

ETUDE DE L'EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LES ACTIVITÉS DES ENZYMES NITRATE RÉDUCTASE ET NITROGÉNASE DE LA CULTURE DU POIS CHICHE (*Cicer arietinum* L.)

F. BACHA¹, SM. OUNANE²

1. INRAA. Laboratoire Sciences du Sol. CRP Mehdi boualem, BP 37 Baraki 16210 Alger.

2. INA. Département de phytotechnie

Résumé : Ce travail a permis d'étudier chez la culture du pois chiche, l'effet du déficit hydrique sur la fixation biologique de l'azote atmosphérique et l'assimilation de l'azote minéral du sol. Les déficits hydriques d'intensités et de durées différentes ont été appliqués à trois stades phenologiques de la plante. Pendant la contrainte, définie à partir du tarissement de la réserve utile du sol, la fixation de l'azote mesurée par l'activité réductrice de l'acétylène et la dilution isotopique, est plus inhibée que l'activité nitrate réductase mesurée par la méthode *in situ*. Le déficit hydrique sévère semble cependant, maintenir une certaine activité de l'assimilation, alors que la fixation est totalement annulée. Il a été démontré que le taux de fixation de l'azote est étroitement corrélé avec la teneur en eau des nodules.

La réalimentation des plants stressés, révèle en 48 heures une sur stimulation de l'activité nitrate réductase, et une reprise de l'activité nitrogénase sauf pour le stress sévère où l'inhibition de celle-ci devient irréversible, traduisant ainsi une destruction profonde des cellules nodulaires.

Mots clés : déficit hydrique, pois chiche, nitrogénase, nitrate réductase, fixation d'azote biologique, assimilation de l'azote minéral, azote 15.

Abstract : The present work permitted to study at the culture of chickpea, responses of biological nitrogen fixation and mineral nitrogen assimilation to drought stress. Drought stress of unequal intensity and lengths have been applied at three phenological stages of the plant.

During the constraint, defined from drying up of the reserve useful soil, the nitrogen fixing measured by the reducing activity of the acetylene and labelled dilution, is inhibited more than nitrate reductase activity measured by the method *in situ*.

The stern drought stress seems however, to maintain a certain activity of the assimilation, whereas nitrogen fixation is annulled completely. It has been demonstrated that the rate of nitrogen fixing is closely correlated with nodules water content.

The recovery of stressed plants, reveal in 48 hours an over stimulation of nitrate reductase activity, and retaking of nitrogenase activity except for the stern stress where the inhibition of this becomes irreversible, translating a deep nodular cell destruction.

Keys words : drought stress, chickpea, nitrogenase, nitrate reductase, nitrogen fixation, nitrogen assimilation, nitrogen 15.

INTRODUCTION

Dans les régions méditerranéennes, la production agricole et les rendements des cultures sont largement dépendants de la disponibilité en eau et en azote au moment opportun. Ces deux éléments constituent les facteurs limitants essentiels de la production végétale du fait de la fréquence des déficits hydriques et de la rapidité de la dégradation de la matière organique.

Ces différents problèmes associés à l'immense besoin en protéines dans l'alimentation humaine ont amené les chercheurs à s'intéresser à la culture des légumineuses.

L'intérêt des légumineuses et notamment du pois chiche réside dans leur teneur élevée en protéines de haute valeur nutritive en complément de celle des céréales, et elles jouent aussi un rôle important dans les systèmes de cultures en contribuant à l'amélioration de la fertilité du sol par les reliquats d'azote qu'elles laissent, et en font ainsi un excellent précédent cultural.

Suivant les conditions du milieu, les légumineuses en association avec les *Rhizobium*, peuvent présenter une fixation de l'azote très active et enrichir le sol en cet élément ou au contraire assimiler le nitrate du sol comme une céréale en appauvrissant le milieu.

L'amélioration de la nutrition azotée des cultures de légumineuses par le perfectionnement des techniques culturales et les comparaisons génotypiques, en conditions de stress hydrique, en prenant en considération seulement le rendement des cultures, est une première étape nécessaire mais insuffisante ; il faudrait prendre en compte la sensibilité de certains métabolismes physiologiques intervenant dans la nutrition azotée, qui nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes qui entrent en jeu (Wery et al., 1994 ; Planquart et al., 1990).

Notre travail s'insère dans le cadre global de l'amélioration de la nutrition azotée des

légumineuses, le pois chiche étant pris comme modèle. L'originalité des associations *Rhizobium*-légumineuses est liée au fait qu'elles disposent de deux voies de nutrition azotée : la fixation symbiotique de l'azote moléculaire et l'assimilation de l'azote minéral du sol. Ces deux voies peuvent être complémentaires ou concurrentes suivant les conditions du milieu (contraintes hydriques notamment).

A cet effet, l'objectif de notre travail consiste en l'étude du fonctionnement des enzymes : la nitrate réductase et la nitrogénase responsables respectivement de l'assimilation de l'azote minéral du sol et de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, chez le pois chiche en conditions de stress hydrique. Pour mieux caractériser les effets du stress hydrique sur la nutrition azotée, nous avons étudié l'influence d'un déficit hydrique croissant, modéré puis sévère, appliqué à trois stades phénologiques de la plante.

En Algérie, le climat est caractérisé par une succession de contraintes temporaires, qui sont plus ou moins intenses en fonction de l'intervalle entre deux pluies ou deux irrigations. Il nous a semblé donc particulièrement important d'étudier aussi la reprise des deux activités enzymatiques quand les contraintes hydriques sont levées.

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Conditions de culture :

Le travail expérimental a porté sur une culture de pois chiche, variété ILC 3279. C'est une variété tardive, d'origine russe, de type Cabuli.

L'essai a été effectué sous serre, dans des pots en plastique d'une capacité de 10 litres, remplis d'un mélange équivalent de terre, de sable de rivière et de terreau préalablement désinfecté. L'analyse physico-chimique de ce

mélange a révélé que c'est un sol de nature sablono-limoneuse (selon le diagramme de texture adopté par la classification américaine (Duchauffour 1980), de pH alcalin et riche en éléments : N, P, K (selon les normes AFNOR 1997).

Les graines n'ont pas été inoculées, car le *Rhizobium* existe dans le sol. L'irrigation des plantes a été effectuée régulièrement, jusqu'au stade de l'application du stress hydrique, Celle-ci a été provoquée par un tarissement de l'eau du sol.

2. Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental a comporté trois essais, mené chacun selon un dispositif en blocs aléatoires complets. Les pots ont été disposés en quatre blocs. Chaque essai correspond à un stade phénologique donné de la culture à savoir : Stades développement végétatif, début floraison et remplissage des gousses. Les traitements suivants ont été affectés à chaque bloc :

- intensité de stress hydrique comportant :
 - 40% du tarissement de la réserve utile du sol ;
 - 80% du tarissement de la réserve utile du sol ;
 - pots lysimétriques (ETM), pris comme témoins.
- durée de stress hydrique comportant quatre niveaux : (0, 3, 6 et 9 jours de stress)
- apport de l'azote marqué sous forme de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 5 unités à 1% at excès pour la quantification de l'azote fixé.

II - MESURES EFFECTUÉES

1. Mesure de l'état du stress de la culture :

La méthode du suivi du dessèchement du sol se fait par des pesées des pots tous les jours, à partir du poids initial (Pi) correspondant à la capacité de rétention (CR) juste avant le

stress, jusqu'à l'obtention du poids final (Pf) à la fin du stress. Le poids final est déterminé selon la méthode des pesées suivante :

$$\text{Pf} = \text{Pi} - x\text{RU}$$

Pi : poids initial du pot à la capacité de rétention, **Pf** : poids final du pot à la fin du stress (g)
x RU : réserve utile du sol (g / g du sol sec) au taux recherché (60 % de la RU, 20% de la RU).

2. Mesure de l'activité Nitrate Réductase :

La mesure de l'ANR in situ, mise au point par Robin et al., (1983) et améliorée par Obaton (1993), consiste à doser le nitrite produit par réduction du NO_3^- dans un échantillon intact de végétal. Les premières feuilles du sommet de la tige principale sont coupées et immédiatement pesées puis introduites dans des tubes venoject de 13 ml contenant 0,1ml de KNO_3 à 0,1M. Le tube est fermé hermétiquement avec un bouchon de caoutchouc traversé par deux aiguilles de seringue creuses. L'anoxie est réalisée en injectant par une des aiguilles de l'azote gazeux sous pression (1,5 bar), la deuxième aiguille permet la sortie de l'air. Le balayage est interrompu après 1 minute par retrait simultané des deux aiguilles.

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

Le nitrite produit est alors révélé en ajoutant 2ml de sulfanilamide (10g / l dans HCl 1,5N) et 2ml de N-Naphtyl - Ethylène Diamine - Dichlorure (0,2g / l). Après 10 minutes de réaction, la coloration est lue au spectrophotomètre à 540 nm. L'activité de la nitrate réductase est mesurée par le nombre de moles de NO_2^- formées par gramme de matière fraîche végétale et par heure :

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

3. Mesure *in situ* de l'activité réductrice de l'acétylène (ARA) :

La fixation de l'azote par la symbiose peut être appréciée par mesure de l'activité de la nitrogénase grâce à une propriété originale de celle-ci, qui en plus de l'azote moléculaire et de l'hydrogène, elle est capable de réduire un certain nombre de molécules à triples liaisons dont l'acétylène en éthylène.

Le dispositif utilisé pour la mesure de l'ARA sur plante en place cultivée en pot est celui proposé par Obaton (1993). Le compartiment racinaire est isolé de la partie aérienne de la plante, en couvrant la partie supérieure du pot par un couvercle en Plexiglas, l'étanchéité complète est assurée par du mastic. L'acétylène est injecté à travers une aiguille placée à la partie supérieure du pot. Le volume réactionnel du pot correspond à la macroporosité du sol. Après 30 mn d'incubation, 5ml de d'éthylène produit dans le pot sont prélevés et stockés dans des tubes venoject. Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

La quantité d'éthylène produite est calculée à partir de la concentration mesurée au chromatographe par rapport à une valeur étalon. Pour chaque temps de prélèvement, l'ARA est calculé en $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 / \text{heure} / \text{plante}$, selon l'expression suivante :

$$\text{ARA} = \frac{S_1 \times V1 \times V2}{22400 \times S_2 \times V3}$$

4. Analyse de l'azote 15 :

Avec l'utilisation de l'ARA *in situ*, comme méthode comparative, nous avons associé la mesure quantitative par l'utilisation de la méthode de la dilution isotopique pour déterminer la quantité exacte de l'azote fixé. Les composants de l'azote des échantillons ont été convertis en azote gazeux selon la méthode de Kjeldhal. Après la titration, les

échantillons ont été ramenés rapidement à un pH compris entre 3 et 4 afin d'éviter les pertes d'azote par volatilisation.

Pour l'élimination de la plus grande partie de l'eau, les échantillons ont été séchés par chauffage (évaporation douce à 60°C). Puis l'ammonium est transformé en azote gazeux en utilisant une solution alcaline d'hypobromite de sodium pour oxyder l'ammonium (Danso et al., 1994). Ainsi l'azote gazeux libéré est dosé en spectrométrie de masse.

La comparaison des excès isotopiques des deux lots de plantes par spectrométrie d'émission permettra de déterminer la fraction azotée venant de l'air par les formules suivantes :

$$\text{Ndfa (\%)} = \frac{1 - \%^{15}\text{N excès dans la plante fixatrice}}{\%^{15}\text{N excès dans la plante référence} \times 100}$$

$$\text{N fixé (\%)} = \% \text{Ndfa} \times \text{rendement N total}$$

5. Traitements statistiques des données :

Des analyses factorielles de variance des moyennes à 2 critères de classification ont été réalisées. Des analyses de la différence entre les moyennes des traitements appliqués ont été réalisées par le test de Newman-Keuls (Dagnelie, 1975).

III - RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Evolution de la fixation de l'Azote au cours du stress hydrique :

- Pour un régime hydrique non limitant (ETM), l'activité nitrogénase semble très importante durant la floraison, elle atteint une valeur de 94,93 $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4 / \text{h} / \text{plant}$.

- Pour un déficit hydrique modéré (40% du tarissement de la RU), nous avons enregistré

une diminution significative de l'ARA, la chute de celle-ci augmente avec la durée du stress. En effet, au sixième jour l'ARA baisse de 91 et 69% par rapport à l'activité du témoin (respectivement durant les stades végétatif et floraison) jusqu'à son annulation au bout du neuvième jour de stress.

- Pour un déficit hydrique sévère 80% du tarissement de la RU, l'ARA est fortement inhibée. Dès l'installation du stress, nous avons enregistré une forte baisse aussi bien pendant le stade végétatif que le stade floraison. Au troisième jour de stress, l'ARA maintient une très faible activité, elle s'annule dès le sixième jour pendant le stade végétatif et le neuvième jour durant la floraison.
- Au stade développement des gousses, nous n'avons décelé aucune activité enzymatique, aussi bien pour les plantes irriguées que pour les plantes stressées. Ceci serait dû au stress thermique sévère que les plantes auraient subi pendant ce stade et pendant la mesure elle-même. En effet, pendant le stade gousses, les températures extrêmes que nous avons enregistrées variaient entre 30 et 35°C. La plupart des travaux consacrés à l'étude de l'effet de la température élevée

sur la fixation ont montré que celle-ci est inhibée en causant la sénescence précoce des nodules (Bordeleau et Prévot, 1994 ; Ounane et al., 2000) ou en réduisant la translocation des produits nécessaires à l'activité nitrogénase (Kato et Saïko, 1992). Hardy et al, (1973) rapportent aussi que les hautes températures supérieures à 25 °C causent un accroissement de la production d'hydrogène considéré comme un inhibiteur de la fixation. Par ailleurs l'analyse de la variance des traitements a révélé une différence très hautement significative de l'ARA sous l'effet de l'intensité, la durée et de l'interaction entre ces deux facteurs, et ce pour les stades végétatif et floraison (prob : 0,0000).

La comparaison de l'activité de l'ARA durant les stades phénologiques par le test de Newman et Keuls a montrée une différence entre les moyennes : l'ARA est plus inhibée au stade végétatif.

Les résultats du taux d'azote fixé que nous avons obtenu par les mesures isotopiques, confirment l'inhibition de la fixation de l'azote mesurée par la réduction de l'acétylène (tableau I). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Beck et al (1991).

Tableau I. Effet du stress hydrique sur le taux d'azote fixé (%)
(Mesuré par la dilution isotopique)

Stades Traitements	Végétatif	Floraison	Développement Gousses
	ETM	30.00 ± 0.05	58.31 ± 0.03
40% - 0 jour	20.69 ± 0.03	37.76 ± 0.02	17.60 ± 0.01
40% - 3 jours	19.14 ± 0.13	29.72 ± 0.03	17.00 ± 0.03
40% - 6 jours	19.00 ± 0.20	29.00 ± 0.01	17.80 ± 0.21
40% - 9 jours	18.32 ± 0.10	20.02 ± 0.10	14.16 ± 0.03
80% - 0 jour	19.87 ± 0.01	24.00 ± 0.01	16.66 ± 0.02
80% - 3 jours	16.70 ± 0.02	19.48 ± 0.02	11.08 ± 0.11
80% - 6 jours	14.92 ± 0.01	18.66 ± 0.04	11.00 ± 0.02
80% - 9 jours	12.37 ± 0.04	16.47 ± 0.10	10.00 ± 0.01

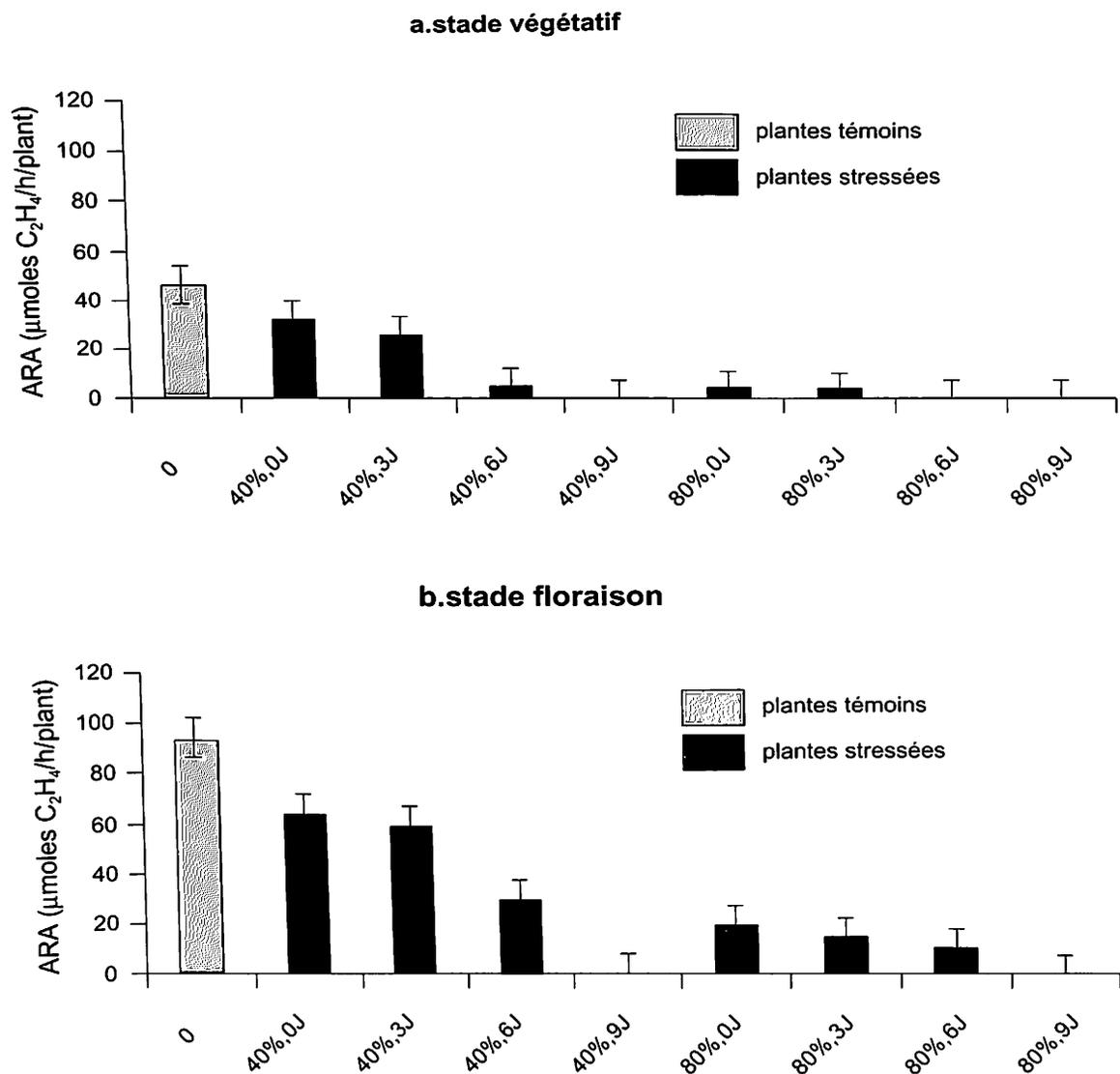


Figure1 : Evolution de l'ARA sous l'effet des intensités et des durées de stress hydrique.

Cependant, on constate en fin de cycle de la plante (développement des gousses), une différence entre les deux méthodes de mesures : la fixation mesurée par la méthode de la réduction de l'acétylène s'arrête, alors que la méthode isotopique nous indique qu'elle se poursuit, résultats en accord avec ceux de Atta et al (1994), obtenus sur Pois.

La sensibilité de la fixation de l'azote au déficit hydrique serait due à l'effet direct du stress sur le fonctionnement du nodule, en affectant son état hydrique. Nos résultats montrent qu'en conditions hydriques favorables, la teneur en eau des nodules est de l'ordre de 473% (figure2), ces résultats confirment bien ceux de Sprent (1971 a et b),

et montrent l'importance de cet élément dans la constitution de cet organe. La diminution du statut hydrique des nodules durant la période du déficit hydrique a une incidence directe sur l'ARA. En effet, nous avons pu montrer (figure 3) que celle-ci est étroitement corrélée avec la teneur en eau des nodules ($R^2 = 0,8492$). Cette grande sensibilité des nodules provient du fait que ceux-ci ne possèdent pas de mécanismes de régulation des flux d'eau, comme c'est le cas des stomates au niveau des feuilles (Chaves, 1991). Les

nodules perdent leur eau à travers leur épiderme lors du dessèchement du sol qui les entoure. La réduction du contenu en eau nodulaire entraîne la dessiccation des tissus et diminue la porosité de leur épiderme, provoquant ainsi une réduction de la perméabilité nodulaire à la diffusion de l'eau et de l'oxygène nécessaires aux bactéroïdes, ainsi, la capacité des nodules pour réaliser la phosphorylation oxydative, indispensable au fonctionnement de la nitrogénase, se trouve limitée (Drevon, 1994).

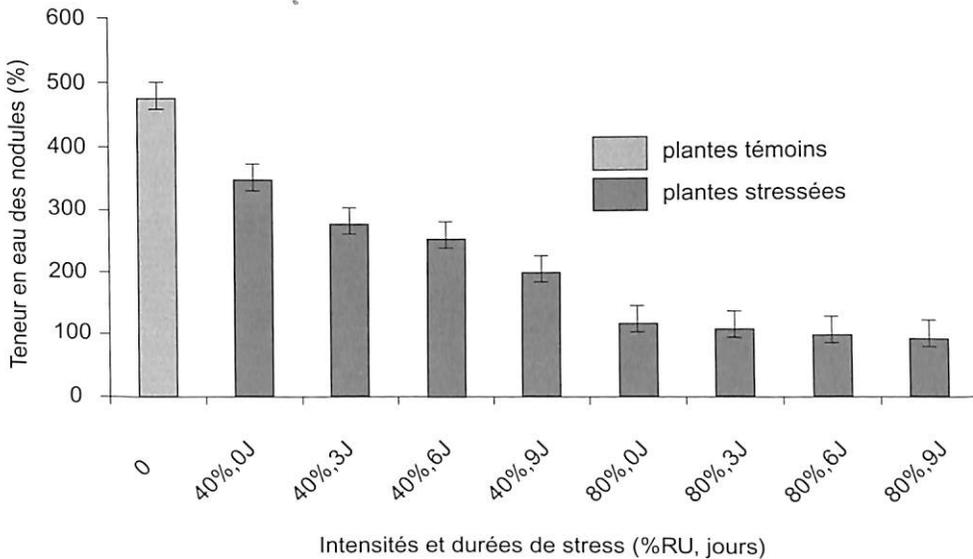


Figure 2 : Evolution de la teneur en eau des nodules au cours du stress hydrique.

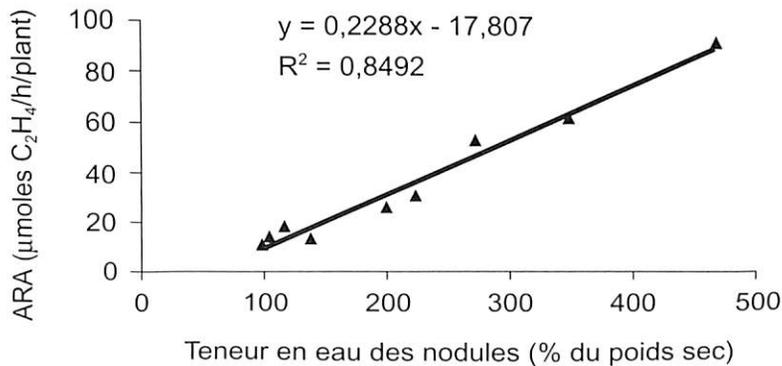
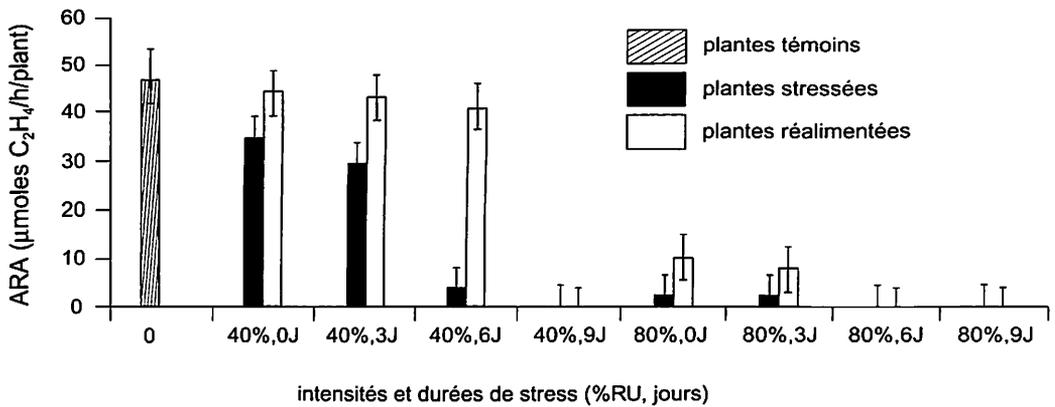


Figure 3 : Relation entre la teneur en eau des nodules et l'activité réductrice de l'acétylène.

D'autre part, l'inhibition totale de l'ARA que nous avons obtenu lors d'un déficit hydrique intense, peut s'expliquer par l'effet indirect du stress sur la fixation par la diminution de la production des assimilats ou bien de leur transport vers les nodules. Cet effet indirect

du stress à travers la limitation de la photosynthèse est très claire dans la plus part des travaux basés sur des expérimentations de déficit hydrique de longue durée (Djekoun, 1991).

a. stade végétatif



b. stade floraison

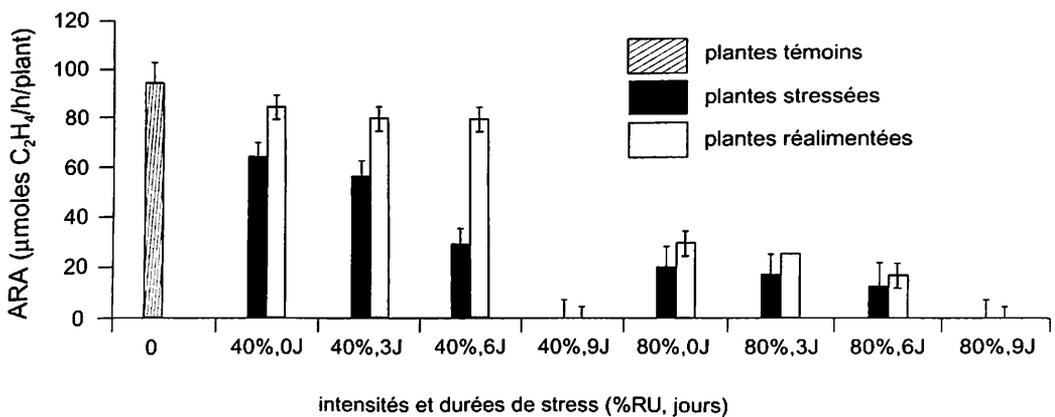


Figure 4. Réponse de l'activité réductrice de l'acétylène des plants réalimentés en eau après stress

2. Réponse de la fixation de l'azote à la réalimentation en eau après un stress :

La Figure 4, représentant la réponse de l'ARA à la réalimentation en eau, 24 heures après le stress, montre une reprise presque totale de celle-ci pour un niveau de stress hydrique modéré, résultats en accord avec ceux de Bennet et Albecht (1984). Ce fait traduit probablement une bonne conservation des structures cellulaires des nodules. Cependant, pour un déficit hydrique sévère, la reprise de l'ARA après le stress est partielle ou nulle. Ceci corrobore les résultats de Sall (1987) sur soja, montrant qu'un déficit hydrique sévère peut entraîner une destruction partielle ou totale de la nitrogénase. D'après les résultats que nous avons obtenus, nous pouvons distinguer deux phases dans la reprise de l'ARA :

- **La première phase** est rapide, avec une reprise de l'ordre de 88 à 80% de l'activité initiale de l'ARA après 24 heures. Ceci serait lié à la réhydratation des tissus nodulaires après un stress modéré.
- **La seconde phase** est plus lente, la reprise est de l'ordre de 50% de l'activité initiale ou nulle après 48 heures, et peut être attribuée à la reprise de l'activité du méristème nodulaire qui est liée à l'augmentation de la masse nodulaire, probablement ordonnée par la reprise de l'arrivée du flux des photosynthétats au niveau des nodules (Wery, 1987).

Nous pouvons dire que la reprise de l'ARA durant cette phase serait plus difficile, elle dépendrait de la production de nouveaux nodules, qui est un processus long et coûteux en énergie.

3. Evolution de l'activité nitrate réductase au cours du stress hydrique :

L'activité nitrate réductase est affectée par le stress hydrique. Cependant, selon l'intensité et la durée du stress imposé, différentes réponses ont été enregistrées (Figure. 5) :

- Pour un régime hydrique non limitant (ETM), l'activité nitrate réductase passe par un maximum durant le stade végétatif, diminue pendant la floraison et augmente de nouveau son activité au stade développement de gousses.
 - Pour un déficit hydrique modéré, nous avons enregistré une légère baisse de l'ANR durant les trois stades.
 - Pour un déficit hydrique sévère, la diminution de l'ANR est plus importante, soit environ 40% par rapport à l'activité initiale.
 - Avec les différentes durées de stress appliquées, nous remarquons une certaine stabilité de l'ANR, sauf pendant le stade floraison où la chute de celle-ci est plus marquée.
- Cependant, l'analyse de la variance a révélé une différence significative de l'ANR sous l'effet de l'intensité (prob : 0.0118 et 0.0014) et de la durée (prob : 0.0142 et 0.0003) respectivement durant les stades floraison et développement des gousses, et non significative durant le stade végétatif. Par ailleurs, la comparaison des moyennes entre elles par le test de Newman-Keuls a montré que le stade floraison est plus affecté par la durée et les intensités de stress appliqués

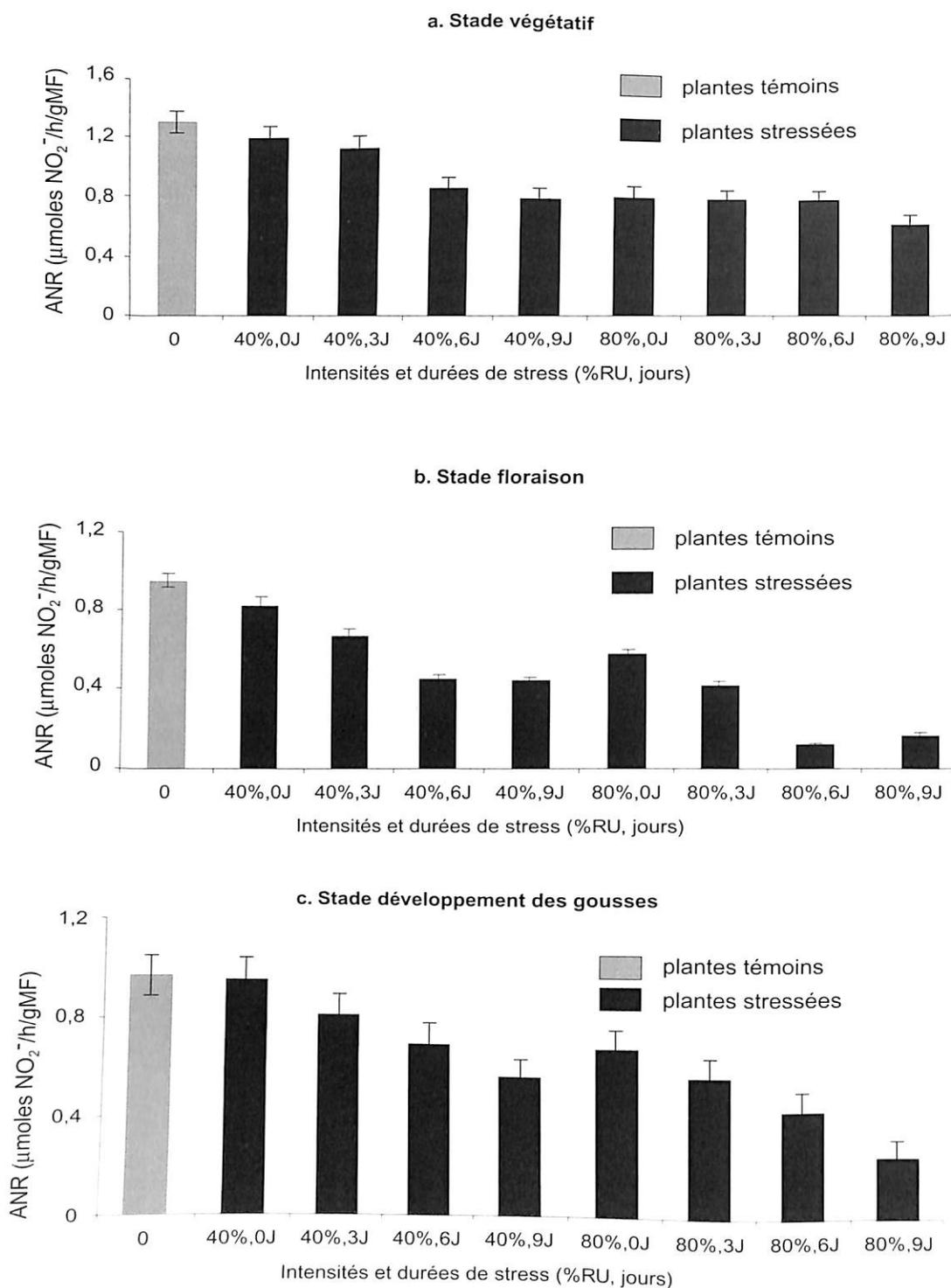


Figure 5 : Evolution de l'ANR sous l'effet des intensités et des durées de stress hydrique

4. Réponse de l'assimilation de l'azote à la réalimentation en eau après un stress :

Après retour à une irrigation normale, 24 heures après la fin de la contrainte, nous avons observé une reprise totale de l'ANR par rapport à l'activité initiale et qui dépasse parfois même celle du témoin, et ce pour tous les traitements appliqués et durant les trois stades phénologiques de la plante (Figure. 6). L'activité nitrate réductase ne semble pas très affectée par le déficit hydrique. En effet, l'ANR baisse très lentement lors d'un déficit hydrique modéré. Lors d'un stress hydrique sévère, l'inhibition de l'ANR est plus importante. Nous avons enregistré une diminution qui varie de 30 à 70% par rapport à l'activité du témoin ; ceci est dû à la réduction du flux des nitrates vers les feuilles, impliqué dans l'induction de la nitrate réductase (Meyer et al., 1993).

Les faibles valeurs de l'ANR que nous avons enregistrées pendant le stade floraison, seraient dus au fait qu'il se produit à ce moment une compétition pour l'énergie et les substrats carbonés, entre l'ARA et l'ANR (Wery et al, 1993), durant cette phase c'est la fixation qui prend le relais. Pendant les stades végétatifs et développement des gousses, nous avons observé une diminution graduelle de l'ANR, qui se stabilise ensuite avec l'augmentation de la durée du stress. Ceci serait dû à un mécanisme de résistance de la plante pour surmonter momentanément le stress.

Plusieurs travaux ont montré que le pois chiche réalise essentiellement un ajustement osmotique (Morgan et al., 1991; Nalin, 1993),

en accumulant au niveau vacuolaire un certain nombre de solutés : acides malique, malonique et saccharose et ou des cations et anions (potassium, magnésium, calcium et nitrates) (Le Coeur et al., 1992). Néanmoins, d'autres travaux désignent le nitrate comme l'anion principal qui assure le rôle d'ajustement osmotique (Salsac et al., 1987; Talouizte, 1987), du fait qu'il possède une vitesse d'absorption par les racines et d'accumulation dans les vacuoles cellulaires très importante (Meyer et al., 1993).

Après retour à une irrigation normale, et 24 heures après la fin de la contrainte, l'enzyme nitrate réductase reprend rapidement son activité et devient même supérieure à celle du témoin. Ce phénomène a été observé chez le trèfle (Wery et al., 1986), et le Dactyle (Triboi - Blondel, 1978). Cette sur-stimulation de l'activité nitrate réductase après un stress serait due à un emmagasinement des nitrates au niveau des vacuoles cellulaires des plantes préalablement stressées, ce qui induit une grande activité nitrate réductase juste après la levée de la contrainte hydrique.

Ce type d'accumulation des nitrates pendant la période du stress hydrique peut être expliqué par une plus grande inhibition de la réduction des nitrates que de leur absorption. Elle peut résulter aussi d'une réponse de la plante pour maintenir une certaine pression osmotique, nécessaire à la turgescence des cellules.

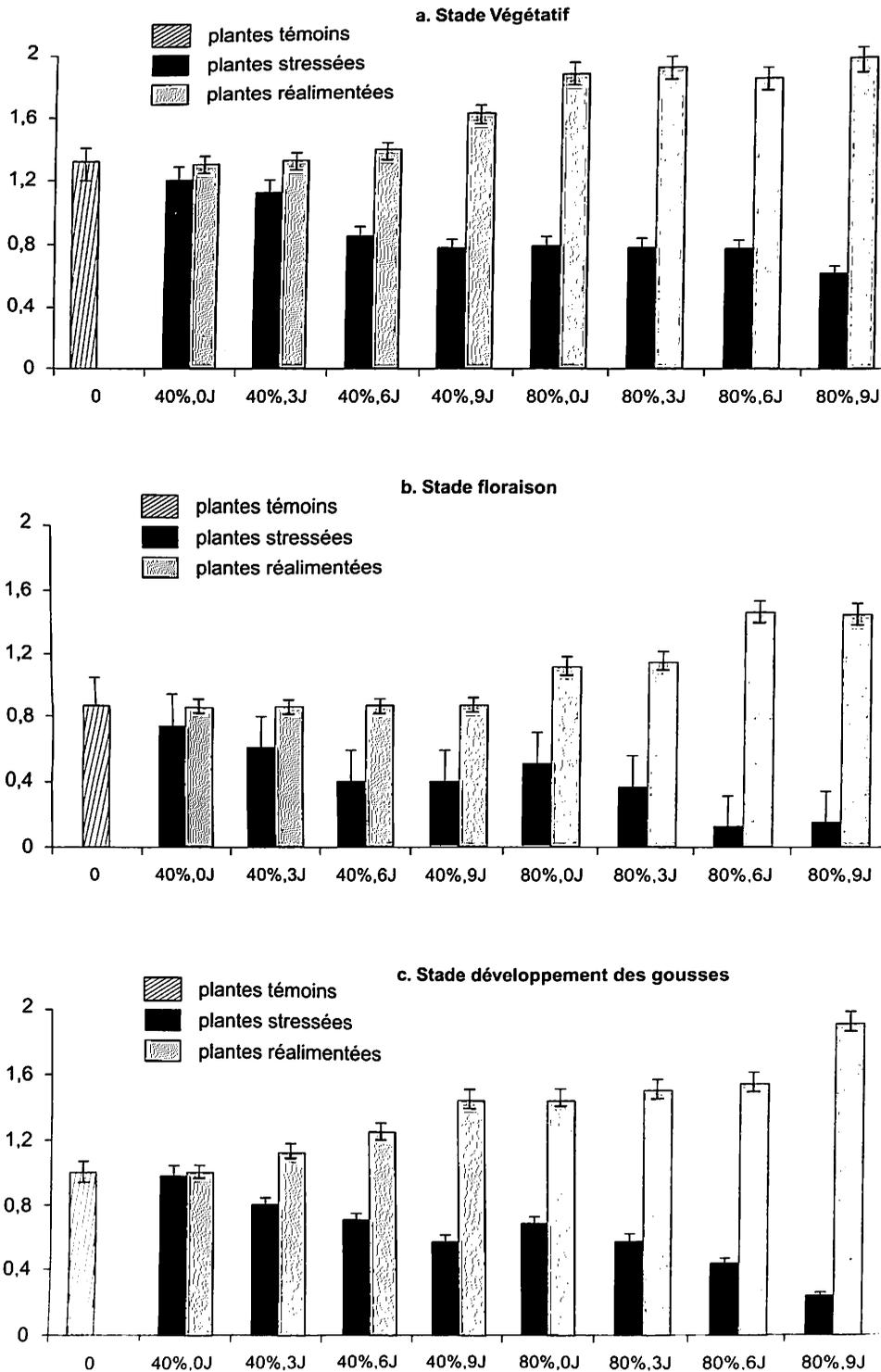


Figure 6 : Réponse de l'activité nitrate réductase des plants réalimentés en eau après stress

CONCLUSION

Le pois chiche, plante riche en protéines a des besoins importants en azote. Comme les autres légumineuses nodulées, elle est capable d'utiliser deux voies par la nutrition azotée : assimilation des nitrates du sol et fixation biologique de l'azote atmosphérique.

Le fonctionnement de ces deux voies dépend d'une multitude de facteurs : physiologiques, génétiques et environnementaux.

L'optique adoptée dans ce travail consiste à une meilleure connaissance du fonctionnement des activités des deux voies de la nutrition azotée en conditions hydriques défavorables.

L'application d'un stress progressif, nous a permis de constater que l'activité réductrice de l'acétylène est le processus le plus sensible au stress hydrique. En effet, nous avons confirmé cette inhibition par des mesures du pourcentage d'azote fixé en utilisant la méthode isotopique.

Cette sensibilité au stress est plus importante au stade végétatif qui semble représenter une phase très sensible du cycle de la plante. La sensibilité de la fixation se manifeste par des perturbations de l'état hydrique nodulaire, et nous avons pu démontrer l'étroite corrélation entre la teneur en eau des nodules et l'activité réductrice de l'acétylène.

Selon nos données, il apparaît que l'assimilation des nitrates n'est pas très affectée par le stress ; elle présente une sensibilité surtout au stade floraison avec une diminution de 80% par rapport à l'activité du témoin au neuvième jour d'un stress sévère.

Pour mieux nous rapprocher des conditions naturelles, nous avons procédé à une réalimentation en eau des plants stressés, afin d'apprécier leur aptitude à reprendre une activité normale. Nous avons pu déceler une reprise presque totale de l'activité réductrice d'acétylène des nodules pour le stress modéré.

Durant ce dernier, la reprise de l'activité de l'ARA est complète chez les plantes ayant subi ce stress pendant trois jours, et faible pour un stress modéré de six jours, ainsi que pour un stress sévère appliqué pendant une durée inférieure ou égale à six jours.

Cependant, il n'y a pas de reprise quand l'activité de l'ARA subit une inhibition totale pendant le stress, traduisant ainsi une destruction profonde des structures des nodules lors d'un stress sévère.

Par contre pour l'activité nitrate réductase des feuilles, la reprise est totale pour tous les traitements appliqués et durant tous les stades, et dépasse même l'activité du témoin. Ceci nous conduit à dire que le stress hydrique a un effet sur la réduction des nitrates et pas sur leur absorption.

A partir des résultats obtenus, il en découle les conclusions suivantes :

- Le stress hydrique affecte beaucoup plus la fixation de l'azote que l'assimilation particulièrement dans un sol pourvu en nitrates. Cette observation suggérerait que la nature de l'alimentation azotée peut influencer la résistance de la plante à la sécheresse. Si une plante est alimentée en azote uniquement par la fixation biologique, sa capacité de résistance à la sécheresse est nettement diminuée.

Ceci montre la nécessaire complémentarité des deux voies de la nutrition azotée, où l'assimilation de l'azote pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la production de la légumineuse; ceci est particulièrement important pour les plantes qui passent par une succession de petits stress hydriques.

- La sensibilité de la fixation au stade végétatif, et l'étroite corrélation entre la teneur en eau des nodules et l'activité réductrice de l'acétylène, nous suggère une nouvelle

approche de travail qui tiendrait compte du double avantage que procure une nodulation composée en majorité de nodules de grandes tailles :

leur meilleure efficacité à fixer l'azote quand les conditions hydriques sont favorables, mais également leur capacité à maintenir un niveau de cette activité lorsque les conditions deviennent plus limitantes.

- Nous avons pu mettre en évidence que les changements produits par le stress hydrique en mesurant les activités nitrate réductase et nitrogénase, peuvent constituer des critères de contrôle potentiels pour la mesure de la résistance à la sécheresse d'une espèce.

C'est une variabilité génotypique importante qu'il faudrait exploiter dans les programmes de sélection. La sélection pour une capacité à optimiser les deux voies de la nutrition azotée serait un moyen justifié pour l'amélioration des rendements du pois chiche cultivé sous une contrainte hydrique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- **AFNOR. 1997.** Polycope sur les analyses de routines internationales des sols et des végétaux. Normes AFNOR. Ed Université de Minia. 143 p
- **ATTA S., COUSIN R., ET MARGET P. 1994.** Etude de la fixation et de l'assimilation de l'azote chez le pois (*Pisum sativum*).in: Recent Developpements in Biological Nitrogen Research in Africa (M.Sadiki et A.Hillali Eds). IAV Hassen II.
- **AXMAN H. 1990.** Methods for ¹⁵N determination. In: Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Série N° 2, 223p.G. Hardarson Ed. AIEA, Vienna.
- **BENNET JM ET ALBRECHT. 1984.** Drought and flooding effects on N₂ fixation, water relations and diffusive resistance of soybean. Agron. J., 76, 735-740.
- **BORDELEAU ET PREVOT. 1994.** Nodulation and nitrogen fixation. Period biol. 87 (2), 111-120.
- **DANGNELIE P. 1975.** Théorie et méthodes statistiques. Tome2. Presses Agron. Gembloux. 2, 463p.
- **DANSO SKA., HARDARSON G., ZAPATA F. 1993.** Misconceptions and pratical problems in the use of ¹⁵N soil enrichment techniques for estimating N₂ fixation. Plant and soil, 152 : 25-52.
- **DERANCART C. 1994.** Contribution à l'étude de l'activité nitrogénase de protoplastes de cellules infectées de nodosités de soja (*Glycine max L*). Thèse de Doctorat. ENSA-INRA. Montpellier., 185p.
- **DJEKOUN AH. 1991.** Photosynthèse, Fixation Symbiotique de l'Azote et Résistance à la Sécheresse chez le Soja (*Glycine max. L. Merrill*).Thèse de Doctorat d'état, 144 p.
- **DREVON JJ., DERANSART C., ROY G., SERRAG R., VADEZ V. 1994.** Les réponses des échanges nodulaires à l'O₂ permettant de mieux comprendre diverses limitations de la fixation symbiotique de l'azote. In : Recent Developments in Biological Nitrogen Fixation Research in Africa. (M. Sadiki and A. Hillali Eds). IAV. Hassen II.
- **DUCHAUFFOUR PH. 1980.** Précis de pédologie. 3^{ème} édition. Ed Masson-Paris. 800 p.

- **ELMERICH C. 1993.** Nitrogénase : aspects biochimiques, moléculaires et génétiques. in : Assimilation de l'azote par les plantes. J.F. Morot-Gaudy (eds). p 162-163.
- **HARDY., BRUNS ET HOLSTEIN. 1973.** Application of acetylene reduction assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5, 47-81.
- **KATTO T., SAIKO M. 1992.** Effects of chilling temperature and low irradiation on nitrogen uptake and assimilation by soybean plant. *Tohoku Agric. Res.*, 45, 137-138.
- **LE COEUR J., WERY J., TURC O. 1992.** Osmotic adjustment as a mechanism dehydration postponement in chickpea (*Cicer arietinum* L) leaves. *Plant and Soil.*, 144, 177-189.
- **MEYER CH., HIREL B., MOROT-GAUDRIY JF., CABOCHE M. 1993.** L'utilisation de l'azote par les plantes. *Rev La Recherche.*, 257, 24, 956-962.
- **MORGAN JM., RODRIGUEZ B., KNIGHTS EJ. 1993.** Adaptation to water deficit in chickpea breeding lines by osmoregulation : Relationship to grain yields in the field. *Field Crop Res.*, 27, 61-70.
- **NALIN R. 1993.** Effet dépressif du déficit hydrique sur la fixation symbiotique de l'azote chez le pois et le pois chiche. DEA. ENSAM. INRA. 12 p.
- **OBATON M. 1993.** Mise au point sur la technique de mesure de la fixation biologique de l'azote sur les légumineuses cultivées en pot et au champ par l'activité réductrice d'acétylène. Polycope INRA. Montpellier. 28 p.
- **OBATON M. 1993.** Mise au point concernant la technique de mesure "in Situ" de l'activité nitrate réductase de feuilles de légumineuses. Polycope INRA. Montpellier 28 p.
- **OUNANE SM., BACHA F., IREKTI H., 2000.** Effet du stress thermique sur la nutrition azotée chez le pois chiche (*Cicer arietinum*). Annales de l'Institut National Agronomique El-harrach. Volume 21, n° 1 et 2.
- **REES DC., KIM J., GEORGIADIS M. 1993.** Structures and functions of the nitrogenase proteins. In : *New Horizon in Nitrogen Fixation*, Palacios R. et al (eds), Cancun, Mexico, 83-88.
- **ROBIN P., CONEJERO G., TRANCHANT JP., PASSAMA L., SALSAC L. 1983.** Mesures de la réduction du nitrate dans les feuilles intactes. *Physiol Vég.*, 21, 123-128.
- **SALSAC L., DREVON JJ., ZENGBE M., CLEYET-MAREL JC AND OBATON M. 1984.** Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physio. Vég.*, 22, 509-521.
- **SPRENT JI. 1971A.** The effect of water stress on nitrogen fixing root nodules. Effects on physiology of detached soybean nodules. *New Phytologist.*, 70, 9-17.
- **SPRENT JI., 1971 B.** Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil.*, Special Volume., 225-228.
- **TALOUIZTE A., CHAMPIGY ME. 1988.** Response of wheat seedlings to short-term drought stress with particular respect to nitrate utilization. *Plant Cell Environ.*, 11, 149-155.

- **WERY J. 1987.** Influence of drought stress on nitrogen nutrition of legumes. In: Drought Resistance in Plants: Physiological and genetic aspects., 179-202.(L.Monti and E. Porceddu. Eds). CEE. Brussels.
- **WERY J., TURC O., LECOEUR J. 1993.** Mecanisms of resistance to drought, cold and heat in cool season food legumes with emphasis on peas and chickpeas. 271-291. In : Breeding for Stress Tolerance in Cool season Food Legumes. (KB. Singh and MC. Saxena Eds). John Wiley and Sons, Chichester UK.
- **WERY J., SILIM SN., KNIGHT EJ., MALHOTRA RS., COUSIN R. 1994.** Screening techniques and sources of tolerance of extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. Euphytica., 73, 73-83.