

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

OUNANE S.M.* , BACHA F. , IREKTI H.****

* I.N.A. Département de phytotechnie El Harrach Alger

** I.N.R.A. Station de Mehdi Boualem Alger

RESUME

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

Sous l'effet des températures extrêmes la fixation symbiotique est fortement déprimée entre 0 et 15°C et au delà de 30°C. Aux environs de 25°C elle fonctionnerait à son maximum mais dans une gamme de températures réduite. Cette tendance est encore plus marquée au stade floraison.

Sur la nitrate-réductase, la température a un effet sur la quantité de l'enzyme et sur la vitesse de sa réaction. En effet, les basses températures comprises entre 2 et 15°C protègent la nitrate-réductase contre sa dégradation naturelle pendant la nuit. Par contre les températures croissantes entre 2 et 30°C permettent une augmentation progressive et parfois rapide de l'activité nitrate-réductase avec un pic aux environs de 25°C représentant l'optimum de cette activité. La chute observée au delà de 30°C traduit probablement la destruction des protéines constitutives de cette enzyme. Bien que les fortes activités se produisent pendant le stade végétatif, il n'en demeure pas moins que l'allure des courbes que nous avons obtenus reste identique aux deux autres stades (floraison et gousses).

Grâce à ces données nous avons pu déterminer à partir d'une droite de régression les coefficients de passage de l'ANR révélée à 25°C à l'ANR mesurée *in situ* à une température ambiante donnée.

La comparaison de ces deux activités, dans une culture d'hiver, laisse entrevoir une interaction de complémentarité, permettant au pois chiche d'assurer sa nutrition azotée par l'assimilation de l'azote nitrique pendant la saison froide et par la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique au printemps.

Mots clés : Température , Nitrate-réductase , Fixation azote , Pois-chiche

Thermic stress effect on fixation symbiotic nitrogen by chickpea

Key words : temperature, reductase-nitrate, nitrogen fixation, chickpea

SUMMARY

Under the effect of extreme temperature the symbiotic fixation is strongly depressed between 0 and 15 °C and beyond 30°C. At about 25°C it would work at its maximum but into a reduced variety of temperatures this tendency is still more apparent at flowering stage. On the reductase -nitrate, the temperature has an effect on the quantity of enzyme and on the speed of its reaction. In fact, the temperatures comprised between 2 and 15 °C protect the reductase-nitrate against its natural degradation during the night. On the contrary the growing temperature between 2 and 30°C permit a progressive and sometimes quick increase reductase-nitrate activity with a peak at about 25°C representing the optimum of this activity. The fall observed beyond 30°C represents probably the destruction of constituents proteins of this enzyme. Although the strong activity producer during the vegetative stage, the curve obtained remains nevertheless identical to the two other stages. Thanks to these data we were able to determine from the straight of regression the coefficients of RNA crossing revealed at 25°C to the RNA measured in.situ at a given room temperature. The comparison of these two activity in a winter cropping permits to notice an interaction of complementary allowing the chickpea to ensure its nitrogenous nutrition by the assimilation of the nitric nitrogen in winter and by the symbiotic fixation of the atmospheric nitrogen in spring.

INTRODUCTION

La culture du pois-chiche en Algérie est caractérisée dans la plupart des régions par un rendement faible constituant ainsi un frein à son développement . Les principales causes à cet état sont d'abord le déficit hydrique, les mauvaises herbes mais aussi le contrôle de la nutrition azotée. En effet, le pois-chiche est une légumineuse riche en protéine et cultivée généralement en tête de rotation pour les reliquats d'azote qu'il laisse pour la culture suivante. Cette caractéristique n'est cependant pas toujours vérifiée, car les légumineuse ne fixent pas systématiquement l'azote de l'air, et pour le faire un certain nombre de conditions doivent être réunies (Ounane, 1998).

Pour cette raison, il est indispensable de bien connaître les effets des facteurs du milieu sur la nutrition azotée .

Les légumineuses peuvent assurer l'alimentation azotée par deux voies; la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et /ou l'assimilation de l'azote combiné du sol. Ces deux voies sont influencées différemment par les facteurs du milieu du fait de la localisation et de la nature des enzymes impliquées dans ce métabolisme (Sall, 1987).

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la température sur l'activité de la nitrogénase responsable de la fixation de l'azote et de la nitrate réductase qui contrôle la première étape de l'assimilation de l'azote combiné du sol. Les fluctuations de ces activités peuvent être attribuées généralement soit à des variations de réaction pour une quantité d'enzyme active donnée, soit à des variations de la quantité d'enzyme active présente, qui elle même dépend des vitesses de synthèse *de novo* (induction) ou de l'activation d'une molécule préexistante non active et des vitesses de dégradation ou d'inactivation plus ou moins réversible (Mazliak, 1981).

Le pois chiche est cultivé traditionnellement au printemps mais la culture d'hiver peut donner de meilleurs rendements en Algérie. Ce décalage du cycle de la plante vers la période froide entraîne probablement des modifications plus ou moins importantes dans le métabolisme générale de la plante et en particulier le métabolisme azoté. De ce fait ,nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la température sur la fixation et l'assimilation de l'azote, aux trois stades critiques du cycle de la plante.

MATERIEL ET METHODES

Les plants de pois-chiche (ILC3279) sont cultivés en serre dans des pots de 3 litres remplis d'un mélange équivalent de terre, de sable et de terreau préalablement désinfecté. La nodulation se produit grâce à une première inoculation des graines par enrobage et une deuxième inoculation des plantules à la levée. L'inoculum est préparé dans un milieu YEM liquide, au laboratoire, à partir d'une souche autochtone non caractérisée.

Les températures appliquées sont : 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C avec 5 répétitions.

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

La fixation de l'azote est estimée par la mesure de l'activité de réduction de l'acétylène (ARA) par la méthode de Balandreau *et al.* (1971). Elle est effectuée sur plante entière et exprimée en $\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$.

L'assimilation de l'azote combiné du sol (nitrate) est déterminée par la mesure de l'activité nitrate-réductase (ANR) sur la première feuille entièrement formée de la plante et par la méthode *in-situ* de Robin *et al.* (1983). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M NO}_2/\text{h/g}$ poids frais.

RESULTATS ET DISCUSSION

1- Variations de l'ANR en fonction de la température d'incubation

Dans cette étude, nous mettons en évidence l'importance de la température sur la vitesse de réaction de l'enzyme, car dans la méthode *in-situ*, l'ANR est mesurée par l'accumulation des nitrites dans une feuille entière après incubation à l'obscurité et en anoxie pendant 30 mn. La figure 1 montre bien une évolution très lente de l'ANR entre 0 et 10°C puis une augmentation rapide jusqu'à 25°C et ensuite une diminution assez brutale au delà de 30°C.

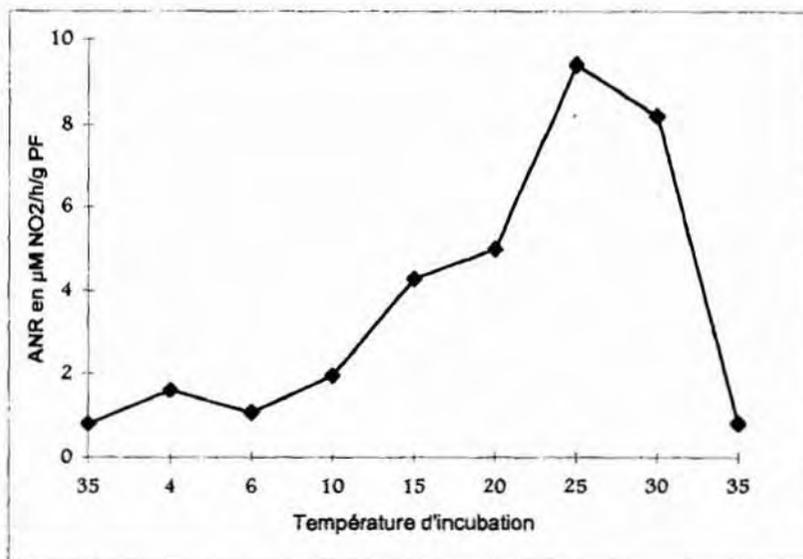


Figure 1 : Variation de l'ANR en fonction de la température d'incubation

Comme pour toutes les réactions chimiques, la vitesse de réaction croît avec la température; mais pour une réaction enzymatique les phénomènes sont plus complexes car la température intervient aussi en favorisant la dégradation des protéines constitutives des enzymes. En effet nous observons bien une chute de l'ANR à partir de 30°C qui peut traduire une destruction des enzymes en jeu. Le pic d'activité est observé à 25°C et c'est cette température qui sera utilisée dans nos expériences et qui est d'ailleurs considérée comme l'optimum physiologique chez la plupart des végétaux. Des résultats analogues, obtenus par Hallmark et Huffaker (1978) sur soja, par Deroch et Babalar (1987) sur luzerne ainsi que par Macdowall *et al.* (1989) sur haricot, situent l'optimum de l'activité nitrate-réductase aux environs de 25°.

2 - Effet de la température sur l'activité nitrate-réductase

Dans cette étude l'ANR est révélée à 25°C sur des plantes ayant subies un traitement de 24 heures à différentes températures et après 14 heures d'obscurité. La figure 2 montre une forte activité chez les plantes ayant subies les basses températures. Nous constatons aussi une diminution de cette activité au fur et à mesure que la température de traitement augmente jusqu'à environ 15°C au delà de laquelle elle reste faible ou pratiquement nulle.

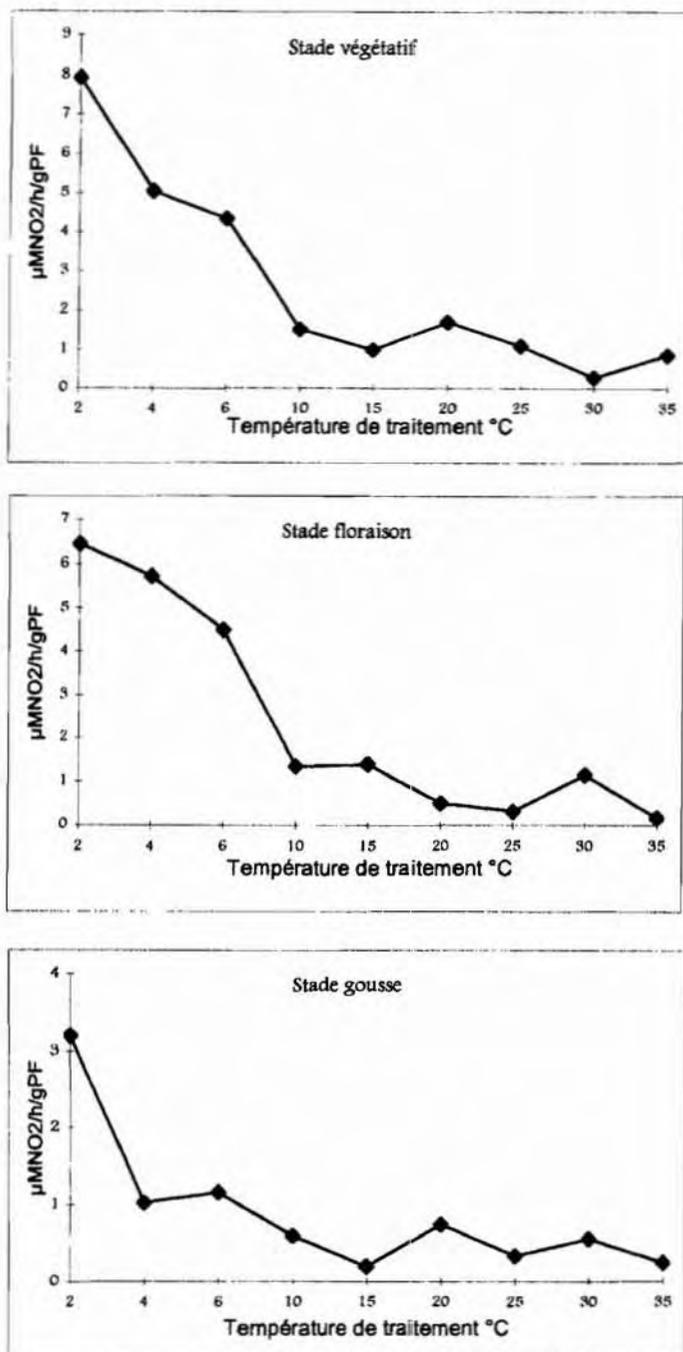
L'activité de la nitrate réductase semble dépendre essentiellement de la quantité d'enzymes présente après le traitement à différentes températures. En effet, l'obscurité provoque une inactivation naturelle de cette enzyme alors que les basses températures la protège contre cette action (Alofe *et al.* 1973). Ceci laisse présumer non seulement une protection de l'enzyme mais aussi une augmentation de sa synthèse en phase obscure (Deane-Drummond *et al.* 1980). La même tendance est observée aux deux autres stades où nous constatons une corrélation négative entre l'ANR et les températures. On peut en outre s'attendre à ce qu'une plante qui a synthétisé et conservé une grande quantité d'enzyme aux basses températures puisse réagir avec une forte activité enzymatique dès le rétablissement des températures modérées (environ 25°C) qui peut se produire pendant les heures chaudes de la journée en hiver. Ce comportement peut dans une certaine mesure ressembler à celui de la photosynthèse et qui fait appel à des notions d'adaptabilité et d'ajustement décrites par Bourdu et Prioul (1974).

3 - Variations de l'ANR mesurée à différentes températures d'incubation chez des plants traités à ces mêmes températures

La figure 3 met en relief l'action double de la température sur la quantité d'enzyme et sur la vitesse de réaction de cette même enzyme. En effet les basses températures préservent et augmentent la quantité d'enzyme mais diminuent leur vitesse de réaction pendant les mesures (Macduff *et al.*, 1994). En effet, nous observons une activité très faible malgré la présence d'une forte quantité d'enzyme. Seule l'augmentation de la température d'incubation jusqu'à environ 25°C permet un accroissement de l'ANR qui traduit en fait le produit d'une quantité d'enzyme décroissante avec la température (fig 1) et d'une vitesse de réaction croissante avec la température (fig 2). Cette tendance se retrouve aussi aux deux autres stades bien que les valeurs obtenues soient plus faibles et correspondent en fait à la chute de cette activité après le pic observé au stade végétatif.

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

Nous avons représenté dans la figure 4 l'évolution de l'ANR à différentes températures d'incubation en % de l'ANR révélée à 25°C et l'évolution de l'ANR à différentes température de traitement, révélée à ces mêmes températures et exprimée en % de l'ANR révélée à 25°C, afin d'éliminer l'effet des quantités d'enzymes présentes. Nous constatons dans la figure 4 que les courbes ne sont pas superposables, ce qui démontre que la température n'a pas d'effet sur la proportion d'enzyme présentes pouvant participer à la réaction. A partir de l'ensemble des points, nous pouvons obtenir une droite de régression, nous permettant de calculer les coefficients de passage de l'ANR révélée à 25°C à l'ANR *in-situ* mesurée à une température donnée. La droite de régression est composée de deux droites dont les pentes sont différentes: $Y_1 = 1.5 X + 5$ et $Y_2 = 3.9 X - 33$. L'existence de deux droites de pentes différentes et d'un point d'inflexion à 15°C rappelle la théorie de transition de phase des lipides membranaires qui pourraient jouer un rôle important dans les mesures *in-situ* que nous avons réalisées.



**Figure 2 : Effet de la température sur l'ANR
Aux trois stades phénologiques**

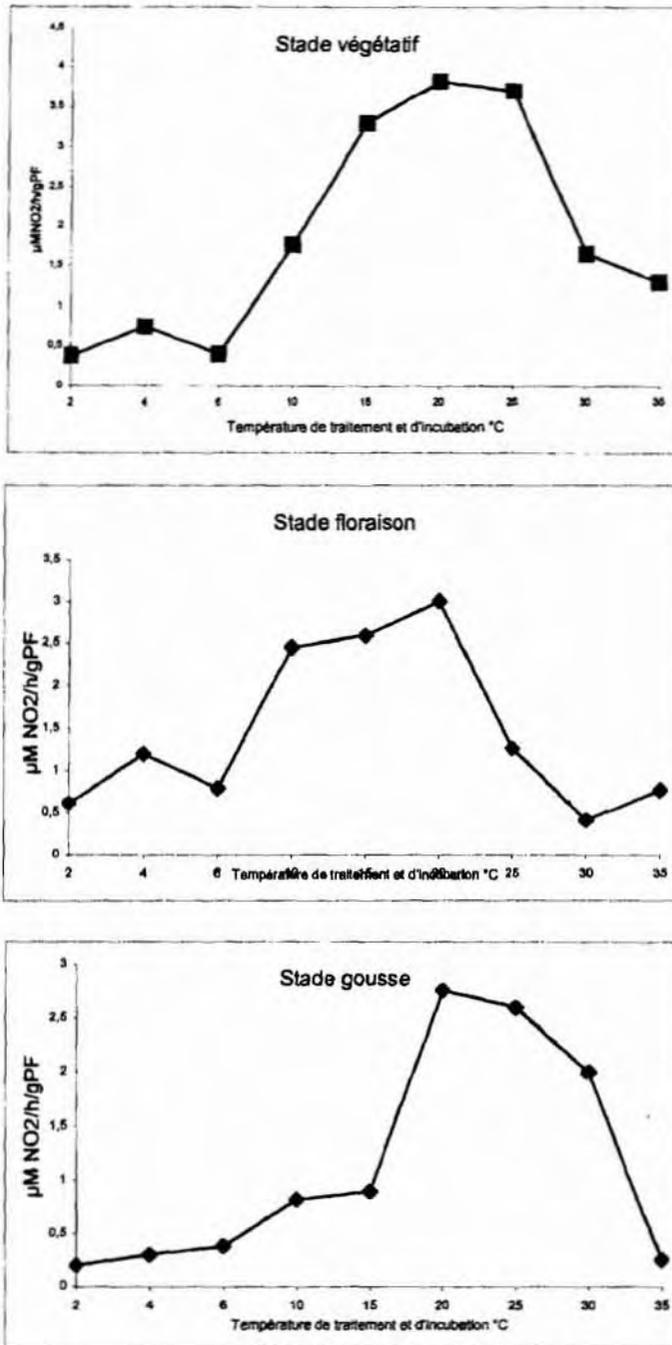


Figure 3 : Effet de la température sur l'ANR révélée à ces Mêmes températures pendant l'incubation

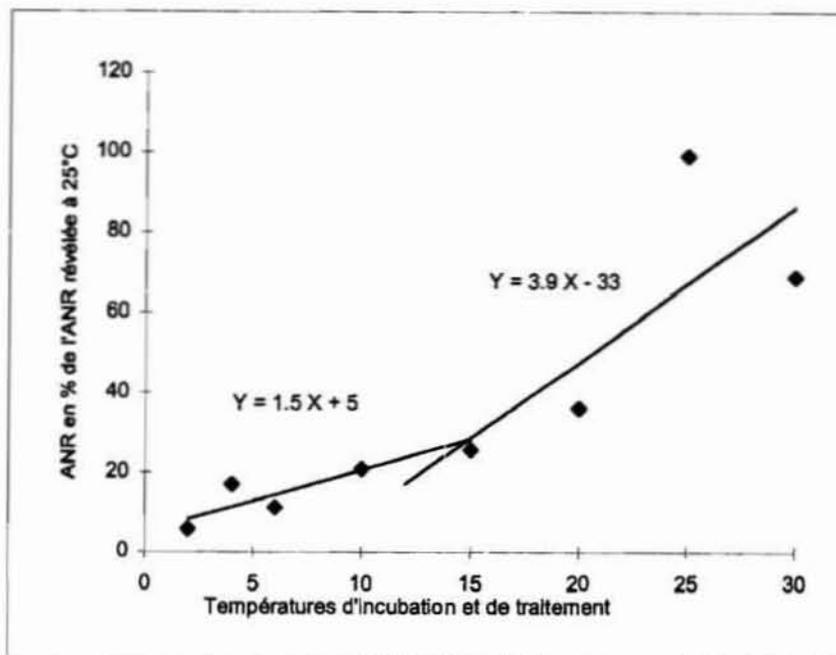


Figure 4 : Droites de régression représentant les points de l'ANR en fonction de la température d'incubation et de l'ANR en fonction de la température de traitement et exprimée en % de l'ANR révélée à une température d'incubation de 25°C.

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

La figure 5 qui nous montre l'évolution de l'ARA en fonction de la température de traitement appliquée aux trois stades phénologiques, laisse apparaître une activité assez faible aux basses températures (0 et 10 °C); mais dans tous les cas, nous remarquons un pic de forte activité aux environs de 25°C. Au delà de ce pic nous constatons à tous les stades une chute brutale et importante. De même l'ARA est plus forte au stade floraison où la fixation atteint généralement son optimum d'activité chez la plupart des légumineuses cultivées et que ce caractère serait propre à l'espèce (Obaton, 1982).

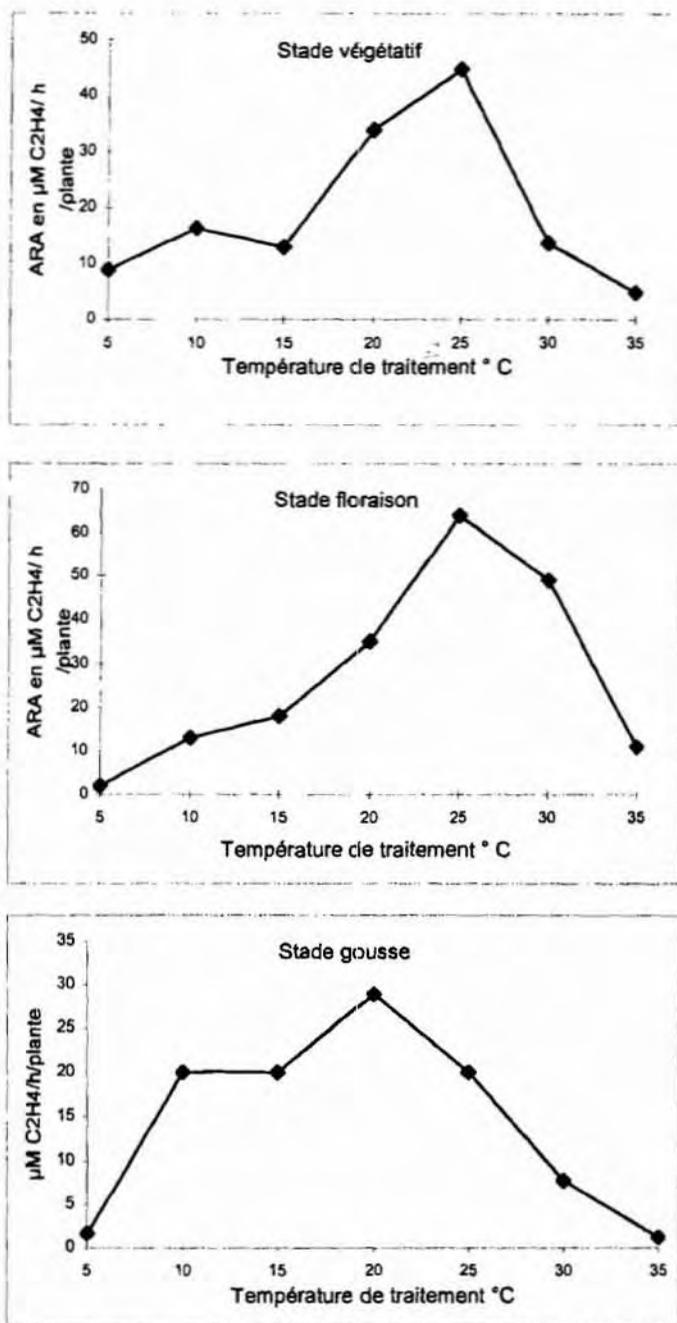


Figure 5 : Effet de la température de traitement sur l'ARA

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

La faible activité de la nitrogénase aux "basses" températures est attribuée soit à un effet direct sur la structure du nodule, soit à un effet indirect sur la photosynthèse. Selon Macdowall *et al.*(1989), les basses températures provoquent une modification de la membrane nodulaire entraînant ainsi une diminution de la diffusion d'oxygène nécessaire au fonctionnement des bactéroïdes, qui sont responsables de la fixation de l'azote atmosphérique. Par contre Roughley (1971) a constaté une diminution de la photosynthèse aux basses températures qui se traduit par une chute de la fourniture du pouvoir réducteur nécessaire à la fixation.

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

- La réduction de la translocation des produits de la photosynthèse nécessaires à l'activité de cette enzyme (Mardowitch, *et al.*, 1986). Par contre Lynch et Smith (1994) trouvent que la fixation peut être limitée par l'utilisation du carbone dans le nodule et non pas par la disponibilité des photosynthétats
- L'augmentation de la production d'hydrogène responsable de la réduction de l'activité nitrogénase (Bertelsen, 1985).
- Le détournement du pouvoir réducteur au détriment de la nitrogénase (Hungria et Franco, 1993).

CONCLUSION

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

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

Les fortes températures (Au delà de 30°C) affectent brutalement la fixation de l'azote et au delà de 35°C, il est probable d'atteindre une inhibition complète de cette enzyme.

L'optimum de cette activité se produit uniquement sur une gamme de températures comprise entre 20 et 30 °C.

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

La comparaison des deux activités ARA et ANR au cours des trois stades phénologiques laisse entrevoir une interaction entre le fonctionnement de ces deux enzymes qui participeraient à un équilibre de la nutrition azotée en réponse à un stress thermique . En semis d'hiver le pois-chiche peut donc assurer sa nutrition azotée par l'assimilation des nitrates du sol pendant la saison froide et par la fixation symbiotique de l'azote de l'air au printemps. Ce relais entre les deux voies de la nutrition azotée constitue à l'heure actuelle une voie de recherche dans le but de permettre aux légumineuses de satisfaire complètement leurs besoins en azote, quelque soient les températures au cours du cycle de développement de la plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALOFÉ C.O., SCHRADER L.E., SMITH R.R., 1973 : Influence of high day and variable night temperatures on nitrate reductase activity of young corn (*Zea mays* L.) plants. *Crop Sci.*, 13, 625-629.
- BALANDREAU J., DOMMERGUES Y., 1971 : Mesure *in situ* de la l'activité nitrogénase. *C.R.Acad.Sci. Paris*, 273, 2020-2023.
- BERTELSEN H., 1985 : Effect of temperature on H₂ evolution and acetylene reduction in pea nodule and in isolated bacteroids. *Plant Physiology*, 77, 335 - 338.
- BOUHAOUCHINE L., DJEBRANI M., ZAGHOUANE O., AIT ABDELLAH F., KHALDOUN S., KAHELARRAS Y., 1998 : Synthèse de l'étude sur les possibilités de réhabilitation et de développement des légumineuses alimentaires en Algérie. *Céréaliculture (ITGC)*, 33, 20-26.
- BOURDU R., PRIOUL J.L., 1974 : Réponse photosynthétique de type adaptatif aux climats lumineux de croissance : étude théorique, applications et diagnostic précoce. *Physiol. vég.*, 12, 35-51.
- DEANE DRUMOND C.E., CLARKSON D.T., JOHNSON C.B., 1980 : The effects of differential root and shoot temperature on the nitrate reductase activity assayed *in vivo* and *in vitro*. *Planta*, 148, 455-461.
- DEROCHE M.E., BABALAR M., 1987 : La nitrate réductase *in vivo* dans les différents organes de la luzerne. La nutrition azotée des légumineuses. Ed. INRA, Paris, Les colloques de l'INRA, 37, 121-133.
- HALLARK W. B., HUFFAKER, 1978 : The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in sudangrass seedling. *Physiol. plant*, 44, 147-152.
- HUNGRIA M., FRANCO A.A., 1993 : Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris*. *Plant and soil*, 149, 95-102.
- LYNCH D.H., SMITH D. L., 1993 : Soybean (*Glycine max*) nodulation and N₂ fixation as affected by exposure to a low root zone temperature. *Physiol. plant.*, 88, 210-220.
- MACDOWALL F.D., LAYZELL D.B., WASH K.B., 1989 : Physiological acclimations to chilling temperature in symbiotically grown alfalfa. *Can., J. Bot.* 67, 352-359.
- MACDUFF J.H., JARVIS S.C., COCKBURN J.E., 1994 : Acclimation of NO₃⁻ fluxes to low root temperature by *Brassica napus* in relation to NO₃⁻ supply. *J. Exp. Bot.*, 45 (277), 1045-1056.

- MARDOWITCH J., RICHTER C., HODDINOTT J., 1986 : The influence of plant temperature on photosynthesis and translocation rates in bean and soybean. *Can. J. Bot.*, 64, 2337-2342.
- MAZLIAK P., 1981 : Régulation à court terme et à long terme de l'activité des enzymes membranaires par la température. *Physiol. Vég. Fran.*, 19 (4), 543-563.
- OBATON M., 1992 : Facteurs pédoclimatiques agissant sur la nutrition azotée des légumineuses. Sixième cours international sur la fixation, ENSA-INRA, 45pp.
- OUNANE S.M. , 1998 : Effet du stress hydrique sur la fixation et l'assimilation de l'azote chez le pois chiche. *Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach*, 19,1 et 2, 114-124.
- ROBIN P., CONEGERO G. , PASSAMA L., SALSAC L. 1983 : Evolution de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure *in situ* de sa réduction. *Physiol.Vég.*, 21, 123-128.
- ROUGHLEY R.J., 1970 : The influence of root temperature, *Rhizobium* strain and host selection on the structure and nitrogen fixing efficiency of the root nodules of *Trifolium subterraneum*. *Ann. Bot.*, 34, 631-646.
- SALL, K. , 1981 : Influence du déficit hydrique sur les activités nitrate réductase et nitrogénase chez le soja (*Glicine max. L. Merrill*) . Thèse Doctorat, INP-ENSA Toulouse, 140p.