une reprise de la nodulation surtout chez les espèces à nodosités de type indéterminé qui possèdent des tissus méristématiques persistants à l'origine de cette reprise (Vance et *al.*, 1980). Par contre, chez les espèces à nodosités de type déterminé la reprise de la nodulation n'est pas évidente, celles-ci ne possédant pas de tissus méristématiques persistants (Vance et *al.*, 1980).

Sous les climats secs, la précocité de la nodulation est importante car le stade de l'infection échappe plus rapidement à la contrainte de dessiccation du sol, mais les combinaisons souches-cultivars, caractérisées par une nodulation précoce, résistent mieux à la sécheresse qu'à la salinité (Sprent et Zahran, 1988). Enfin, Berstein et Ogata (1966), indiquent qu'il existe un effet inhibiteur du sel sur le développement des racines, mais que celui-ci ne se traduit pas par l'inhibition de la nodulation.

Tous ces effets nous conduisent à conclure que le sel agit sur toutes les phases de la formation des nodosités, mais à des degrés différents.

I.6- INFLUENCE DE NaCl SUR LA STRUCTURE ET LE FONCTIONNEMENT NODULAIRE.

I.6.1- Effet de NaCl sur la structure nodulaire.

Le sel peut induire des modifications dans la structure et l'ultrastructure nodulaire. Ainsi, des nodosités issues de plantes cultivées en milieux salins présentent une augmentation d'épaisseur de leur cortex, interne et externe, et une grande expansion des espaces pér bactéroidiens (Fougère et *al.*, 1991). Le sel provoque aussi une accumulation de granules d'amidon dans les cellules du cortex interne des nodosités (Fougère et *al.*, 1991; James et *al.*, 1993 ; Drevon et *al.*, 1995). Fougère et *al.* (1991), expliquent que l'augmentation de l'épaisseur des cortex nodulaires limite la diffusion de l'oxygène ; par conséquent, il y a réduction du métabolisme en général, ce qui peut expliquer l'accumulation d'amidon. Toutefois, cette accumulation n'est pas retrouvée dans les nodosités de plantes cultivées en présence de sel sous faible luminosité de l'ordre de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$, ce qui peut s'expliquer par une photosynthèse déficiente qui alimente moins les nodosités en substrats carbonés (James et *al.*, 1993 ; Jaleel et *al.*, 2008).

D'autres modifications ont été constatées dans les nodules traités pendant plusieurs semaines par NaCl, notamment l'augmentation des cellules vacuolées dans la zone infectée et la dégradation des bactéries dans la zone externe des cellules infectées (James et *al.*, 1993).

I.6.2- Effet de NaCl sur l'activité nitrogénase.

De nombreux auteurs ont observé une baisse de l'efficacité de l'activité nitrogénase en présence de sel. L'intensité de cette baisse est liée à la concentration en sel, au temps de son application (Sprent, 1972) et à l'âge des nodosités (Bekki et *al.*, 1987).

Sprent (1972), constate que le sel induit une inhibition de l'activité nitrogénase rapidement après son application, tandis qu'en présence de mannitol (non-électrolyte) l'inhibition n'apparaît que deux heures après. Ceci suggère que l'effet initial de NaCl, n'est pas un effet osmotique, mais serait plutôt d'ordre métabolique (Manivannan et *al.*, 2008), et impliquerait une altération de la respiration (Bayuelo-Jiménez et *al.*, 2003) notamment nodulaire. En effet, la respiration des bactéroïdes fournit de l'ATP et du pouvoir réducteur à la nitrogénase, son ralentissement a donc un effet direct sur la fixation de l'azote (Bekki et *al.*, 1987). Cette diminution de la consommation de l'oxygène par les bactéroïdes, en présence de NaCl, serait provoquée par une baisse de la diffusion de l'oxygène dans le nodule (Delgado et *al.*, 1993; Serraj et *al.*, 1994).

Au contraire Singleton et Bohlool (1983), attribuent la baisse de l'activité nitrogénase à un effet du sel sur le potentiel hydrique, beaucoup plus qu'à des mécanismes propres au fonctionnement nodulaire, à l'exception des fortes concentrations en NaCl. Pocard et *al.* (1984), renforcent cette idée, en levant partiellement l'inhibition de la fixation due à un stress hydrique, par l'apport de la glycine-bétaine comme osmorégulateur (Meloni et *al.*, 2008).

L'hypothèse d'un effet systémique du sel par son action sur la partie aérienne a aussi été suggérée. Dans les conditions de stress salin, le stress osmotique induit rapidement la fermeture des stomates ce qui affecte le niveau de la photosynthèse, comme observé chez le haricot (Pinhero et *al.*, 2008). La photosynthèse assurant l'alimentation en carbone du

partenaire bactérien, la baisse d'approvisionnement en carbohydrates des nodosités limite donc la respiration et la capacité fixatrice des bactéroïdes (Bekki et *al.*, 1987).

Il a également été indiqué que l'effet inhibiteur du sel sur l'activité nitrogénase, pourrait résulter d'une baisse de la concentration en malate, ainsi que d'une diminution de la quantité de protéines solubles nodulaires, et notamment la leghémoglobine (Delgado et *al.*, 1993), cette dernière ayant le rôle de transporteur d'oxygène vers les bactéroïdes dans les nodosités.

Dans le cas de la nitrogénase purifiée, le sel affecte les propriétés catalytiques et physiques de l'enzyme (Deits et Howard, 1990), mais seule la Molybdo-Ferro-protéine, semble avoir une interaction avec le sel. En effet il affecte le transfert d'électrons vers le substrat, d'où la baisse de l'activité nitrogénase (Burns et *al.*, 1984).

I.6.3- Effets de NaCl sur la respiration et la diffusion de l'oxygène dans les nodosités.

Comme nous venons de le constater précédemment, l'une des principales hypothèses qui explique l'inhibition de l'activité nitrogénase en présence de sel, propose un mécanisme qui affecte la diffusion de l'oxygène dans le nodule, par conséquent la respiration nodulaire. Plusieurs auteurs ont indiqué que la diffusion de l'oxygène à travers le cortex nodulaire est réduite sous l'influence d'un stress hydrique (Durand et *al.*, 1987; Guerin et *al.*, 1990; Weisz et *al.*, 1985; Ralston et Ismande, 1982). De même, le stress salin provoque la baisse de la diffusion de l'oxygène dans les nodosités (Delgado et *al.*, 1993; Serraj et *al.*, 1994). Serraj et *al.* (1994), concluent par une mesure directe de la consommation de l'oxygène par les nodosités de soja que la perméabilité des tissus à l'oxygène diminue en présence de NaCl (Jaleel et *al.*, 2007b). Cette situation provoque une baisse de la respiration des bactéroïdes et stimulerait les voies fermentaires dans le nodule (Delgado et *al.*, 1993; Pinheiro et *al.*, 2008). En effet, le stress salin induit une augmentation de la production d'éthanol (C₂H₅OH) (Serraj et *al.*, 1994), et une stimulation de l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), signe d'un déficit en oxygène (Delgado et *al.*, 1993). Ces données appuient l'hypothèse d'une baisse de la diffusion de l'oxygène dans les nodosités en présence de sel.

II- MATERIEL ET METHODES.

II.1- Matériel biologique.

II.1.1- Matériel bactérien et préparation de l'inoculum.

Dans ce travail, nous avons utilisé la souche *Rhizobium tropici* CIAT899. Les souches mères sont conservées à 4°C dans des tubes à vis contenant du milieu YEM (Tab II.1) gélosé incliné. L'inoculum est préparé par repiquage de ces souches dans des erlens de 250 ml contenant 100 ml de YEM liquide. La croissance et la culture des bactéries sont réalisées à 28°C avec agitation pendant 24 à 36 heures.

Tableau II. 1 : Composition du milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent J.M., 1970)

Solution minérale BERGERSEN concentrée 10 fois	
KCl	1,0 g
FeCl ₃	0,2 ml
CaCl ₂	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
Eau distillée	qsp 1 litre
Milieu YEM Final	
Solution minérale	100 ml
Eau de levure	100 ml
Mannitol	10 g
Eau distillée	qsp 1 litre
Ajuster à pH 7 avec NaOH	
Ajouter 15 g . l ⁻¹ de gélose pour un milieu gélosé	
Stérilisation 20 min à 120°C	

II.1.2- Matériel végétal et culture des plantes.

Pour sa partie physiologique, la légumineuse modèle utilisée dans ce travail est le haricot, *Phaseolus vulgaris.*, cultivar S102 d'origine méso-américaine. Ce matériel provenant du CIAT, nous a été fourni par le Professeur Bannerot de l'INRA Versailles.

II.1.2.1- Stérilisation et germination des graines

Les graines de haricot sont stérilisées en surface à l'hypochlorite de calcium (33,3 g l⁻¹) pendant 30 min ; elles sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile et mises à germer dans de la perlite stérile à 28 °C, pendant 72 h, et à l'obscurité. L'inoculation est alors réalisée par l'apport de 100 ml d'inoculum liquide contenant 10⁸ à 10⁹ bactéries

ml^{-1} . L'inoculation des graines au semis permet une nodulation plus précoce et ainsi une indépendance rapide vis à vis de l'azote combiné de complément. Néanmoins, nous effectuons une deuxième inoculation à titre préventif au moment du repiquage des plantules dans leurs flacons de culture par un apport de 3 ml d'inoculum.

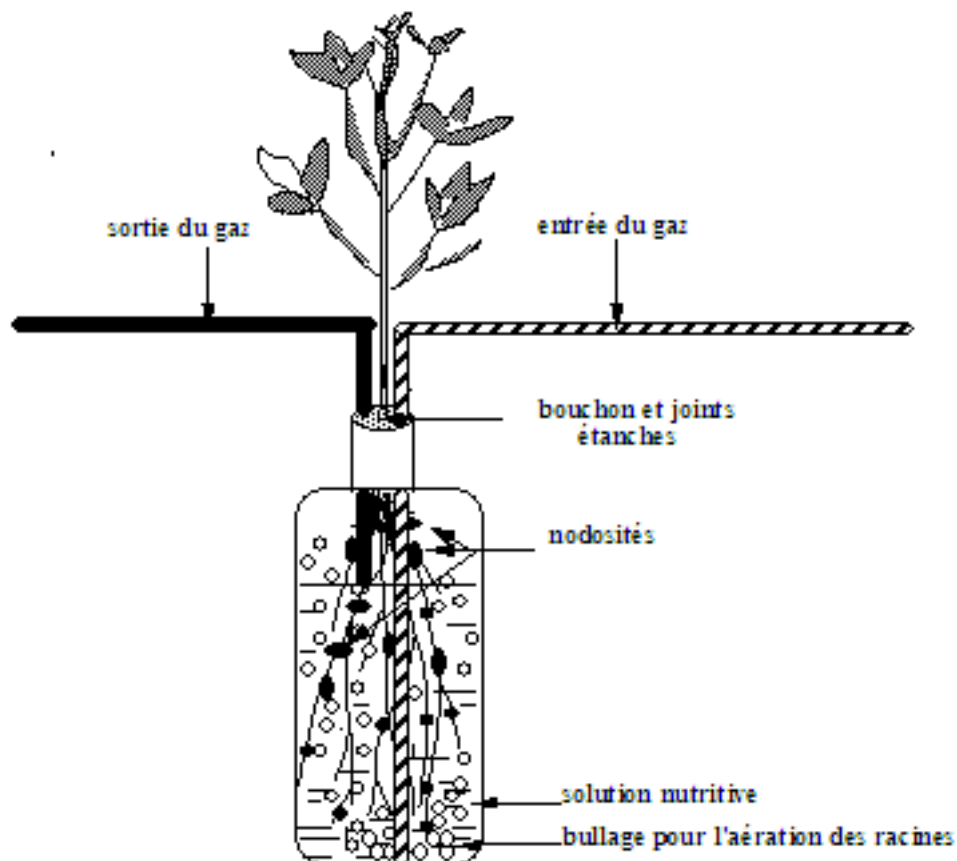


Figure II-1 : Dispositif de culture des plantes en hydroponie

II.1.2.2- Culture hydroponique.

Après leur germination les plantules de haricot sont transférées dans des flacons de 1000 ml de volume contenant une solution nutritive (Tab II.2) pour la culture hydroponique (figure II-2). Cette solution nutritive est renouvelée une fois par semaine. Pendant cette période, la baisse du niveau de la solution due à l'évapotranspiration est compensée par un apport d'eau distillée. L'aération du compartiment racinaire est assurée par un bullage d'air comprimé à un débit de 400 ml min^{-1} . Le pH de la solution est maintenu voisin de 7 par un apport de carbonate de calcium à saturation lors du renouvellement de la solution. Pendant les trois premières semaines de culture, un apport de 2 mM d'urée vient pallier la carence en azote qui se produirait entre l'épuisement des réserves cotylédonnaires et l'établissement de la symbiose. A cette concentration, l'urée ne perturbe pas la nodulation ni chez le soja (Harper et Cooper, 1971) ni chez le haricot (Hernandez et Drevon, 1991).

Les plantes sont cultivées en serre, avec un complément de lumière de $600 \mu\text{moles}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fourni par des lampes à iodure métallique assurant ainsi une photopériode de 16h de jour. La température de la serre est régulée par un thermostat à 25°C diurne

et 20°C nocturne. Cette régulation se fait, en hiver, par un chauffage avec un système de radiateur et, en été, par un refroidissement induit par un système d'extracteurs d'air à l'avant et d'un ruissellement d'eau froide sur des alvéoles au fond de cette serre. Des vaporisateurs maintiennent proche de 70% le taux d'humidité relative dans la serre.

Tableau II. 2 : Composition de la solution nutritive

Macro-éléments	concentration finale (mM)
KH ₂ PO ₄	0,25
CaCl ₂	3,3
K ₂ SO ₄	1,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,05
Oligo-éléments	concentration finale (µM)
H ₃ BO ₃	4
MnSO ₄ .H ₂ O	6,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,55
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,55
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,12
Séquestrène (Fe 100 SG)	0,016 gl ⁻¹

II.2- mesure des échanges gazeux

II.2.1- Principe de la mesure.

La nitrogénase, enzyme de la fixation d'azote, peut réduire plusieurs substrats. En effet, outre l'azote et les protons, cette enzyme réduit l'acétylène en éthylène (Dilworth, 1966). A une pression partielle de 10%, l'acétylène inhibe totalement et réversiblement la réduction des autres substrats de la nitrogénase. Dans ce cas, tous les électrons alloués à la nitrogénase servent à réduire l'acétylène en éthylène, et le dosage de ce gaz permet donc d'évaluer théoriquement l'activité réductrice globale de l'enzyme (Hardy et *al.*, 1968). Cette mesure de la quantité totale des électrons transférés à l'acétylène par la nitrogénase est appelée activité réductrice d'acétylène (ARA).

Cependant, des expériences réalisées sur plusieurs espèces de légumineuses dont le haricot, ont mis en évidence une inhibition de l'activité nitrogénase et respiratoire des nodosités par l'acétylène (Minchin et *al.*, 1983 ; Minchin et *al.*, 1986 ; Gerbaud, 1990). Cette baisse semble être corrélée à une baisse de la perméabilité à l'oxygène dans le cortex des nodosités (Roy, 1994). L'effet inhibiteur de l'acétylène apparaît quelques minutes après l'exposition des nodules à ce gaz. Il se produit une chute de la production de C₂H₄, mais celle-ci est atténuée chez les plantes bien alimentées en phosphore inorganique (Ribet et Drevon, 1995). De plus, cet effet est limité pour des plantes en culture hydroponique (Drevon et *al.*, 1988), vraisemblablement parce que la perméabilité de leur nodosité est plus faible que celle des plantes cultivées sur substrat solide (Drevon, Comm. personnelle). Minchin et *al.* (1983) considèrent que la meilleure estimation du potentiel de l'activité de la nitrogénase, par cette méthode, correspond à l'optimum mesuré au début des expériences,

avant le déclin dû à l'acétylène. Toutefois, si le débit des gaz est faible, l'équilibre des gaz dans l'incubateur risque d'être atteint après le début du déclin de l'ARA. Dans ce cas, la mesure ne traduit pas le potentiel réel de l'ARA optimale. Pour y remédier, il importe pour les mesures d'ARA in-situ en flux ouvert, de travailler à des débits de gaz égaux ou supérieurs à 0,5 volume / minute du volume d'incubation.

II.2.2- Analyse et dosage des gaz.

Le dosage de l'éthylène et de l'acétylène est effectué par chromatographie en phase gazeuse (figure II-2), sur un appareil Delsi série 330. Cet appareil est équipé d'une vanne pneumatique 6 voies à prélèvement et injection automatique des échantillons gazeux. L'échantillonnage se fait donc, soit automatiquement à l'aide d'une boucle d'échantillonnage de 0,5 ml, soit manuellement par des prélèvements et des injections à la seringue à raison de 0,5 ml par échantillon.

L'échantillon de gaz est porté à 100°C au niveau de l'injecteur. La séparation des différentes molécules qui composent le gaz s'effectue à 80°C (température du four) dans une colonne Porapak T de 2 m de long et de 3,2 mm de diamètre. Le gaz vecteur utilisé est l'azote à un débit de 30 ml min⁻¹.

En sortie de la colonne, les molécules sont brûlées dans un détecteur à ionisation de flamme d'hydrogène. Les molécules qui brûlent génèrent des ions et des électrons qui sont collectés sur une électrode de collecte. En établissant une différence de potentiel entre le sommet du brûleur et l'électrode, on obtient un courant dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de molécules éluées de la colonne. Le courant produit étant très faible, il est amplifié avant d'être transmis à un enregistreur-intégrateur de type Chromjet SP 4400, qui trace alors les chromatogrammes et intègre les surfaces des pics. Ce type de détecteur utilisé est très sélectif, il est spécifique des atomes C et H. Il est adapté à l'analyse des composés organiques et sa sensibilité est d'autant plus élevée que ces composés ne contiennent que peu ou pas d'autres atomes que C et H. Pour le dosage de C₂H₂ et C₂H₄, la polarité du détecteur est réglée à 250 V, et sa température à 300°C.

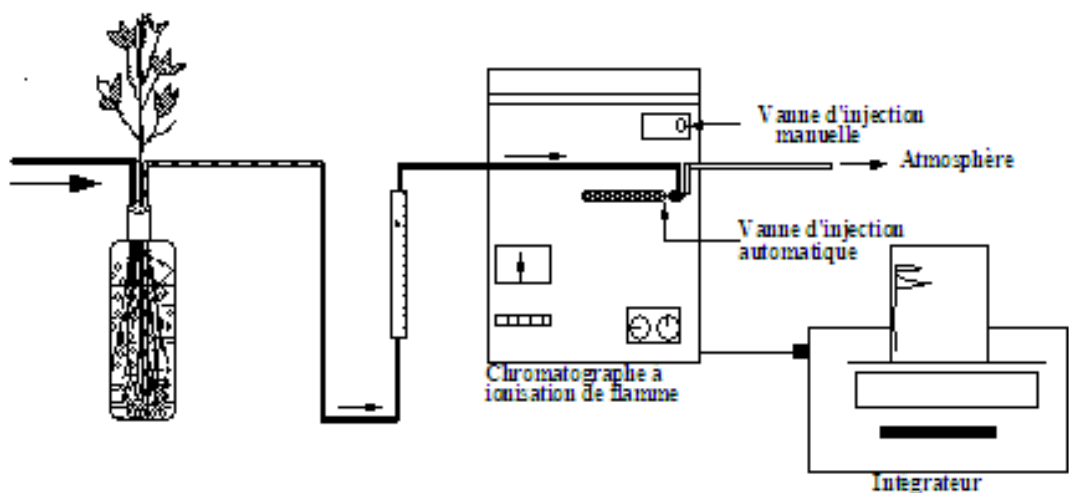


Figure II-2: Dispositif de mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) en flux ouvert in-vivo.

II.2.3- Méthode de calcul de l'éthylène (C₂H₄) produit (ARA):

Le signal du chromatographe étant proportionnel à la quantité de produit analysé, nous avons:

$$ne = K.Ae \text{ et } n = K.A \Rightarrow ne / Ae = n / A$$

$$\Rightarrow n = (ne A) / Ae. \text{ équation (a)}$$

Où :ne = nombre de moles C₂H₄ prélevées dans l'étalon et dosé dans le chromatographe.

n = nombre de moles C₂H₄ prélevées dans l'échantillon et dosées dans le chromatographe.

A = surface du pic d'éthylène de l'échantillon.

Ae = surface du pic d'éthylène de l'étalon.

L'expression de (ne) en fonction de la concentration en C₂H₄ dans l'incubateur donne :

$$ne = Ne ve / Ve \text{ équation (b)}$$

où :Ne = Nombre de moles de C₂H₄ dans le flacon étalon

Ve = volume du flacon étalon (Ve = 575 ml contenant 0.5 ml de C₂H₄ pur)

ve = volume prélevé dans l'étalon (en général 0.5 ml).

En confiné, le nombre de moles d'éthylènes présents dans l'échantillon au moment du dosage est :

$$N = (n / v) V \text{ équation (c).}$$

(où V = volume d'incubation et v = volume prélevé dans l'échantillon)

$$\Rightarrow N = (ne A V) / (Ae V) \text{ d'après l'équation (a).}$$

$$\Rightarrow N = (Ne ve A V) / (Ae v Ve) \text{ d'après l'équation (b).}$$

A la température du laboratoire, qui est en moyenne de 20°C, le volume d'une mole de gaz est de 24200 ml, le nombre de moles d'éthylène présents dans le flacon étalon est donc :

$$Ne = vei / 24200 \text{ moles.}$$

Où vei = volume d'éthylène pur introduit dans le flacon étalon (vei = 0.5 ml), ce qui conduit à la formule générale de **l'ARA en confiné** :

$$N = \frac{A}{Ae} \frac{vei}{24200} \frac{V}{Ve} \frac{ve}{v} 10^5 \mu\text{moles C}_2\text{H}_4.$$

Nos mesures étant réalisées en flux ouvert nous mesurons donc la concentration d'éthylène par ml d'efflux et par unité de temps. L'équation (c) devient alors :

$$ARA = (n / v) Q \text{ où } Q = \text{débit en ml min}^{-1}.$$

D'où la formule générale de **l'ARA en flux ouvert**:

$$ARA = \frac{A}{Ae} \frac{v_{ei}}{24200} \frac{v_e}{v} \frac{Q}{V_e} 60 \cdot 10^6 \mu\text{moles } C_2H_4 \text{ hr}^{-1}.$$

Le terme v_e / v s'annule si les volumes prélevés dans l'échantillon (v) et dans l'étalon (v_e) sont identiques.

II.2.4- Mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) in-vivo en flux ouvert.

La mesure en flux ouvert consiste à balayer, avec un débit constant, le volume d'incubation contenant le matériel biologique avec un mélange gazeux contenant 10% d'acétylène, et des proportions déterminées en oxygène et en azote selon les traitements (figure II-2). Des débitmètres massiques (Tylan) sont placés en sortie des bouteilles de gaz pour effectuer les mélanges gazeux.

Lors des mesures de l'ARA à différentes pressions en oxygène, un oxymètre différentiel (Abiss) équipé d'une électrode sélective de l'oxygène, nous permet d'établir avec précision les niveaux d'oxygène dans le mélange gazeux en amont de l'incubateur.

Dans notre travail, ces mesures sont effectuées sur des plantes âgées de 35 à 50 jours, cultivées en flacon de 1000 ml et placées, deux jours avant l'expérience, dans le phytotron où ont lieu les mesures. Le mélange gazeux balaye le volume d'incubation à un débit de 600 ml min^{-1} (0,6 volume/minute du volume d'incubation). L'étanchéité du système est assurée par un joint de rhodorsil placé au niveau du collet de la plante, à l'entrée du flacon. Le volume de la solution nutritive est identique à celui des conditions de culture. Les racines nodulées sont donc immergées et seule la partie supérieure des racines, qui ne contient que peu de nodosités, reste hors de la solution nutritive.

II.2.5- Traitement salin lors de la mesure de l'ARA.

L'apport est réalisé lors des mesures d'ARA par injection à la seringue dans la solution nutritive, du volume nécessaire d'une solution mère en NaCl, afin d'équilibrer la solution nutritive des racines nodulées à la concentration finale voulue de NaCl.

Dans nos expériences, la mesure d'ARA est réalisée sur racines inondées de plantes nodulées afin que la totalité des racines et des nodosités soient en contact direct avec la solution nutritive et principalement avec le sel (NaCl) lors des traitements. Ceci nous permet donc de travailler sur un matériel homogène quant aux traitements apportés.

II.3- Préparation des Coupes Nodulaires ET Analyse d'Images.

II.3.1- Traitements des plantes et prélèvement des nodosités

Les plantes de haricot sont réparties en deux lots, un lot témoin dont la solution nutritive est à 0 M NaCl, et un lot traité dont la solution nutritive est portée à 0,1 M NaCl par un apport de NaCl d'une solution mère concentrée. Ce traitement est réalisé 2h avant le prélèvement des nodosités. Ce temps a été choisi en référence aux cinétiques de réponse de l'ARA à NaCl qui montrent que 0,1M NaCl provoque une chute de l'activité nitrogénase (ARA) rapide et prononcée pendant les deux premières heures avant d'atteindre un palier d'activité stationnaire. Cette phase stationnaire serait provoquée, dans notre hypothèse de travail, par la régulation de la diffusion d'oxygène liée à une variation de forme des cellules du cortex interne des nodosités.

Dix nodosités par plante sont prélevées à une distance de 4 à 5 centimètres du collet. Notre échantillonnage nodulaire est fait sur des nodosités de 3 à 4 mm de diamètre. Sur nos plantes de haricot, les nodosités de cette taille sont intermédiaires entre les petites nodosités, non complètement matures, et les grosses nodosités qui peuvent avoir commencé leur phase de sénescence.

II.3.1.1- Echantillonnage des coupes de nodosités

Immédiatement après leur prélèvement, les nodosités sont placées sous une loupe binoculaire équipée d'une source lumineuse froide pour éviter toute altération du matériel biologique. Avec une fine lame, quatre coupes perpendiculaires au point d'insertion de la nodosité sur la racine, sont effectuées sur chacune d'elle.

Quatre tubes contenant un agent fixateur reçoivent 6 à 8 coupes nodulaires chacun provenant de plusieurs nodosités d'une même plante. Ainsi, chaque tube regroupe des coupes nodulaires de position similaire ou le plus proche possible par rapport au point d'insertion nodulaire (figure II-3).

En réalisant les coupes nous avons observé des nodosités de couleur verte; celles-ci n'ont pas été retenues considérant qu'elles étaient sénescentes. Seules les nodosités présentant une couleur rosâtre (leghémoglobine) et indiquant qu'elles sont fixatrices d'azote, ont été prises en compte.

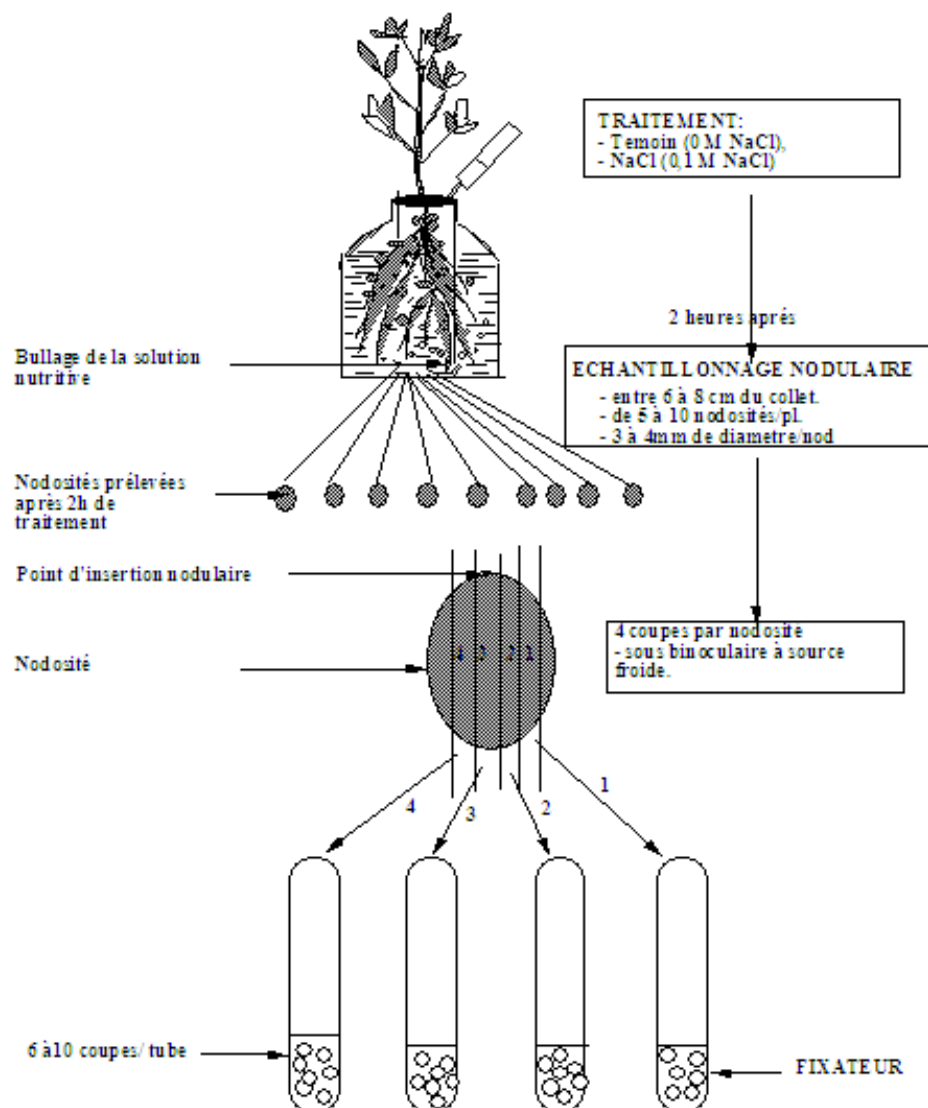


Figure II-3 : Echantillonnage et prélèvement de nodosités destinées à la microtomie sur des plantes de haricot.

II.3.2- Différentes étapes de la préparation des coupes de nodosités

a. Fixation

Les coupes nodulaires sont immédiatement mises, pendant 1h, dans des tubes en verre contenant la solution de fixation qui fixe principalement les structures protéiques, et dont la composition est la suivante:

- Tampon solution mère de Cacodylate de Na: 4 ml (pH 7,6 à 7,8).
Soit (0,2 M = 4,28g dans 100 ml H₂O distillée).
- Eau distillée : 10 ml.
- Glutaraldéhyde 25%, (ramenée à 3%): 2 ml.
- pH 7,2 à 7,4.

b. Lavage

L'élimination de l'agent fixateur est effectuée par une succession de 6 lavages au minimum, d'une durée chacun de 10 minutes dans le tampon de lavage suivant:

- Solution mère Cacodylate 0,2M: 50 ml.
- Eau distillée: 50 ml.
- Sucre (Saccharose): 7,5% (7,5g).
- pH 7,2 à 7,5.

c. Post-Fixation

Cette étape est réalisée sous une hotte aspirante à l'obscurité. Les coupes nodulaires sont mises dans une solution de tetroxyde d'osmium à 1% pendant 30 minutes. Elles doivent normalement bien noircir et descendre au fond des tubes. Cette fixation concerne principalement les structures lipidiques et la solution est composée de:

- Tetroxyde d'osmium (OSO_4 à 4%): 1 volume
- Solution tampon de lavage: 3 volumes.

d. Lavage et Déshydratation

Les coupes sont lavées dans une série de bains d'alcool à concentrations croissantes (20%, 50%, 70%, 95% et 100% d'alcool). Chaque lavage dure 15 minutes. L'alcool est ensuite déplacé par l'oxyde de propylène suite à deux lavages de 15 minutes chacun.

e. Imprégnation des coupes par les résines

Les coupes de nodosités sont enfin imprégnées par une résine (l'Epon-Araldite) dont la pénétration est favorisée par l'oxyde de propylène avec lequel la résine est miscible. Trois bains successifs des coupes dans des concentrations croissantes de la résine sont effectués à température ambiante comme suit:

- 1^{ère} Résine (**2/3** d'oxyde de propylène + **1/3** de Résine): 2 incubations de 15 minutes.
- 2^{ème} Résine (**1/3** d'oxyde de propylène + **2/3** de Résine): 2 incubations de 30 minutes.
- 3^{ème} Résine (Résine pure): une incubation de 16 à 18 h.

La résine l'Epon-Araldite est composée de:

- Araldite 7,5 ml.
- Epon 12.5 ml.
- Dibuthylphtalate 1,25 ml
- Agitation pendant au moins 2h avant de rajouter 1 ml de Dimethylphtalate-30 (DMP-30).

f. Inclusion et polymérisation

Les coupes de nodosités sont incluses en position orientée dans des moules en plastiques contenant de la résine pure. Ces moules sont maintenus dans une étuve à 60°C pendant 24h pour obtenir une polymérisation (figure II-4). Les blocs obtenus sont ensuite sectionnés par un ultramicrotome permettant la réalisation de coupes semi-fines de l'ordre d'1µm d'épaisseur.

Ces coupes sont récupérées sur une lamelle dans une goutte d'eau qui est séchée sur une plaque chauffante. La coloration est faite au bleu de toluidine qui est éliminé par un lavage à l'eau avant l'observation des coupes sous une loupe binoculaire. Ces premières observations permettent de détecter précisément les parties tissulaires qui concernent notre travail c'est à dire le cortex interne et moyen. Un retour à l'ultramicrotome nous permet alors de procéder à une taille plus précise sur les tissus choisis et de réaliser en automatique des coupes fines de l'ordre de 60 nm. Ces dernières sont récupérées soit, sur des grilles membranées par le parlodion pour être observées au microscope électronique à transmission, soit sur des lames et colorées au bleu de toluidine pour servir à l'analyse d'image comme dans notre travail.

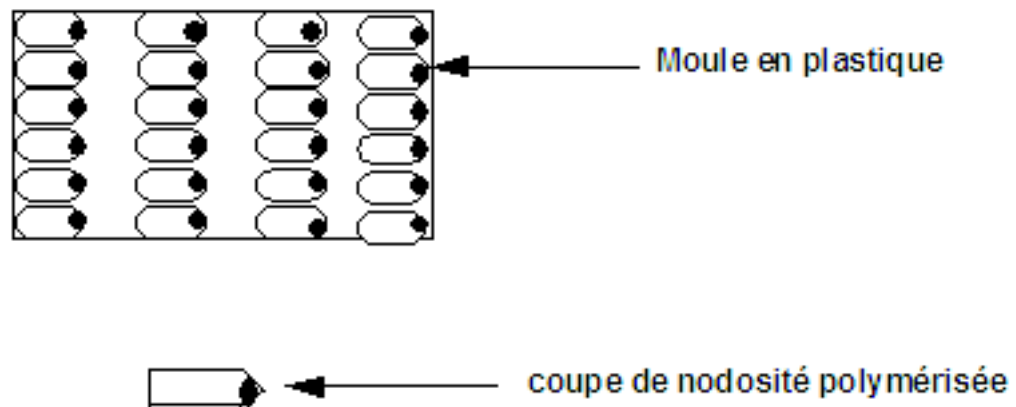


Figure II-4: Coupes de nodosités en position orientée dans la résine polymérisée.

II.4- L'ANALYSE D'IMAGE

Après traitement et fixation des coupes de nodosités, l'analyse d'image est utilisée pour quantifier des changements morphométriques qui se produisent au niveau des tissus des cortex nodulaires et les analyser statistiquement.

II. 4.1- Principe de l'analyse d'image

Les lames contenant les coupes fines de nodosités colorées au bleu de toluidine sont présentées sous un microscope optique (Leitz Ortoplan, Weltzar, D-6330), équipé d'une caméra vidéo (Sony XC77CE) connectée à un micro-ordinateur doté d'un système vidéo-commande digital (Matrox PIZ1024, Matrox Electronic Systems, Dorval Canada). Ce système nous permet la saisie des images des coupes nodulaires prises sous la caméra et leur attribution de coordonnées en pixels (156 X 156) se basant sur des niveaux de coloration (156 niveaux de gris) différents, allant de l'extérieur des cellules vers l'intérieur différenciant ainsi les parois des méats ainsi que du cytoplasme des cellules.

Les images sont traitées par le logiciel Visilog Software (Noesis, Jouy en Josas, France) pour la numérisation mathématique, la délimitation des parois cellulaires, la détection de leur déformation ainsi que pour la quantification des différents paramètres morphométriques.

Ceci permet une analyse comparative des modifications des formes cellulaires au niveau des différents tissus du cortex nodulaire selon les traitements.

Dans notre travail, beaucoup de cellules du cortex interne des nodosités comportaient des amas de grains d'amidon. Lors des prises d'images directes par la caméra, souvent ces amas étaient considérés par le logiciel d'analyse comme étant de petites cellules. Ainsi, pour ne pas accumuler d'erreurs, nous avons tout d'abord pris en photos toutes les coupes nodulaires sous le microscope et nous avons calqué les contours des parois manuellement sur du papier transparent à l'encre de chine. Les prises d'images par la caméra ont été alors réalisées directement sur ces transparents déposés sur un écran lumineux. Cette méthode, bien que plus lourde à réaliser est plus précise dans la reconnaissance des parois et nous permet d'éviter tous les artefacts, notamment ceux dus à la présence de grains d'amidon dans nos cellules. Ainsi le nombre de cellules sur lesquelles nous avons réalisé notre travail est de 5250 et 2550 respectivement dans le cortex interne et moyen des nodosités de haricot.

La technique de l'analyse d'image offre un choix très important de paramètres géomorphométriques qu'il est possible de calculer à partir des données de bases numérisées sur les cellules. Seulement il est important, dans notre travail, d'avoir les significations biologiques des paramètres que nous avons retenus. De plus, un travail précédent (Serraj et al., 1995), appliqué au soja, a été réalisé et les paramètres retenus présentaient un manque de spécificité dans les descriptions des changements morphométriques, en ce sens qu'un seul paramètre décrivait par exemple l'allongement et l'irrégularité des parois cellulaires. Cette double information du paramètre ne permettait pas de lire clairement l'effet du traitement apporté. Nous avons donc, dans ce travail, retenu des paramètres qui spécifient précisément l'effet morphométrique qu'apporte le traitement notamment: La surface (l'aire) cellulaire; le périmètre cellulaire; la longueur ou l'allongement cellulaire et l'épaisseur des cellules. On notera que dans ce travail l'analyse d'image considère une cellule comme étant une ellipse.

II.5- DOSAGE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) dans les nodosités et les racines de haricot

II.5.1- Protocole d'extraction de l'ABA des racines et des nodosités de haricot

La solution nutritive dans laquelle baignent les racines nodulées du haricot est équilibrée à une concentration de 0,1 M NaCl par un apport d'une solution mère de NaCl. Deux heures après ce traitement, quatre lots d'un gramme chacun par plante, de nodosités d'un diamètre de 2 à 3 mm sont prélevées, plongées immédiatement dans de l'azote liquide, puis broyées au mortier. La même opération est réalisée sur les nodosités des plantes témoins ainsi que sur les racines des deux traitements. La poudre issue du broyage est récupérée dans des tubes en polypropylène de 10 ml de volume, et ajoutée d'eau distillée osmosée bouillante, dans une proportion d'environ 5/1 (vol d'eau / vol de poudre). Les tubes sont ensuite placés, pendant trois minutes, dans un bain-marie porté à ébullition (100°C) et, pour éviter une évaporation importante de la solution, les tubes sont laissés partiellement fermés. Cette opération permet d'inactiver les enzymes encore en activité. Les tubes sont ensuite couverts

avec du papier aluminium (obscurité) pour éviter l'isomérisation de l'ABA par la lumière et mis en agitation à une température de 4°C pendant environ 12 heures pour une bonne extraction de l'ABA.

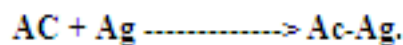
Les extraits de nodosités sont riches en polyphénols, ces molécules peuvent se lier aux anticorps et surestimer le dosage de l'ABA. Pour éviter cela, dans chaque tube, 50 mg de PolyVinylPyrrolidone (PVP) sont rajoutés, ce qui permet l'élimination des polyphénols par précipitation.

Une première centrifugation de clarification à 4000 g pendant 5 minutes est réalisée et le surnageant est récupéré dans un tube eppendorf. A chaque échantillon on rajoute 100 µl d'³H-ABA, 100 µl de l'anticorps monoclonal MAC62 et 200µl de solution tampon de phosphates. Les tubes sont protégés de la lumière et mis à incuber à 4°C pendant environ 45 min. A la fin de cette incubation, 500 µl de solution saturée de (NH₄)₂SO₄ sont rajoutés et les tubes fortement agités. Ils sont alors laissés à température ambiante pendant 30 minutes pour précipitation.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 8800 g pendant 4 minutes et égouttés soigneusement pour éliminer tout le surnageant sans perturber le culot. On rajoute alors 1ml de solution saturée à 50% de (NH₄)₂ SO₄ et on remet la totalité du culot en suspension. Une deuxième centrifugation est alors réalisée à 8800 g pendant 5 minutes, et le surnageant est délicatement, mais entièrement, éliminé. On rajoute 100 µl d'eau distillée et on dissout le culot en agitant les tubes avec le vortex. On apporte alors 1,4 ml de liquide de scintillation avant de fermer les tubes et de les placer dans des piluliers de scintillation pour le dosage à l'aide d'un appareil à scintillation.

II.5.2- Principe du dosage Radio-Immunologique (RIA) de l'ABA.

Les anticorps (Ac) sont des protéines à fort poids moléculaire qui peuvent se lier spécifiquement à certaines substances comme l'ABA qui alors est appelée antigène (Ag). Cette liaison entre l'anticorps et l'antigène est une réaction d'équilibre.



Les proportions d'anticorps (ou antigènes) liés dépendent des concentrations relatives en Ac et Ag, ainsi que de la constante d'affinité de l'Ac à l'Ag spécifique. Dans nos travaux l'anticorps monoclonal (MAC62) utilisé, a une constante d'affinité élevée, et est très sélectif pour l'ABA.

Pour les dosages on utilise pour estimer la quantité d'ABA de nos échantillons un traceur radioactif qui est le ³H-(±)ABA ou ABA* pour indiquer sa radioactivité. On écrit alors la réaction en présence seulement d'ABA* :



Pour une concentration donnée en ABA* et en Ac, la quantité d'Ac-ABA* retrouvée dans le culot protéique est une proportion constante de l'ABA* total ajouté. Dans le cas des

Radio-Immuno-Assay, cette proportion est d'environ 50% de l'(+)-ABA* ajouté initialement, soit 25% de l'(±)ABA*. Ceci est expliqué par le fait que l'anticorps monoclonal ne se lie pas à (-)ABA*.

Si la quantité d'anticorps et d'ABA* reste constante et que de l'ABA non radioactif (cas de nos échantillons ou des standards de calibration) est rajouté, il y aura alors compétition entre les deux formes d'ABA pour une même quantité d'Ac et on écrit alors :



Par compétition avec l'ABA non marqué, la quantité d'ABA* qui pourra se lier aux anticorps est réduite. Ainsi, plus il y a d'ABA dans nos échantillons ou dans les standards plus la liaison avec l'anticorps va être déplacée en sa faveur. Ceci induit une diminution de la quantité de radioactivité piégée dans le culot protéique.

Pour les calculs, on prépare une gamme standards d'ABA, dont un étalon Bmax correspondant à de l'ABA radioactive seule, ainsi qu'un Bmin correspondant à un étalon saturé en ABA non radioactif. Le dosage consiste en un comptage de la radioactivité exprimé en cpm (coups par minute). On trace alors une droite de calibration entre le logit (cpm / Bmax cpm) en fonction du logarithme des concentrations d'ABA des standards ce qui nous donne une droite de calibration de pente négative. La concentration en ABA des échantillons est calculée en appliquant la régression de calibration au comptage en cpm des échantillons.

II.6- TRAITEMENT DES PLANTES PAR L'ACIDE ABSCISSIQUE

Cette expérience est réalisée pour déterminer l'effet d'un apport exogène d'acide abscissique sur l'évolution de l'activité nitrogénase (ARA) in-vivo. Pour cela nous avons utilisé l'ABA (Abscisic acid, +/- cis-trans Isomère, Sigma de pureté d'environ 99%). Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour un apport exogène d'ABA aux plantes, notamment la pulvérisation foliaire de l'hormone (Bensen et al; 1988), l'injection sous corticale dans la tige (Cheneseau, 1984), ou l'addition dans le milieu de culture au niveau des racines de la phytohormone (Gibson et al., 1991, Charbonnel, 1994). Dans notre travail cette dernière technique a été adoptée pour les traitements d'ABA. Une solution mère préalablement préparée est directement apportée dans la solution nutritive dans laquelle baignent les racines nodulées du haricot ce qui leur permet un contact direct avec la phytohormone. Avant les traitements, les flacons de cultures sont protégés par du papier aluminium afin d'éviter l'inactivation par la lumière de l'ABA.

II.6.1- Préparation de la solution mère d'ABA

L'ABA est préalablement solubilisé dans de l'éthanol à une concentration de 0,1 M, et la solution éthanolique stockée durant 12 h minimum avant utilisation à 4 °C et à l'obscurité totale, pour éviter son inactivation à la lumière, pendant cette période s'opère une estérification nécessaire de l'ABA pour faciliter son absorption par les racines (J.C. Latché Univ. Toulouse, 1994 comm. pers). C'est à partir de cette solution mère à 0,1 M, que

sont prélevées des quantités suffisantes qui sont injectées dans la solution hydroponique pour l'équilibrer à la concentration du traitement des plantes (0,1mM) en ABA. Les témoins reçoivent une concentration équivalente en éthanol à celle utilisée pour la solubilisation de l'ABA, pour éviter tous artefacts dans les résultats.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1 EFFET DE LA SALINITE (NaCl) SUR L'ACTIVITE NITROGENASE DANS LES NODOSITES DE HARICOT

Introduction

Le stress salin affecte la production des légumineuses particulièrement quand leur alimentation azotée repose sur la fixation de l'azote atmosphérique. En effet, la salinité peut inhiber toutes les phases de la formation nodulaire. Selon Bekki et *al.* (1987), l'activité nodulaire apparaît peu affectée par la salinité, comparativement au développement des plantes et la formation nodulaire. Cependant, peu de travaux ont étudié l'effet à court et moyen terme du stress salin sur l'activité de la nitrogénase dans les nodules. Parmi ces travaux, on retrouve Sprent (1972) qui observe une baisse rapide de l'ARA de nodosités exposées à NaCl, et Serraj et *al.* (1994) qui constatent pour leur part que NaCl inhibe immédiatement l'activité fixatrice ainsi que la respiration en termes de consommation d'oxygène des nodosités de soja. Plusieurs auteurs rapprochent l'effet du stress salin à celui induit par un stress hydrique et leur explication de l'inhibition de l'activité fixatrice dans les nodules par un stress hydrique repose principalement sur un effet restrictif de la diffusion de l'oxygène.

Dans notre travail, nous avons étudié l'effet de la salinité (0,1 M NaCl) à court terme sur la fixation de l'azote chez le haricot.

III.1-1- Effet du stress salin sur l'activité nitrogénase

Les données de la figure III-1 (A) représentent l'activité nitrogénase (ARA) in-vivo chez les plantes témoin du haricot. L'ARA augmente rapidement et atteint son palier optimum d'activité après environ une heure d'exposition des nodosités à 10 Kpa d'acétylène. Le suivi de cette activité pendant plusieurs heures n'indique aucune perturbation de l'ARA.

La figure III-1 (B) nous montre que l'ARA augmente rapidement pendant les premières minutes de la cinétique de réduction d'acétylène avant de se stabiliser, indiquant par là qu'elle a atteint son plateau d'activité optimum. Il apparaît clairement qu'après avoir atteint l'optimum d'activité de la nitrogénase, l'application de NaCl (0,1 M) est rapidement suivie d'une chute de l'activité fixatrice d'azote. Cette baisse atteint environ 90% de l'activité initiale une heure après l'application du sel et reste alors stationnaire à un niveau très faible sans pour autant que l'activité de l'enzyme de fixation ne s'annule complètement. Cette activité faible nous renseigne donc que la nitrogénase enzyme de la fixation, reste tout de même viable et fonctionnelle et nous suggère que le sel n'aurait pas agi directement sur ces capacités fonctionnelles, mais probablement indirectement en affectant des mécanismes nodulaires importants pour le bon fonctionnement de l'activité fixatrice.

Il ressort aussi de cette courbe, par le suivi sur plusieurs heures de l'inhibition, que l'activité nitrogénase nodulaire après son inhibition ne reprend pas son activité d'elle-même, ce qui dénote de l'importance du mécanisme par lequel le sel aurait inhibé l'enzyme fixatrice.

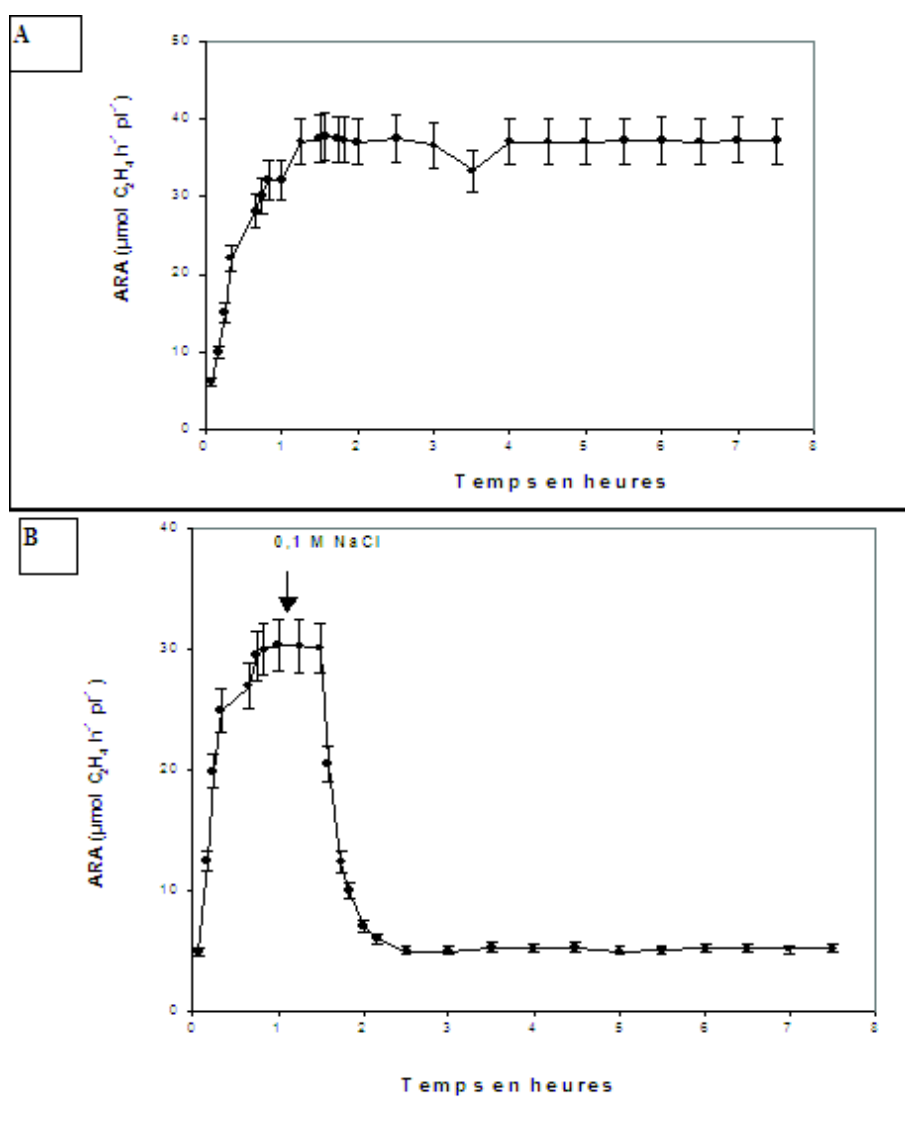


Figure III-1: Evolution des cinétiques de l'Activité Réductrice d'Acétylène des plantes témoins (A) et de plantes traitées (B) par (0,1M NaCl). Chaque point représente la moyenne \pm l'écart type de 5 répétitions.

III.1-2- Réponse de la nitrogénase à l'oxygène

L'oxygène est consommé d'une manière très importante par les chaînes respiratoires des bactéroïdes qui produisent et fournissent l'ATP nécessaire à la nitrogénase pour réduire l'azote moléculaire en ammoniac. Ainsi, environ 32 ATP sont consommés pour chaque molécule d'azote réduite. De plus, la diffusion de l'oxygène dans le nodule et sa perméabilité sont invoquées en tant qu'hypothèse pour expliquer les inhibitions de l'activité nitrogénase en présence de différents stress notamment le stress hydrique et salin.

Dans ce travail (figure III-2), l'activité réductrice d'acétylène a été suivie jusqu'à son optimum, un apport de 0,1 M NaCl a été alors apporté dans la solution hydroponique où baignent les racines nodulées du haricot. Ce traitement NaCl reproduit le même déclin décrit dans la figure III-1. Ce déclin atteint son palier d'inhibition environ une heure après

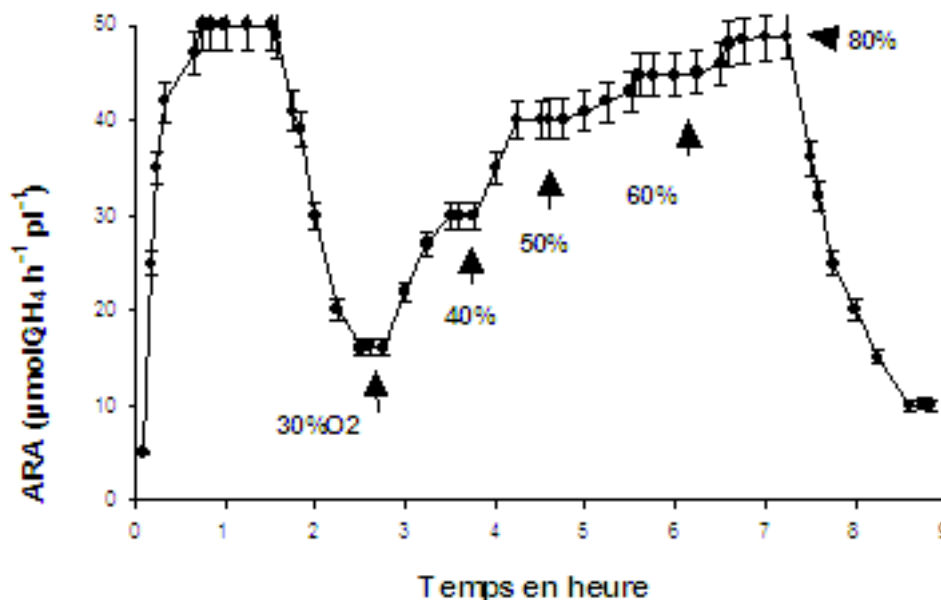
traitement. Des pressions successives en oxygène (pO_2) allant de 30 à 80 Kpa sont alors injectées dans le compartiment des racines nodulées du haricot en flux ouvert et les cinétiques de l'ARA suivies.

Dans la figure III-2, l'élévation de la pression de O_2 s'accompagne progressivement d'une augmentation de l'activité de la nitrogénase in-vivo et cela pour les concentrations successives de 30%, 40%, 50% et 60% O_2 . A cette dernière concentration la levée ou réversibilité de l'inhibition due à NaCl atteint environ 95% de l'activité initiale avant inhibition.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation suggèrent que l'inhibition provoquée par la salinité est à l'origine induite par une carence dans la diffusion de l'oxygène vers les bactéroïdes. Cette carence va provoquer une diminution de l'alimentation des chaînes respiratoires bactéroïdales en oxygène, ce qui cause une baisse dans la production en ATP nécessaire en quantités suffisantes pour réduire l'azote moléculaire par la nitrogénase.

L'augmentation de la pression en oxygène dans l'environnement nodulaire induit une meilleure diffusion de ce gaz à travers les tissus nodulaires qui réalimente convenablement en oxygène les chaînes respiratoires des bactéroïdes. La réversibilité de l'effet inhibiteur apparaît alors progressivement avec l'élévation des pressions en oxygène pour enfin atteindre environ 95% de l'activité nitrogénase initiale avant inhibition par NaCl.

On notera enfin, dans la même figure, que pour la concentration de 80% O_2 , une réaction contraire est obtenue sur l'activité nitrogénase caractérisée par une rechute de l'activité nitrogénase. Ceci suggère qu'à cette pression d'oxygène il y a une entrée excessive d' O_2 qui, au contact direct avec la nitrogénase, provoque son inhibition.



III-2: Réponse de l'ARA in-vivo à l'augmentation de la pression externe de l'oxygène et réversibilité par l'oxygène de l'inhibition de l'activité nitrogénase due à NaCl. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart type de 5 répétitions. (Les pressions d'oxygène sont données en % O_2 avec : 1% O_2 = 1 kpa).

III.1-3- Recherche de la pression en oxygène optimum pour l'activité nitrogénase

Afin de consolider nos précédents résultats, qui relient directement l'inhibition de l'activité nitrogénase par NaCl à une carence en oxygène due à une diminution de la perméabilité de l'oxygène dans le nodule, nous nous sommes intéressés à rechercher les pressions d'oxygène optimum pour l'activité de l'enzyme en absence de NaCl (figure III-3). La moyenne des nuages de points figurant dans la courbe a été reliée par une fonction polynomiale d'ordre deux comme indiqué sur la figure. D'après cette régression d'approximation, dans le cas où les plantes ne seraient pas soumises au stress salin, l'optimum de leur activité nitrogénase est située entre 30 et 40 Kpa ; ce résultat est donné avec un coefficient de régression $R^2 = 0,986$.

Sous stress salin (figure III-4) la régression polynomiale d'ordre deux nous indique un optimum d'activité entre 50 et 60 Kpa. Ce déplacement de l'optimum d'activité sous stress salin par rapport au témoin non traité et dont l'optimum est situé entre 30 et 40 Kpa, dénote d'une diminution de la perméabilité à l'oxygène dans les nodosités stressées. Ces résultats mettent donc en évidence la voie par laquelle est inhibée l'activité de la nitrogénase qui est celle de la baisse de la diffusion de l'oxygène dans le nodule car il faut plus de pression pour atteindre l'optimum. Ils suggèrent aussi un phénomène physiologique qui régule cette diffusion de l'oxygène à travers les différents cortex nodulaires lui-même basé sur une contrainte physique pour la régulation de la perméabilité.

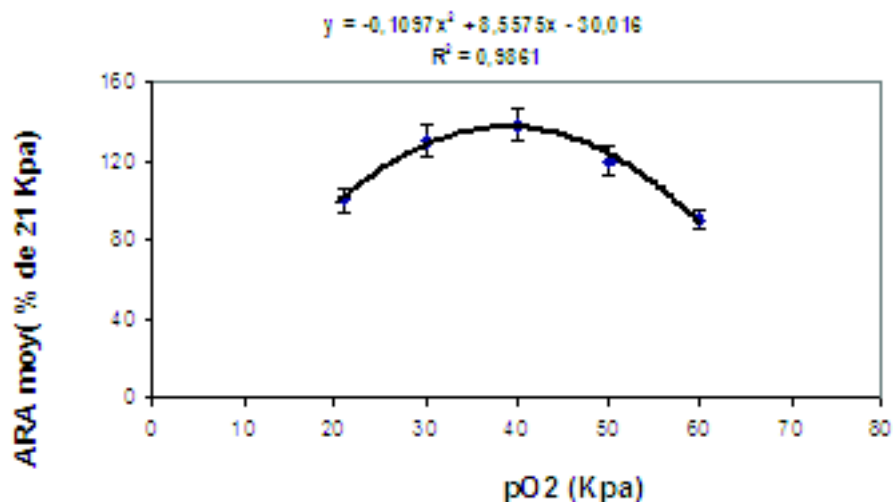


Figure III-3 : Réponse de l'ARA à une augmentation de la pression d'oxygène dans le compartiment nodulaire pour la recherche de l'optimum d'activité chez les nodosités de haricot. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart type de 5 répétitions.

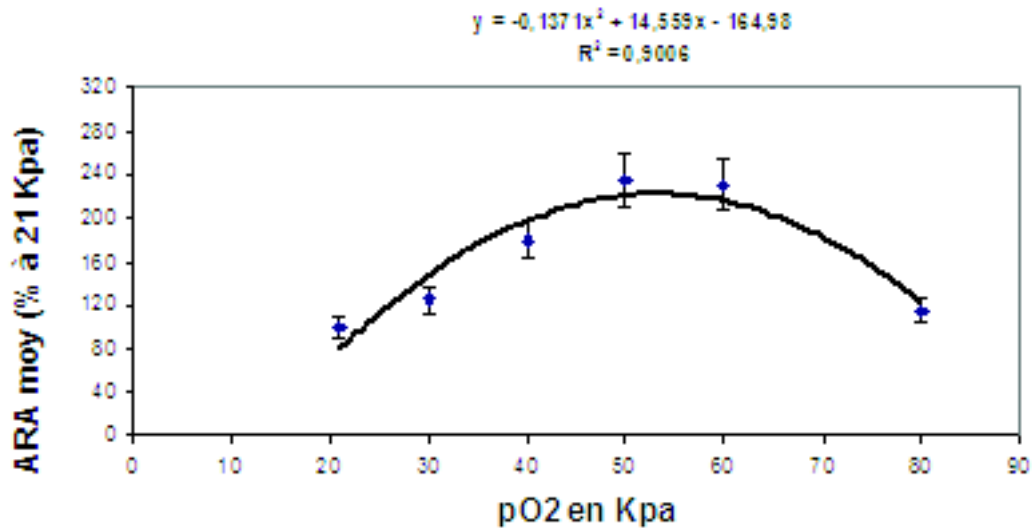


Figure III-4 : Réponse de l'ARA à une augmentation de la pression d'oxygène et recherche de l'optimum d'activité sous stress salin (0,1 M NaCl) chez les nodosités de haricot. Chaque point représente la moyenne \pm l'écart type de 5 répétitions.

III.2- LA MORPHOMETRIE DES CELLULES DU CORTEX NODULAIRE PAR ANALYSE D'IMAGES

Introduction

Nous avons constaté, dans les résultats précédents, que la salinité induisait une forte inhibition de l'activité nitrogénase dans les nodosités de haricot, et que cette inhibition serait directement liée à une perturbation de la disponibilité de l'oxygène pour l'alimentation des bactéroïdes dans la zone infectée des nodosités. Notre objectif dans cette partie du travail est de déterminer par quel mécanisme le sel (NaCl) serait susceptible de provoquer cette perturbation de la diffusion de l'oxygène dans le nodule et de déterminer à quel niveau du cortex nodulaire cette diffusion de O₂ est ralentie.

En dehors des leghémoglobines, qui constituent des transporteurs d'oxygène physiologiques vers la zone infectée de la nodosité pour l'alimentation des chaînes respiratoires (Bergersen, 1980), la majeure partie de cet élément diffuse vers cette zone par un phénomène physique ; ce qui peut apporter une explication à la diminution de la perméabilité de l'oxygène dans le nodule par un même type de phénomène. Nous avons donc orienté notre travail vers une approche cytologique pour vérifier si des modifications des formes cellulaires apparaissent dans les cortex nodulaires. Nous avons ainsi utilisé l'analyse d'image sur les mouvements des formes cellulaires provoqués par un stress salin (NaCl). Cette méthode directe rend compte principalement des changements de formes qui peuvent être engendrés par le traitement sur la morphométrie des tissus corticaux.

III.2-1- Effet du traitement NaCl sur les cellules du cortex nodulaire

Le cortex nodulaire par lequel diffuse l'oxygène vers la zone centrale pour alimenter les bactéroïdes est constitué de trois tissus superposés de l'extérieur vers l'intérieur et sont appelés : Cortex externe, Cortex moyen et Cortex interne. Le premier, en contact direct avec l'environnement extérieur de la nodosité, est constitué de cellules sclérifiées, de cellules parenchymateuses et de lenticelles. Le cortex moyen est compris entre ce tissu et le cortex interne qui s'étend jusqu'aux cellules contenant les bactéroïdes fixateurs dites la zone infectée. Entre les tissus moyen et interne on retrouve les traces vasculaires.

Une comparaison des paramètres stéréologiques (surface, périmètre, épaisseur et longueur) par l'analyse d'image des cellules du cortex nodulaire moyen et interne (tableau III-1) nous indique que la surface, le périmètre, la longueur ainsi que l'épaisseur des cellules, sont plus petites dans le cortex interne des nodosités de haricot par rapport à celles du cortex moyen.

Tissus nodulaires Paramètres Stéréologiques	Cortex Interne		Cortex Moyen	
	Témoin	NaCl	Témoin	NaCl
Surface cellulaire (µm ²)	217a ± 125	138b ± 97	524a ± 412	549a ± 392
Périmètre (µm)	57a ± 19	46b ± 20	87a ± 33	89a ± 32
Longueur (µm)	24a ± 9	20b ± 10	35a ± 14	36a ± 16
Épaisseur (µm)	12a ± 4	9b ± 3	19a ± 8	19a ± 7

Tableau III-1 : Effet de l'application de 100 mM NaCl pendant deux heures sur les modifications des formes cellulaires des cortex nodulaires interne et moyen dans les nodosités de haricot. Les résultats sont présentés en (moy ± l'écart type).

Les indices (a) et (b) indiquent que la différence entre le traitement et le témoin est significativement différente selon le test-t pour une probabilité de ($P < 0,001$).

D'autre part, le traitement salin (NaCl), à une concentration de 100 mM pendant deux heures, provoque une baisse significative des valeurs de ces paramètres uniquement pour les cellules du cortex nodulaire interne et non pas dans le cortex moyen (Tableau III-1). Les courbes dans la figure III-5. (A) et (B), ainsi que la figure III-6 (C) et (D), représentant les distributions cumulées de ces différents paramètres stéréologiques, et confirment ces résultats. En effet, sur ces courbes, le traitement salin montre clairement la baisse des surfaces, des périmètres, des épaisseurs, ainsi que des longueurs des cellules du cortex nodulaire interne, car les deux courbes du traitement et du témoin sont bien séparées entre elles. Les courbes représentant les cellules du cortex moyen sont, quant à elles, pratiquement superposées l'une à l'autre entre le traitement et le témoin révélant ainsi un effet non significatif de NaCl sur ce type de cellules. On peut noter, en ce qui concerne ces cellules une très faible augmentation du volume cellulaire chez les plantes traitées, mais cette augmentation reste non significative.

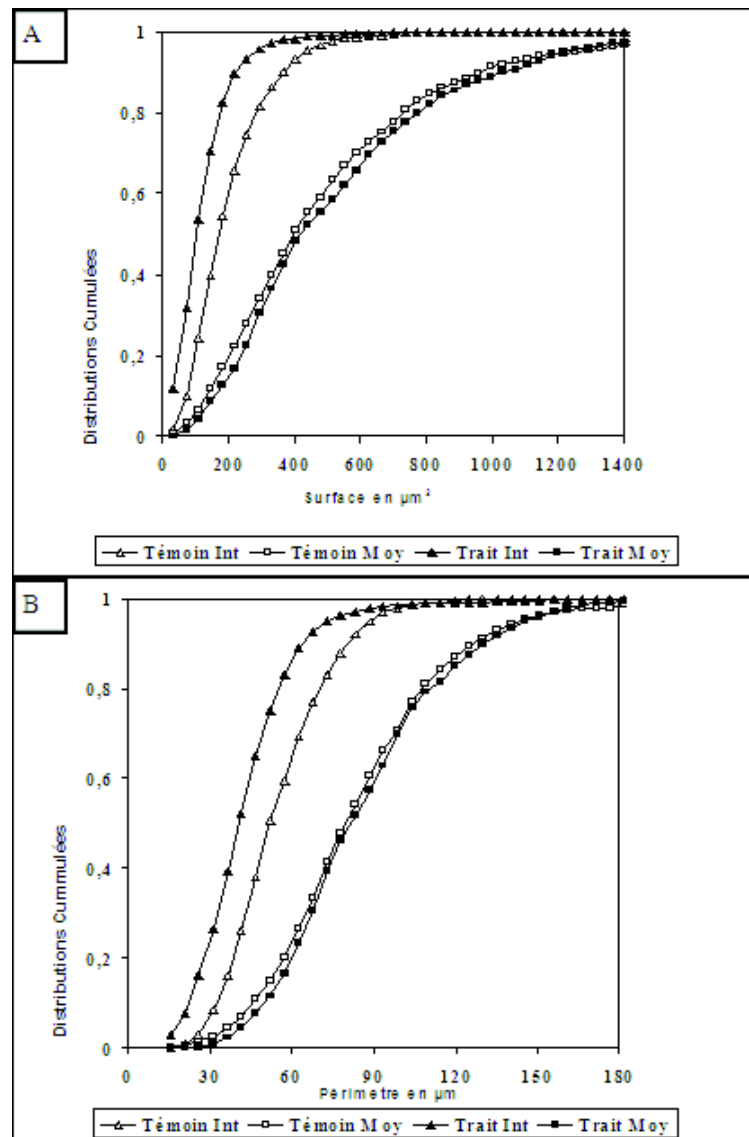


Figure III-5 : Courbes de Distributions Cumulées représentant l'effet de NaCl sur les surfaces (A) et les périmètres(B) des cellules du cortex nodulaire moyen et interne dans les nodosités de haricot.

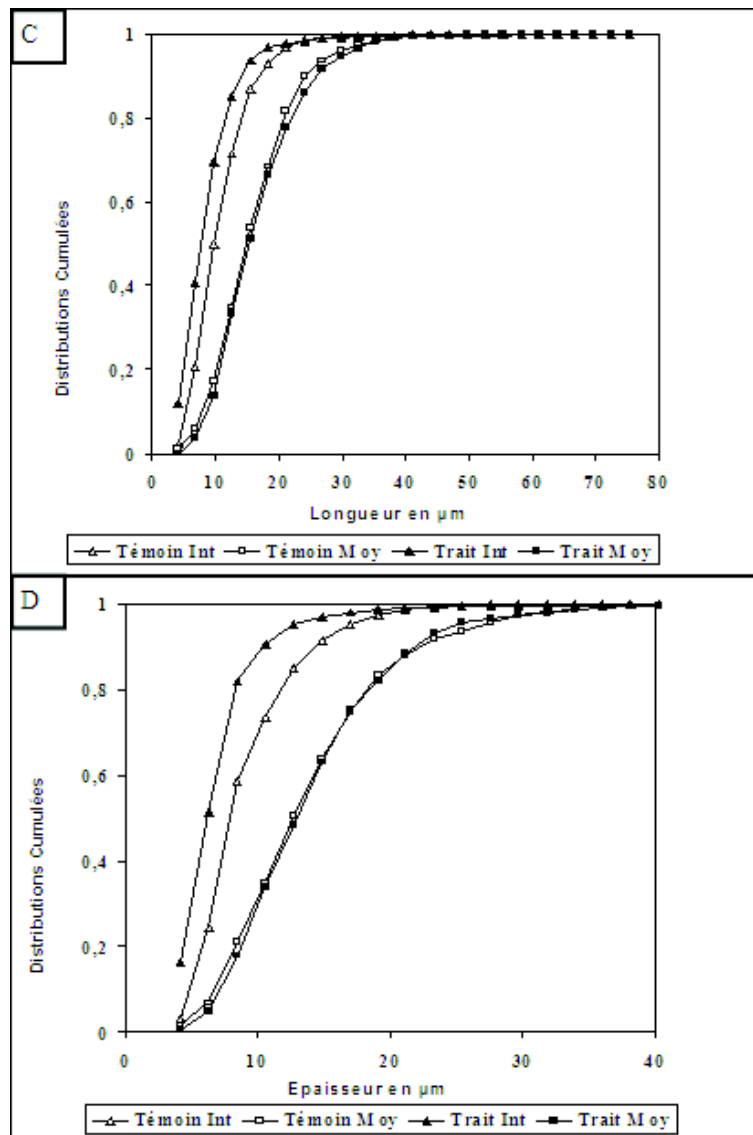


Figure III-6 : Courbes de Distributions Cumulées représentant l'effet de NaCl sur les longueurs (C) et les épaisseurs (D) des cellules du cortex nodulaire moyen et interne dans les nodosités de haricot.

Dans le tableau III-2, nous avons quantifié les changements de forme des cellules du cortex nodulaire interne et moyen soumis à un stress salin (NaCl) de 100 mM.

Tableau III-2 : Effet de l'application de 100 mM NaCl pendant deux heures sur les cellules des tissus corticaux des nodosités de haricot. Les résultats sont exprimés en % de la variation des paramètres et calculés par la formule : $[(\text{moyenne valeur traitement}) - (\text{moyenne valeur témoin})] * (\text{Moyenne valeur témoin})^{-1}$.

Paramètres en %	Cortex Interne	Cortex Moyen
Surface (%)	-36,3*	4,7
Périmètre (%)	-20,4*	2,2
Longueur (%)	-17,4*	2,8
Épaisseur (%)	-24,1*	0,0

L'astérisque indique que la différence entre le traitement et le témoin pour le paramètre est significativement différente selon le test-t pour une probabilité de ($P < 0,001$).

En ce qui concerne le cortex interne, nous avons constaté une réduction de l'aire de 36,3%, résultant d'une diminution de la longueur de 17,4% du périmètre de 20,4% et de l'épaisseur de 24,1%. On peut conclure que le stress salin provoque dans le cortex nodulaire interne une contraction cellulaire généralisée. Cette contraction s'accompagne d'un resserrement des méats cellulaires dans le cortex nodulaire interne, réduisant d'une manière importante les espaces intercellulaires par lesquels les échanges gazeux s'effectuent, notamment entre l'extérieur du nodule et la zone infectée qui contient les bactéroïdes. Au contraire, les modifications morphométriques dans le cortex moyen restent faibles et non significatives, ce qui élimine toute action physique de ce tissu sur la diffusion des gaz en général et de l'oxygène en particulier dans le nodule.

Discussion

Les changements des formes cellulaires que nous avons constatés suite au stress salin (2 heures à 100 mM NaCl) appliqué ont touché principalement les cellules du cortex interne des nodosités de haricot. Ces modifications de la morphométrie cellulaire provoquent la diminution des volumes des méats cellulaires dans ce tissu. Ainsi, s'instaure une régulation physique de la perméabilité à la diffusion de l'oxygène dans les nodules.

En effet, comme constaté dans nos résultats précédents, il ressort que le sel inhibe l'activité nitrogénase en agissant principalement sur la diffusion de l'oxygène dans les nodules. La disponibilité de l'oxygène dans la zone infectée va diminuer, induisant une carence en oxygène nécessaire pour les chaînes respiratoires des bactéroïdes. Cet effet a pour origine la diminution des volumes des méats cellulaires conduisant ainsi ce gaz à diffuser dans des phases liquides et donc ralentir sa pénétration. Ce ralentissement va se répercuter par une baisse de la production d'ATP indispensable à la nitrogénase pour la fixation symbiotique de l'azote.

Ces résultats viennent compléter et soutenir les explications apportées par les différents auteurs quant à la régulation à court terme de la diffusion de l'oxygène dans les nodules des légumineuses. Dans la littérature, cette adaptation à court terme de la diffusion de l'oxygène dans le nodule, a été observée en réponse à différents facteurs notamment à une augmentation ou une diminution de la pression d'oxygène dans la rhizosphère (Sheehy et al., 1983; Drevon et al., 1988; Hunt et Layzell., 1993; Serraj et al., 1995), à un changement dans l'allocation des photosynthétas vers les nodosités (Vessy et al., 1988; Denison et al., 1991), à un déficit hydrique (Pankhurst and Sprent, 1975; Durand et al., 1987; Weisz et al., 1985), ainsi qu'à un stress salin (Serraj et al., 1995).

Pour expliquer cette adaptation à court terme de la régulation de la perméabilité à l'oxygène dans les nodosités, plusieurs hypothèses ont été proposées, notamment celles basées sur la modélisation mathématique (Sheehy et al., 1987; Hunt et al., 1988; Denison et al., 1992). La majorité de ces hypothèses ont suggéré une variation de la proportion de la phase gazeuse par rapport à la phase liquide dans les espaces intercellulaires (Hunt et al., 1990; Sheehy et Webb, 1991; Streeter, 1988).

D'autres auteurs ont proposé l'agglutination d'une glycoprotéine dans ces espaces intercellulaires, obstruant ainsi la diffusion de l'oxygène (Iannetta et al., 1993). Enfin il a été suggéré, chez le soja, une diminution des espaces intercellulaires, suite à un stress salin (Serraj et al., 1995).

Ces hypothèses confortent donc nos résultats comportant ainsi plusieurs similitudes, notamment l'implication d'un phénomène physique de réduction de la perméabilité à

l'oxygène dans le cortex nodulaire interne lors d'un stress. Nos résultats, par le biais de l'analyse d'images des cellules des tissus nodulaire, localisent ce phénomène dans le cortex nodulaire interne des nodosités chez le haricot. Les cellules de ces tissus se contractent diminuant fortement le passage de l'oxygène à travers les méats cellulaires. Il s'avère maintenant important d'élucider l'effecteur par lequel le stress salin transmet son signal pour que ces modifications de formes se réalisent dans le cortex interne réduisant ainsi la perméabilité à l'oxygène.

III.3- IMPLICATION DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) DANS L'OSMO-CONTRACTION DES CELLULES CORTICALES INDUITES PAR NaCl

Les modifications morphométriques apparues dans les cellules du cortex interne des nodosités lors des traitements NaCl sont à l'origine de la baisse de la vitesse de diffusion de O₂ et donc de l'inhibition de l'activité nitrogénase. Ceci nous a poussés à rechercher le signal physiologique que le traitement salin (NaCl) aurait déclenché pour induire ces contractions des cellules du cortex interne.

Nous nous sommes inspirés de la littérature cytologique qui indique que l'acide abscissique (ABA) est l'un des principaux facteurs physiologiques pouvant provoquer des mouvements cellulaires, notamment chez les cellules de gardes stomatiques en cas de stress salin ou hydrique ainsi que chez les feuilles de *Mimosa pudica* dont les cellules du pulvinus foliaire se plasmolisent, induisant la rétraction des feuilles et des folioles. L'ABA, est aussi bien connu comme un inhibiteur de croissance et il influence plusieurs aspects du développement des plantes ; il peut réduire l'extensibilité des parois cellulaires des jeunes feuilles en développement.

III.3-1- Dosage de l'ABA dans les racines et les nodosités de haricot sous stress salin

Dans notre travail (figure III-7), nous avons dosé l'ABA contenu dans les racines et dans les nodosités de plantes de haricot préalablement traitées par 0,1 M NaCl pendant deux heures.

Il ressort des histogrammes présentés dans cette figure que les concentrations en ABA dans les nodosités sont supérieures à celles dosées dans les racines et cela indépendamment du traitement salin ; cette différence atteint environ 13,29 nM.gMF⁻¹.

Il apparaît aussi que le traitement NaCl provoque une augmentation de la concentration en ABA de 8,68 nM.gMF⁻¹, avec une concentration finale de 36,42 nM.gMF⁻¹ dans les nodosités, et une augmentation de 5,29 nM.gMF⁻¹ dans les racines, avec une concentration finale de 19,29 nM.gMF⁻¹.

On constate, par ces résultats, que la concentration en ABA des racines, mais principalement celle des nodosités de plantes de haricot traitées par NaCl, est beaucoup plus importante que chez les plantes témoins. Cette mobilisation rapide d'ABA dans les nodules, suite au traitement salin (NaCl), pourrait donc être à l'origine du signal qui induit

les modifications de formes des cellules du cortex interne constatées par l'analyse d'images suite à un stress salin. L'ABA participerait ainsi en tant que signal dans le phénomène de la régulation de la diffusion de O_2 dans le nodule.

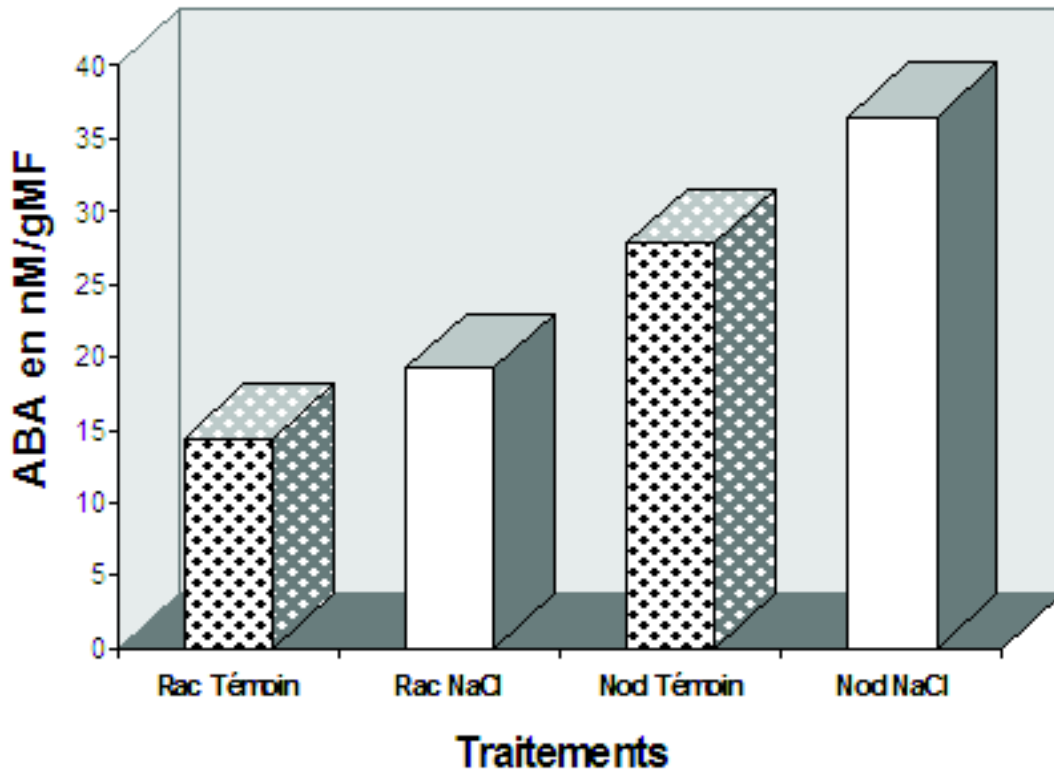


Figure III-7 : Effet de la salinité (0,1 M) sur la concentration de l'acide abscissique dans les racines et les nodosités de haricot. Les histogrammes représentent la moyenne de six répétitions. Les écart-types calculés sont de : 1,21 et 1,29 pour les racines témoins et traités et de : 1,93 et 1,61 pour les nodosités témoins et traitées respectivement.

III.3-2- Effet de l'apport d'ABA exogène sur l'activité nitrogénase

L'augmentation des concentrations en acide abscissique dans les nodules de haricot suite à un traitement salin ne peut suffire à lui seul pour établir une hypothèse où l'ABA serait le signal à travers lequel le sel (NaCl) commande l'osmocontraction cellulaire à l'origine de la baisse de la diffusion de l'oxygène dans le nodule et, par là même, l'inhibition de l'activité nitrogénase.

Mais, pour conforter cette hypothèse, nous avons soumis des plantes de haricot à un apport exogène en ABA (figure III-8). Les histogrammes de cette figure présentent donc l'évolution pendant 48 heures de l'activité nitrogénase in-vivo suite à un traitement de 0,1mM d'ABA. L'activité de la nitrogénase décroît progressivement par rapport à la baisse provoquée par un traitement salin, comme indiqué dans les résultats précédents. Cette inhibition atteint 26,76 % de l'activité initiale avant traitement par l'ABA après deux heures de temps de traitement. L'activité de la nitrogénase continue graduellement à baisser et, à 24 heures, elle présente une chute d'activité de 48,28%. Enfin, pour le dernier temps

de mesure à 48 heures, cette chute de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) atteint une inhibition de 68,98 % de son activité initiale.

Cette importante baisse de l'ARA, bien que plus étalée dans le temps, par rapport à une baisse de l'ARA due aux traitements salins, indique que l'acide abscissique est bien un important effecteur de la nitrogénase enzyme de la fixation. Ce résultat va donc dans le même sens que celui indiqué par le dosage de l'ABA dans les nodules. Son effet comme proposé par notre hypothèse, serait lié aux modifications de formes dans les cellules du cortex nodulaire interne, qui entraînent une baisse de la perméabilité à l'oxygène de ce tissu. Il en résulte une carence en oxygène pour les chaînes respiratoires des bactéroïdes, provoquant une diminution de la production d'ATP nécessaire au fonctionnement de l'enzyme fixatrice.

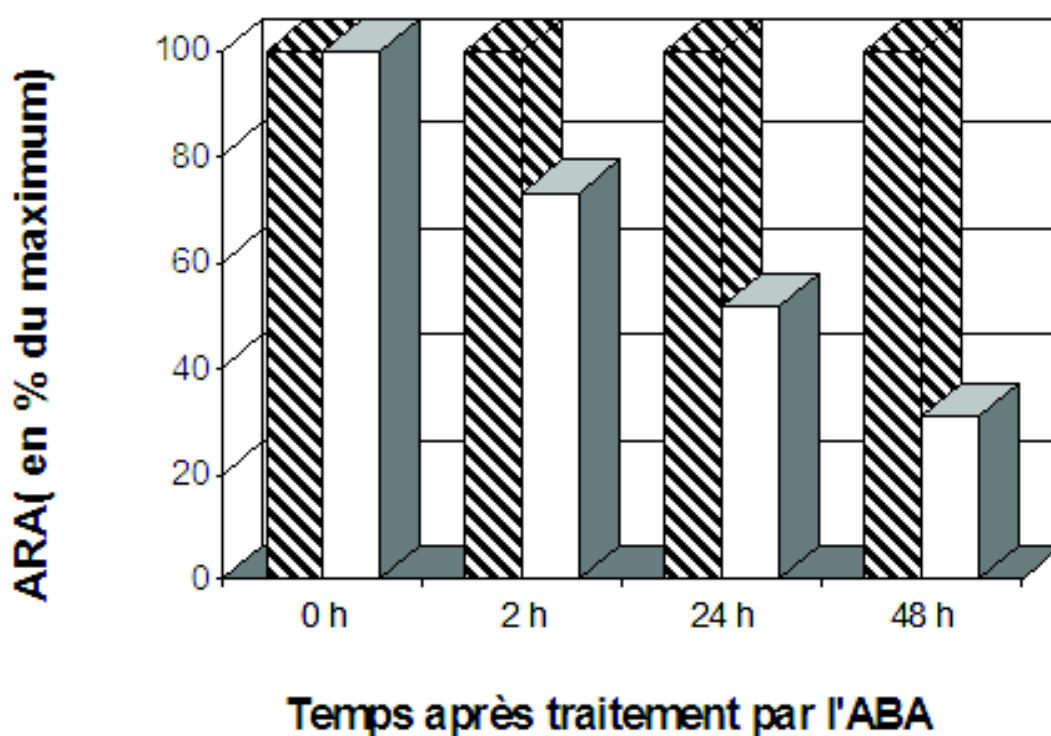


Figure III-8 : Réponse de l'Activité nitrogénase in-vivo (ARA) à un apport exogène en Acide Abscissique (0,1 mM ABA) dans le compartiment nodulaire chez le haricot.

(100 % ARA = 66,82 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$). Chaque histogramme représente la moyenne de six (6) répétitions dont les écart-types calculés sont chronologiquement : 3,1 ; 2,69 ; 1,54 ; 2,09 pour le traitement () et 3,38 ; 2,24 ; 2,2 ; 1,5 pour le témoin ().

CONCLUSION GENERALE

La salinité (NaCl) affecte de nombreux mécanismes physiologiques de la plante, notamment l'activité de la nitrogénase (ARA), enzyme de la fixation de l'azote dans les nodules des légumineuses (Sprent, 1972). Le but de ce travail était de comprendre par quels mécanismes physiologiques le sel (NaCl) parvenait à perturber la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique chez le haricot.

Il ressort de nos résultats que l'application de NaCl (0,1 M) est rapidement suivie d'une chute de l'activité fixatrice d'azote caractérisée par l'inhibition de l'enzyme fixatrice. Cette inhibition, qui atteint environ 90% de l'activité initiale, reste alors stationnaire à ce niveau, sans pour autant annuler complètement l'activité de l'enzyme.

La réduction de l'azote nécessite une très forte demande en oxygène pour alimenter les chaînes respiratoires des bactéroïdes. Ainsi l'élévation de la pression de O₂ dans l'environnement nodulaire s'accompagne progressivement d'une augmentation de l'activité de la nitrogénase. A 60% Kpa O₂ la réversibilité de l'inhibition due à NaCl atteint environ 95% de l'activité initiale, ce qui suggère que l'inhibition provoquée par la salinité est, à l'origine, induite par une carence dans la diffusion de l'oxygène vers les bactéroïdes. Cette carence va provoquer une diminution de l'alimentation des chaînes respiratoires bactéroïdales en oxygène et, par conséquent, une baisse dans la production d'ATP nécessaire en quantités suffisantes pour réduire l'azote moléculaire.

En dehors des leghémoglobines, qui constituent des transporteurs physiologiques d'oxygène vers la zone infectée de la nodosité pour l'alimentation des chaînes respiratoires (Bergersen, 1980), la majeure partie de cet élément traverse les tissus du cortex nodulaire par diffusion libre. Les analyses statistiques, réalisées sur les paramètres morphologiques des images cellulaires numérisées, montrent que les cellules du cortex nodulaire interne expriment, sous l'effet NaCl, une contraction cellulaire généralisée, qui provoque une diminution de la diffusion de l'oxygène dans le nodule.

Les changements de formes obstruent les méats cellulaires gazeux, l'oxygène va donc diffuser beaucoup moins vite vers la zone infectée. Dans ces conditions, les chaînes respiratoires bactéroïdales manquent d'oxygène, et produisent moins d'ATP, ce qui affecte l'activité de la nitrogénase.

Puisque la baisse de la conductance nodulaire à l'oxygène due à un choc salin a été associée à une contraction cellulaire du cortex interne, et que l'ABA est associé à la contraction des cellules de gardes stomatiques en réponse à un stress salin ou hydrique, nous avons vérifié si la baisse de la conductance nodulaire induite par le choc salin est associée à une augmentation de la teneur des nodosités en ABA (effecteur physiologique).

En effet, par son dosage dans les racines et les nodosités de plantes préalablement traitées par 0,1M NaCl, il ressort que la concentration en ABA des nodosités augmente significativement. Cette accumulation d'ABA dans les nodules pourrait être à l'origine le signal des modifications de formes des cellules du cortex interne et, participerait ainsi dans le phénomène de la régulation de la diffusion de O₂ dans le nodule.

D'un autre côté, l'apport de l'ABA exogène dans le compartiment des racines nodulées, entraîne une baisse progressive de l'activité nitrogénase, ce qui suggère qu'il peut effectivement être le signal de la régulation de la diffusion de l'oxygène dans les nodosités.

Les résultats obtenus dans ce travail convergent pour montrer que la barrière de diffusion de l'oxygène située dans le cortex interne des nodosités est la base de la régulation de la conductance nodulaire à l'oxygène. Ceci s'accorde avec l'hypothèse selon laquelle, sous l'effet d'un stress salin, l'inhibition qui apparaît sur l'activité nitrogénase *in-vivo* passe par des effecteurs physiologiques et physiques. Ainsi NaCl induit une augmentation de la concentration de l'ABA dans les tissus nodulaires, qui serait à l'origine des changements de formes constatés chez les cellules du cortex nodulaire interne. Ces modifications de forme obligerait l'oxygène à diffuser dans une phase liquide constituée par les cellules corticales, différemment des nodules non stressés où l'oxygène diffuse à travers les méats cellulaires gazeux et donc plus rapidement. Cette diffusion moindre de l'oxygène vers les bactéroïdes dans les nodules stressés perturbe l'alimentation correcte des chaînes respiratoires bactéroïdales en oxygène, occasionnant une baisse dans la production énergétique en ATP nécessaire à la nitrogénase pour la réduction des molécules d'azote. La fixation est par conséquent inhibée.

En perspective, ce travail suggère par les résultats qu'il apporte de s'orienter vers la recherche de légumineuses qui possèdent une forte capacité d'adaptation au stress salin (NaCl). Cette recherche devrait donc prendre en compte une production moindre d'ABA dans les nodules dans les conditions de stress. Les gènes qui codent pour cette production et/ou mobilisation de l'ABA devraient également aussi être recherchés. D'autant plus que la méthodologie d'hybridation *in situ* avec une sonde d'un gène spécifiquement induit par l'ABA pourrait permettre, selon une méthodologie développée avec le gène d'anhydrase carbonique (Schumpp et *al.*, 2002), de localiser le site d'action de l'ABA dans le tissu corticale des nodosités. La caractérisation moléculaire de ces symbioses pourrait permettre aussi d'identifier des gènes impliqués dans le contrôle de la diffusion de O₂ et aboutir à la sélection de symbioses tolérantes à la salinité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, S., Wahid, A., Rasul, E. and Wahid, A., 2005 - Comparative morphological and physiological responses of green gram genotypes to salinity applied at different growth stages. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46: 135-142.
- Al-Khateeb, S. A., 2006 - Effect of salinity and temperature on germination, growth and ion relations of *Panicum turgidum* Forssk. *Bioresource Technology*, 97: 292–298.
- Amzallag, G. N., Lerner, H. R. and Poljakoff-Mayber, A. 1990. Exogenous ABA as a modulator of the response of Sorghum to high salinity. -*J; Exp. Bot.* 233: 1520-1534.
- Appleby, C. A., 1984 - Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 35: 443-478.
- Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C. and Kwon, T. R., 2008 - Some Prospective Strategies for Improving Crop Salt Tolerance. *Advances in Agronomy*, 97: 45-110.
- Aspinall, B. and Paleg, L. G. 1981. Proline accumulation: Physiological aspect. In *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*, Paleg L.G. and Aspinall, B., eds., Academic Press, Sydney, 206-241.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., Graig, R. and Lynch, J. P., 2002 - Salinity tolerance of *Phaseolus* species during germination and early seedling growth. *Crop Sci.*, 42: 1584-1594.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., Debouk, D. G. and Lynch, J. P., 2003 – Growth, gas exchange, water relations, and ions composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crop Research*, 80: 207-222.
- Bekki, A., Trinchant, J.C., and Rigaud. J. 1987. Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroides under sodium chloride stress. *Physiol. Planta.* 71: 61-67.
- Ben-Hayyim, G. 1987. Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured cells. -*Plant Physiol. Life sci. Adv.* 6: 23-27.
- Bensen, Boyer, JS. Mullet, JE. 1988. Water deficit-induced changes in abscisic acid, growth, polysomes, and translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 88: 289-294.
- Bergersen, FJ. and Goodchild, DJ. 1973a. Aeration pathways in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 729-740.
- Bergersen, FJ. and Goodchild, DJ. 1973b. Cellular location and concentration of leghemoglobin in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 741-756.
- Bergersen, FJ. and Turner, GL. 1975. Leghemoglobin and the supply of O₂ to nitrogen fixing root nodule bacteroids : studies of an experimental system with no gas phase. *J. Gen Microbiol.* 89: 31-47.

- Bergersen, F.J. and Turner, G.L. 1980. Properties of terminal oxydase systems of bacteroids from root nodule of soybean and cowpea and N₂-fixing bacteria grown in continuous culture. *J. Gen Microbiol.* 118: 235-252.
- Bergersen F.J., 1980. Leghaemoglobin, oxygen supply and nitrogen fixation studies with soybean nodules. In Stewart W.D.P. and Gallar J.R. (eds) *Nitrogen Fixation*. Academic press, London, 139-160.
- Bernard, T. Pocard, J. A. Perroud, B and Le Rudelier, D. 1986. Variation in the response of salt-stressed rhizobium strains to betaines. *Arch. Microbiol.* 143: 359-364.
- Bernstein, L. and Ogata, G. 1966. Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean and alfalfa. *Agron J*, 58: 201-203.
- Binzel, M.L., Hess. F.D. and Hasegawa P.M. 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol* 86: 607-614.
- Bishop, P.E. and Mc Douglass, S.I. 1990. Genetics of alternative nitrogen fixation systems in *Azotobacter vinelandii*. In : *Nitrogen Fixation: Achievement and Objectives*. Gresshoff et al. (eds), Knoxville, USA, 789-795.
- Blumenthal-Goldschmidt, S. and Poljakoff-Mayer 1968. Effect of substrate salinity on growth and submicroscopic structure of leaf cells in *Atriplex halimus* L. *Aust. J. Bot.* 16: 469-478.
- Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H.R. and Reinhold, L. 1986. Studies on H⁺ - translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. *Plant Physiol.* 81: 1050-1056.
- Brewin, N.J. 1991. Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 7: 191-226.
- Burns, A., Watt, G.D. and Wang, Z.C. 1985. Salt inhibition of nitrogen catalysis and salt effects on the separate protein components. *Biochem.* 24: 3932-3936.
- Chandler, S.F. and Thorpe. T.A. 1986. Variation from plant tissue cultures: Biotechnological applications to improving salinity tolerance. *Biotech. Adv.* 4: 117-135.
- Charbonelle, S. 1994 Etude de quelques effets de l'acide abscissique sur la nutrition azotée du soja. DEA Université de Toulouse France. pp: 27.
- Cheesman, J. M. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. (Review). *Plant Physiol.* 87: 547-550.
- Chenesseau, A.C. 1984. Migration des produits de la photosynthèse chez le tournesol, rôle de l'acide abscissique. Thèse de Doct. Spécial Physiologie Végétale. Toulouse. pp: 107.
- Chien, C.T., Maundu, J., Cavaness, J., Dandurand, L.M. and Orser, C. S. 1992. Characterization of salt-tolerant and salt-sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum biova viciae* strain C1204b. *FEMS Micr. Lett.* 90: 135-140.
- Clarkson, D.T. 1991. Root structure and sites of ions uptake. In Y Waisel, A Eshel, U.Kafkafi, eds *plant roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York. pp 417-453
- Coster, M. and Cherman, J.L.; 1985. Précis d'analyse d'images. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.

-
- Creelman, R.A., Masin, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S. and Mullet, J.E. 1990. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedling. Analysis of growth, sugar accumulation, and gene expression. *Plant Physiol.* 92: 205-214
- Criswell, J.G., Havelka, U.D., Quebedeaux, B., and Hardy, R.W.F. 1977. Effect of rhizosphere pO₂ on nitrogen fixation by excised and intact nodulated roots. *Crop. Sci.* 17: 39-44.
- Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53: 121-147.
- Dajic, Z., 2006 - Salt stress. In : *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S. and Janardhan Reddy K. (eds.), Netherlands., Springer, 41-99.
- Dakora, F.D. and Atkins, C.A. 1989. Diffusion of oxygen in the relation to structure and function in legume root nodules. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 16: 131-140.
- Deits, T.L. and Howard, J.B. 1990. Effect of salts on *Azotobacter vinelandii* nitrogenase activities. Inhibition of iron chelation and substrate reduction. *The J. of Biol. Chem.* vol. 265. 7: 3859-3867.
- Delgado, M.J., Garrido, J.M., Ligeró, F. and Lluch, C. 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Plant Physiol.* 89: 824-829.
- Denison, R.F. 1992. Mathematical modeling of oxygen diffusion and respiration in legume root nodules. *Plant Physiol.* 98: 901-907.
- Denison, R.F. and Layzell, D.B. 1991. Measurement of legume nodule respiration and O₂ permeability by noninvasive spectrophotometry of leghemoglobin. *Plant Physiol.* 96: 137-143.
- Dilworth, H.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta.* 127: 285-294.
- Drevon, J.J., Deransart, C., Irekti, H., Payre, H., Roy, G., Serraj, R. 1995. La salinité abaisse la conductance des nodosités à la diffusion de l'oxygène. In : Drevon J.J. (eds), *Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen*. INRA (les colloques N°77), Paris, pp73-84.
- Drevon, J.J., Kalia, V.C., Heckmann, M.O., Pedelatore, P. 1988. In-situ open-flow assay of acetylene reduction activity by soybean root-nodules: Influence of acetylene and oxygen. *Plant. Physiol. Biochem.* 26: 73-78.
- Durand, J.L., Sheehy, J.E., Minchin, F.R. 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Bot.* 38: 311-321.
- Dwivedi, R., Sneh, Y. C., Toshi, A. R. B. and Qadra, A. 1981. Membrane permeability in tetraploid and hexaploid wheats under salinity stress. *Curr. Sci.* 50: 194-195.
- Elsheikh, E.A.E. and Wood, M. 1990. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil. Biol. Biochem.* Vol. 22. 3: 343-347.
- Epstein, E. 1980. Responses of plants to saline environments. - In *Genetic Engineering of Osmoregulation* (D. W. Rains, R. C. Valentine and A. Hollaender, (eds), pp. 7-21. Plenum press, New York.
-

- Erdei, L. Trivedi, S., Takeda, K. and Matsumoto, H. 1990. Effect of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 137: 165-168.
- Erdei, L. and Talinski, E. 1993. Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Planta.* 89: 381-387.
- Flowers, T.J., Troke P.F. and Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Clipson, N.J.W. 1986. Halophytes. *Q. Rev. Biol.* 61: 313-337.
- Flowers, T. J. and Yeo, A. R. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. - *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 75-91.
- Fougère, F., Le Rudelier, D. and Streeter; J.G. 1991. Effects of salt stress on alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules: Biochemical and ultrastructural studies. In *Plant Sci. today. Les colloques de l'INRA n° 59* (eds), INRA). Paris 1991.
- Gerbaud, A. 1990. Effect of acetylene on root respiration and acetylene reducing activity in nodulated soya bean. *Plant Physiol.* 93: 1226-1229.
- Gibson, A. Hubick, K.T. Bachelard, E.P. 1991. Effect of abscisic acid on morphological and physiological responses to water stress in *Eucalyptus camaldulensis* seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 153-163.
- Ghoulam, C., Foursy, A. and Fares, K., 2002 - Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 39-50.
- Gordon, A.J. Ryle, G.J.A. Mitchell, D.F. And Powell, C.E. 1985. The flux of ¹⁴C-labelled photosynthate through soyabean root nodules during N₂ fixation. *J. Exp. Bot.* 36 (166): 756-769.
- Greenway, H. and Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-190
- Guerin, V. Trinchant, J.C. Rigaud, J. 1990. Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by broad bean (*Vicia Faba* L.) nodules and bacteroides under water restricted conditions. *Plant Physiol.* 92: 595-601.
- Hameed, M. and Ashraf M., 2008 - Physiological and biochemical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. from the Salt Range (Pakistan) to salinity stress. *Flora*, 203: 683-694.
- Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1986. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80: 938-945.
- Hanson, A.D. and Hitz, W. D. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 163-203.
- Haouala, F., Ferjani, H. et El-Hadj, S., 2007 - Effet de la salinité sur la répartition des cations (Na⁺, K⁺ et Ca²⁺) et du chlore (Cl⁻) dans les parties aériennes et les racines de ray-grass anglais et du chiendent. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 11 (3): 235-244.

-
- Hardy, RWF. Holstein, RD. Jackson, EK and Burns, RC. 1968 - The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation : Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1208.
- Harper, C.E and Cooper, R.L. 1971 - Nodulation response of soybeans (*Glycine max* L. Merrill) to application rate and placement of combined nitrogen. *Crop. Sci.* 11: 438-440.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J., 2000 - Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 463–499.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R. A., Handa, S. and Handa, A.K. 1984 - Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hort. Sci.* 19: 371-377.
- Heckmann, MO and Drevon, JJ. 1988. Effet du malate sur la reponse de l'activite nitrogénase des nodosités de soja à l'oxygène. *C.R. Acad.Sc. Paris.* 306 (III): 559-5564.
- Hernandez, G and Drevon, JJ. 1991. Influence of oxygen and acetylene during in-situ open-flow assays of nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) in *Phaseolus vulgaris* root nodules. *J. Plant Physiol.* 138: 587-590.
- Hostak, MS. Henson, CA. Duke, SH and VandenBosch, KA. 1987. Starch-granule distribution between cell types of alfalfa nodules as affected by symbiotic development. *Can. J. Bot.* 65: 1108-1115.
- Hsiao, T.C., Acevedo, E., Fereres, E. and Henderson, D.W. 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. *-Philos.Trans. R. Soc. London* 272: 479-500.
- Hunt, S. Gaito, S.T and Layzell D.B. 1988. Model of gas exchange and diffusion in legume nodules. II. Characterisation of the diffusion barrier and estimation of the concentration of CO₂, H₂, and N₂ in the infected cells. *Planta.* 173. 128-141.
- Hunt, S. Denison, RF;King, BJ. Kouchi, H. Tajima, S and Layzell, DB.1990. an osmotic mecanism for diffusion barrier regulation in soybean nodules. In *Nitrogen Fixation, Achievements and objectives.* (Gresshof, Roth, Stacey and newton, (eds), Chapman and Hall, New York, pp. 352.
- Hunt, S and Layzell, DB. 1993. Gas exchange of legume nodules and regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44: 483-511
- Iannetta, P.P. James, E.K, Mchardy, P.D. Sprent, J.I and Minchin, F.R. 1993. An ELISA procedure for quantification of relative amount of intercellulair glycoprotein in legume nodules. *Ann. Bot.* 71: 85-90.
- Jalleel, A. C., Manivannan, P., Lakshamnan, G. M. A., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2007b - NaCl as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *C. R. Biologies*, 330: 806–813.
- Jaleel, C. A., Sankar, B., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2008 - Soil Salinity Alters Growth, Chlorophyll Content, and Secondary Metabolite Accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk J Biol*, 32: 79-83.
- James, E.K., Sprent, J.I., Hay, G.T and Minchin. F.R. 1993. The effect of irradiance on the recovery of soybean nodules from sodium chloride-induced senescence. *J. of Exp. Bot.* Vol. 44. 263: 997-1005.
-

- James, E.K., Sprent, J.I., Minchin, F.R. and Brewin, N.J. 1991. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules : Effect of altered rhizosphere oxygen concentration. *Plant cell. Envi.* 14: 467-476.
- Jolivet, Y., Larher, F. and Hamelin, J. 1982. Osmoregulation in halophytic higher plants: The protective effect of glycine betaine against the heat destabilisation of membranes. *Plant Sci. Lett.* 25: 193-201.
- Kassem, M., Capellano, A., and Gounot, A. M. 1985. Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficacité de *Rhizobium meliloti*. *Mircen J.* 1: 63-75.
- Katsuhara, M. and Tazawa, M. 1988. Changes in sodium and potassium in Nitellopsis cells treated with transient salt stress. *Plant cell environ.* 11: 71-74.
- Katsuhara, M. and Tazawa, M. 1986. Salt tolerance in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* 135: 155-161. Kouchi et Yonema, 1984
- Kuchitsu, K., Katsuhara, M. and Miyachi, S. 1989. Rapid cytoplasmic alkalization and dynamics of intracellular compartmentation of inorganic phosphate during adaptation against salt stress in a halotolerant unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*: ³¹P nuclear magnetic resonance study. *Plant cell Physiol.* 30: 407-414.
- Kouchi, and Yonema, . 1984 Dynamics of carbon photosynthetically assimilated in nodulated soybean plants under steady-states conditions. 2. The incorporation of ¹³C into carbohydrates, organic, amino acids and some storage compounds. *Annals of Botany*, 53, 883-8896.
- Kuiper, P. J. C. 1984. Functioning of plant cell membranes under saline conditions: Membrane lipid composition and ATPases. - In *Salinity Tolerance in Plants* (R. C. Staples and D. H. Toenniessen, eds), pp. 77-91. Wiley, New York.
- Kurkdjian, A. and Guern, J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 271-303.
- Kylin, A. and Quatrano, R.S. 1975. In: *Plants in saline environment. Ecological Studies. Analysis and Synthesis* (Poljakoff-Mayber, A. and Gale, J. eds), Vol. 15: pp. 147-167. Springer, Berlin
- Lakschmi-Kumari, M., Singh, C.S. and Subba Rao, N.S. 1974. Root hair infection and nodulation in lucerne (*Medicago sativa* L.) as influenced by salinity and alkalinity. *Plant and soil.* 40. 261-268.
- Layzell, D.B. and Hunt, S. 1990. Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiol. Planta.* 80: 322-327.
- Lazfo, D. and Cheeseman, J.M. 1986. Sodium transport and compartmentation in *Spergularia marina*; partial characterization of a functional symplasm. *Plant Physiol.* 81: 742-747.
- Le Rudelier, D. 1993. L'osmorégulation chez les bactéries: Aspects physiologiques et génétiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 8. (3) : 167-169.
- Lerner, H. R., Reinhold, L., Braun, Y., Hasidim, M. and Poljakoff-Mayber, A. 1983. Salt activation and inhibition of membrane ATPase from roots of the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Cell Env.* 6: 501-506.
- Lerouge, P. Roche, P. Faucher, C. Maillet F. Truchet, G. Prome, J.C. Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphate and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344: 781-784.

- Maathius, F.J.M., Flowers, T.J. and Yeo, A.R. 1992. Sodium chloride compartmentation in leaf vacuoles of the halophyte *Suaeda maritima* L. Dum. and its relation to tonoplast permeability. *J.Exp. Bot.* 43: 1219-1223.
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A. and Pascale, S., 2007 - Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 276–2.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005 - Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139–158.
- Manivannan, P., Jaleel, A. C., Sankar, B., Kishorekumar, A., Murali, P. V., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R., 2008 - Mineral uptake and biochemical changes in *Helianthus annuus* under treatment with different sodium salts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62: 58–63.
- Meloni, D. A., Gulotta, M. R. and Martinez, C. A., 2008 - Salinity tolerance in *Schinopsis quebracho* colorado: Seed germination, growth, ion relations and metabolic responses. *Journal of Arid Environments* 72:1785– 1792.
- Minchin, FR. Witty, JF. Sheehy, JE. Müller, M. 1983. A major error in the acetylene reduction assay: Decrease in nodular nitrogenase activity under assay condition. *J. Exp. Bot.* 34: 641-649.
- Minchin, FR. Witty, JF. Sheehy, JE. 1986. Further errors in acetylene reduction assay: Effect of plant disturbance. *J. Exp. Bot.* 37: 1581-1591.
- Minchin, FR. Witty, Skot, L. 1988. Limitations and benefits of oxygen diffusion control in legume nodules. In: *Physiological limitation and the genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation*, O. Ogara et al. (eds), 77-85.
- Mohammed, A. H., 2007 - Physiological aspects of mungbean plant (*Vigna radiata* L.) in response to salt stress and gibberellic acid treatment. *Res. J. of Agric. and Biol. Sci.*, 3: 200-213.
- Mosrche, T. 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: Theoretical and practical considerations. *-Plant Soil* 89: 199-226.
- Munns, R. and Termaat, A. 1986. Whole plant response to salinity. *- Aust. J. Plant Physiol.* 13:143-160.
- Naidoo, G., Somaru, R. and Achar, P., 2008 - Morphological and physiological responses of the halophyte, *Odyssea paucinervis* (Staph) (Poaceae), to salinity. *Flora*, 203: 437–447.
- Naisbitt, T and Sprent, JI. 1993. The long term effects of nitrate on the growth and nodule structure of the *Cesalpinoid herbaceous* legume *chamaecrista fasciculata* Michaux. *J.Exp.Bot.* 44: (216) 829-836.
- Newcomb, EH. Sippell, D. And peterson, RL. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* 57: 2603-2616.
- Pankhurst, CE and sprent JI. 1975. Surface features of soybean root nodules. *Protoplasma*, 85, 85-98.
- Parson, R and Day, DA. 1990. Mecanism of soybean nodule adaptation to different oxygen pressures. *Plant.Cell.Env.* 13: 501-512.

- Parvaiz, A. and Satywati, S., 2008 - Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54 (3): 89–99.
- Passioura. J. B. 1986. Resistance to drought and salinity: Avenues for improvement. - *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 191-201.
- Patel, A. D. and Pandey, A. N., 2007 - Effect of soil salinity on growth, water status and nutrient accumulation in seedlings of *Cassia montana* (*Fabaceae*). *Journal of Arid Environments*, 70: 174–182.
- Pinheiro, H. A., Silva, J. V., Endres, L., Ferreirac, V. M., Albuquerque Camara, C., Cabral, F. F., Oliveira, J. F., Carvalho, L. W. T., Santos, J. M. and Santos Filho, B. G., 2008 - Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L). *Industrial Crops and Products*, 27: 385–392.
- Pitman, M.G. 1984. Transport across the root and shoot/root interaction. In RC Staples, GH Toenniessen, eds, *Salinity Tolerance in Plants, Strategies for crop improvement*. J. Wiley and Sons, New York, pp 93-123.
- Pocard, J.A., Bernard, T., GOAS, G. and Le Rudelier, D. 1984. Restauration partielle, par la glycine betaine et la proline betaine, de l'activité fixatrice de jeunes plantes de *Medicago sativa* L. soumises à un stress hydrique. *C. R. Acad. Sci. Ser. III*, 298: 477-480.
- Pocard, J.A., Bernard, T. and Le Rudelier, D. 1991 .Translocation and metabolism of glycine betaine in nodulated alfalfa plants subjected to salt stress. *Physiol. plant.* 81: 95-102.
- Poljakoff-Mayber, A. 1975. In: *Plants in saline environment. Ecological Studies. Analysis and Synthesis* (Poljakoff-Mayber, A. and Gale, J. eds), Vol. 15: pp. 97-117. Springer, Berlin.
- Pollard, A. and Wyn Jones. R.J. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta.* 144: 291-298.
- Popp, M. 1984. Chemical composition of australian mangroves. II. Low molecular weight carbohydrates. *Zeitschrift für pflanzenphysiologie.* 113: 411-421.
- Prat, D. L; and Fathi-Ettai, R. A. 1990. Variation in organique and mineral components in young Eucalyptus seedlings under saline stress. -*Physiol Plant.* 79: 479-486
- Ralston, E.J. And Ismande, J. 1982. Entry of oxygen and nitrogen into intact soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 33: 208-214.
- Raschke, K. 1975. Stomatal action. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26: 309-340.
- Reibash, PH and Streeter, JG. 1983. Metabolism of ¹⁴C-labeled photosynthate and distribution of enzyme of glucose metabolism in soybean nodules. *Plant. Physiol.* 72: 634-640.
- Rejili, M., Telahigue, D., Lachiheb, B., Mrabet, A. and Ferchichi, A., 2008 - Impact of gamma radiation and salinity on growth and K⁺/Na⁺ balance in two populations of *Medicago sativa* (L.) cultivar Gabès. *Progress in Natural Science*, 18: 1095-1105
- Reinhold, L., Braun, Y., Hassidim. M. and Lerner, H.R. 1989. The possible role of various membrane transport mechanisms in adaptation to salinity. In J.H. Cherry,

- eds, Biochemical and Physiological mechanisms Associated with Environmental Stress Tolerance. Springer-Verlag, Berlin, pp: 121-130.
- Reuveni, M., Bennete, A.B., Bressan, R.A. and Hasegawa, P. M. 1990. Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol.* 94: 524-530.
- Rhodes, D. 1987. Metabolic response to stress. In (DD Davis, eds), *The Biochemistry of plants*, Vol 12. Academic Press, New York, pp: 201-241.
- Ribaut, J. M. and Pilet, P. E. 1991. Effects of water stress on growth, osmotic potential and abscisic acid content of maize roots. *Physiol. Plant.* 81: 156-162.
- Ribet, J. and Drevon, J.J. 1995. Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiol.planta.* 94: 298-304.
- Richardson, S. G. and McCree, K.J. 1985. Carbon balance and water relation in sorghum exposed to salt and water stress. *Plant Physiol.* 79: 1015-1020.
- Roy, G. 1994. Respiration et diffusion de l'oxygène dans la symbiose fixatrice d'azote : soja-*Bradhyrhizobium japonicum*. Thèse, USTL Montpellier II, 98p.
- Rupela, O.P. and Kumar Rao, J.V.D.K. 1987. Effects of drought temperature, and salinity on symbiotic nitrogen fixation in legumes, with emphasis on chickpea and pigeonpea. In *Abiotic stress and nitrogen fixation* (K.K. Lee. R.K. Maiti). ICRISAT Annual. Report. (1987): 123-131
- Saab, I. N. Sharp, R. E. and Pritchard, J. 1992. Effects of inhibition of abscisic acid accumulation on the spatial distribution of elongation in the primary root and mesocotyl of maize at low water potentials. *Plant Physiol.* 99: 26-33.
- Salsac, L. Drevon, JJ. Zengbe, M. Cleyet-Marel, JC. Obaton, M. 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Vég.* 22: 509-521.
- Sanchez-Diaz, M. Aparicio-Tejo, P. Gonzales-Murua, C. Pena, JI. 1982. The effect of NaCl salinity and water stress with polyethylene glycol on nitrogen fixation, stomatal response and transpiration of *Medicago sativa*, *Trifolium repens* and *Trifolium brachycalycinum* (subclover). *Physiol.plant.* 54: 361-366.
- Sauvage, D., Hamelin, J., and Larher, F. 1983. Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant sci. lett.* 31: 291-302.
- Schobert, B. and Tschesche, H. 1982. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. acta.* 541: 270-277.
- Schumpp O., De Billy F., Escoute J., Gamas P., Gherbi H., Michaux-Ferrieire M. , Payre H. , Drevon J.J. 2002. Hybridation in situ d'un gène d'anhydrase carbonique dans le cortex de nodosités de haricot (*Phaseolus vulgaris*) BAT 477.
- Seraj, R. Roy, G. Drevon, JJ. 1994. Salt-stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiol.plant.* 91: 161-168.
- Serraj, R. Fleurat-Leussart, P. Jaillard, B. Drevon, JJ. 1995. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root-nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant.cell.Env.* 18:455-462.

- Serraj, R. Drevon, JJ, Obaton, M. Et Vidal, R. 1992. Variation in nitrate tolerance of nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L)-*Bradyrhizobium japonicum*. J. Plant physiol. 140. 366-371.
- Serrano, R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. Curr. Top. Cell. Regul. 23: 87-126.
- Sheehy, JE. Minchin, FR and Witty, FR. 1983. Biological control of the resistance to oxygen flux in nodules. Ann. Bot, 52, 565-571.
- Sheehy, JE. Minchin, FR. Witty, JF. 1985. Control of nitrogen fixation in a legume nodule: an analysis of oxygen diffusion in relation to nodule structure. Ann. Bot. 55: 549-562.
- Sheehy, JE. Bergersen FJ, Minchin FR, WittyJ, 1987. A simulation study of gaseous diffusion resistance, nodule pressure gradients and biological nitrogen fixation in soybean nodules. Ann. Bot, 60, 345-351.
- Sheehy, JE and Weeb, J. 1991. Oxygen diffusion pathway and nitrogen fixation in legume root nodules. Ann. Bot. 67: 85-92.
- Shone, M.G.T. and Gale, J. 1983. Effect of sodium chloride stress and nitrogen source on respiration, growth and photosynthesis in lucerne (*Medicago sativa* L.). J. Exp. Bot. Vol 34: 146: 1117-1125.
- Silva, E. C., Nogueira, R. J. M. C., Araujo, F. P., Meloc, N. F. and Azevedo Neto, A. D., 2008 - Physiological responses to salt stress in young umbu plants. Environmental and Experimental Botany, 63:147–157.
- Singh, N.K., LaRosa, P.C., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1987. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 739-743.
- Singleton, P.W., El Swaify, S.A. and Bohlool, B.B. 1982. Effect of salinity on rhizobium growth and survival. Appl. and Env. Microbiol. Oct: 884-890.
- Singleton, PW and Bohlool, BB. 1983. Effect of the salinity on the functional components of the soybean-*Rhizobium jaonicum* symbiosis. Crop.sci. 23: 815-818.
- Singleton, W.P. and Bohlool, B.B. 1984. Effect of salinity on nodule formation by soybean. Plant. Physiol. 74: 72-76.
- Slama, I., Ghanaya T., Savoure, A. and Abdelly, C., 2008 - Combined effects of long-term salinity and soil drying on growth, water relations, nutrient status and proline accumulation of *Sesuvium portulacastrum*. C. R. Biologies, 331: 442–451.
- Smith, L. T and Smith, G. M. 1989. An osmoregulated dipeptide in stressed *rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 171: 4714- 4717.
- Song, J., Fan, H., Zhao, Y., Jia, Y., Du, X. and Wang, B., 2008 - Effect of salinity on germination, seedling emergence, seedling growth and ion accumulation of a euhalophyte Suaeda salsa in an intertidal zone and on saline inland. Aquatic Botany, 88: 331–337.
- Sprent, J. I. and Zahran, H. H. 1988. Infection , developpement and functioning of nodules under drought and salinity. -In Nitrogen fixation by legumes in mediterranean

- agriculture (D. P. Beck and L. A. Materon, eds) Martinus Nijhoff, Dordrecht. p. 145-151.
- Sprent, J.I. 1972. The effect of water stress on nitrogen fixing root nodules. III. Effects of osmotically applied stress. *New Phytol.* 71: 451-460.
- Sprent, J.I. 1984. Effects of drought and salinity on heterotrophic nitrogen-fixing bacteria and on infection of legumes by rhizobia. -In *Advances in Nitrogen Fixation Research.* (C. Veeger and W. E. Newton, eds) Nijhoff / Junk, The Hague, p. 295-302.
- Sprent, J. I. 1985. Nitrogen fixation in arid environments. -In *Plant for arid lands.* (G. Allen and Unwin, eds) London. P. 215-229.
- Steinborn, J. and Roughley, R.J. 1975. Toxicity of sodium and chlorid ions to *Rhizobium spp* in broth and peat culture. *J. appl. Bact.* 39: 133-138.
- Stewart, G. R. and Lee, J. A. 1974. The rôle of proline accumulation in halophytes. *Planta.* 120: 279-289.
- Storey, R. and Wynnes-Jones, R. G. 1975. Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. *Plant Sci. Lett.* 4: 161-168.
- Streeter, J. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC. Crit Rev. Plant Sci* 7: 1-23.
- Subbarao, G.V., Johansen, C., Jana, M.K. and Kumar Rao, J.V.D.K. 1990 (a). Comparative salinity tolerance of symbiotically dependent and nitrogen-fed pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relative *Atylosia platycarpa*. *Biol. Fertl. Soils.* 10: 11-16.
- Subbarao, G.V., Johansen, C., Kumar Rao, J.V.D.K. 1990 (b) Response of pigeonpea-Rhizobium symbiosis to salinity stress: variation among rhizobium strains in symbiotic ability. *Biol. Fertl. Soils.* 9: 49-53.
- Sze, H. 1985. H⁺-translocating ATPase. Advance using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 175-208.
- Tal, M., Heikin, H. and Dehan, K. 1979. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: proline accumulation in *Lycopersicum esculentum* Mill., *L. L. peruvianum* Mill. and *Solanum pennellii* Cor. treated with NaCl and polyethylene glycol. - *New Phytol.* 82: 349-355.
- Tawfik, K. M., 2008 - Evaluating the Use of Rhizobacterin on Cowpea Plants Grown under Salt Stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(1): 26-33.
- Termaat, A., Passioura, J.B. and Munns, R. 1985. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. - *Plant Physiol.* 77: 869-872.
- Tjepkema, JD and Yocum, CS. 1974. Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta.* 119: 351-360.
- Trivedi, S. Galiba, G., Sankhla, N. and Erdei, L. 1991. Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures. - *Plant Sci.* 73: 227-232.
- Tu, J.C. 1981. Effect of salinity on rhizobium-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 61: 231-239.

- Van Cauwenberghe OR, Newcomb, W, Canny, MJ, Layzell, DB. 1993. Dimensions and distribution of intercellular spaces in cryo-planned soybean nodules. *Physiol.plant.* 89: 252-261.
- Vance, CP, Johnson, LEB, Halvorsen, AM, Heichel, GH, Barnes, DK. 1980. Histological and ultrastructural observation of *Medicago sativa* root nodule senescence after foliage removal. *Can. J. Bot.* 58: 295-309.
- Vance, CP and Heichel, GH. 1991. Carbon in N₂ fixation : Limitaion exquisite adaptation . *Annu Rev. Plant physiol.plant Mol. Biol.* 42: 373-392.
- Van den bosh, KA, And Newcomb, EH. 1988. The occurrence of leghemoglobin protein in the uninfected interstitial cells of soybean root nodules. *Planta.* 175: 442-451.
- Velagalati, R.R., Marsh, S., Kramer, D., Fleischman, D. and Corbin, J. 1990. Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Trop. Agric. Vol.* 67. 2: 169-177.
- Velagalati, R. R. and Marsch, S. 1989. Influence of host cultivars and Bradyrhizobium strains on the growth and symbiotique performance of soybean under salt stress. *Palant and Soil.* 119: 133-138.
- Vessey,JK, Walsh KB and Layzell; DB. 1988. Can a limitation in phloem supply to nodules account for the inhibitory effect of nitrate on nitrogenase acctivity in soybean? *Physiol Plant,* 74, 137-146.
- Vincent, J.M. 1970. "A manual for Practical Study of Root-Nodule Bacteria" 164p.
- Walsh,KB, Vessey, JK, Layzell,DB. 1987. Carbohydrate supply and N₂ fixation in soybean: The effect of varied day length and stem girdling. *Plant. Physiol .* 85: 137-144.
- Walsh, KB, McCully, ME, Canny, MJ. 1989. Vascular transport and soybean nodule function : Nodule xylem is a blind alley, not a throughway. *Plant.Cell Env.* 12: 395-405.
- Warembourg, 1984 Weimberg, R., Lerner, H. R. and Poljakoff-Mayber, A. 1984. Changes in growth and water soluble solute concentration in *Sorghum bicolor* stressed with sodium and potassium salts. *Physiol. plant.* 62: 472-480
- Webb, J. and Sheehy, JE. 1991. Legume nodule morphology with regard to oxygen diffusion and nitrogen fixation. *Ann. Bot.*67: 77-83.
- Weisz, PR, Denison, RF, Sinclair, TR. 1985. Response to drought stress of nitrogen fixation (acetylene reduction) rates by field-grown soybean. *Plant. Physiol .* 78: 525-530.
- Weisz, PR and et sinclair, TR. 1987a. Regulation of soybean nitrogen fixation in reponse to rhizosphere oxygen. I. Role of nodule respiration. *Plant. Physiol.* 84: 900-905.
- Weisz, PR and et sinclair, TR. 1987b. Regulation of soybean nitrogen fixation in reponse to rhizosphere oxygen. II. Quantification of nodule gas permeability. *Plant. Physiol.* 84: 906-910.
- Wilson, J.R. 1970. Response to salinity in glycine. Some effects of range of short-term salt stresses on the growth, nodulation, and nitrogen fixation of *glycine wightii* (formely javanica). *Aust. J. Agric. Res.* 21: 571-582.

-
- Wilson, C., Liu, X., Lesch, S. M. and Suarez, D. L., 2006 - Growth response of major USA cowpea cultivars: Effect of salinity on leaf gas exchange. *Plant Science*, 170: 1095–1101.
- Wittenberg, JB. Appleby, CA. Wittenberg, BA. 1972. The kinetics of the reaction of leghemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *J. Biol. Chem.* 274: 527-531.
- Witty, JF. Skot, L. Revsbech, NP. 1987. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodule to O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* 38: 1129-1140.
- Witty, JF. Minchin FR. Sheehy JE and Ines Minguez M. 1984. Acetylene-induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. *Ann. Bot.*, 53, 13-20.
- Witty. JF, Minchin. FR. Skot, L and Sheehy JE. 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell, Biol.* 3. 275-314.
- Yancey, P.H., Clarck, M.E., Hand, S.C., Bowlus, P.D. and Somero, G.N. 1982. *Science*. 217: 1214-1217
- Yates, MG. 1980. Biochemistry of nitrogen fixation. In : *The biochemistry of plants*, academic press. 5: 1-63.
- Yeo, A.R. 1983. Salinity resistance: physiology and prices. *Physiol. Plant.* 58: 214-222.
- Youcef, A.N. and Spent, J.I. 1983. Effects of NaCl on growth, nitrogen incorporation and chemical composition of inoculated and NH₄NO₃ fertilized *Vicia faba* (L.) plants. *J. of Exp. Bot.* Vol. 34: 145: 941-950.