

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

Faculté des Sciences et Techniques Fès

Département des Sciences de la Vie

MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES

GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDE

**L'implication potentielle du métabolisme azoté
dans la tolérance des racines de la luzerne
(*Medicago sativa L.*) au stress salin**

Présenté par : SAGHIR Karim

Encadré par : Pr. LOUAHLIA Said

Pr. AMRANI JOUTEI Khalid

Soutenu le 25 Juin 2015 devant le jury composé de :

Pr. AMRANI JOUTEI Khalid	FST-Fès	Président
Pr. LOUAHLIA Said	FPDT-Taza	Encadrant
Pr. MIKOU Karima	FST-Fès	Examinatrice
Pr. DERRAZ Khalid	FST-Fès	Examineur

Année Universitaire : 2014/2015

DEDICACE

Je dédie ce rapport :

- *À mes parents qui ont sacrifié des années de leurs vies pour notre éducation et notre réussite.*
- *À mes frères, sœurs et toute la famille avec qui nous avons partagé des moments de joies et de peines.*
- *À tous l'équipe du laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement qui ont m'aider de préparer ce travail.*

Remerciements

*Nous remercions Dieu le tout puissant qui m'a aidé
à faire ce travail.*

*Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes les
personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou
indirectement à la réalisation de ce projet.*

*Je tiens à remercier très particulièrement notre Professeur Mr.
LOUAHLIA Said et Mr. AMRANI Khalid, qui ont suivi de très près
ce travail, ils n'ont épargnés aucun effort pour m'aider à soulever
toutes les difficultés rencontrées.*

*Ses remarques et ses précieux conseils donnés avec une extrême
amabilité, ont été utiles pour mener à bien le présent travail .je les
remercions vivement.*

*J'exprime ma reconnaissance à Madame, Professeur MIKOU
Karima et à Monsieur DERRAZ Khalid, qui ont bien voulu juger ce
modeste travail. Nous leurs exprimons notre sincère gratitude.*

RESUME

Les plantes adaptées à la salinité développent plusieurs mécanismes morphologiques, physiologiques et biochimiques qui leur permettent de résister à ces conditions contraignantes. Ces mécanismes ont été étudiés sur deux variétés de luzerne pérenne (Tafilalet et Moapa). Les graines ont été cultivées dans des pots et irriguées avec l'eau distillée pendant 4 mois avant de transférer les plantes en culture hydroponique qui vont irrigués avec la solution nutritive de Hoagland contiennent 2 mM de NH_4NO_3 - pour les bassins azotés durant 30 jours. Les résultats montrent que l'azote à un effet positif sur le taux de croissance de la biomasse totale de la plante, par contre n'exerce aucun effet sur la biomasse fraîche des racines. Ensuite, les plantes ont été traitées à 200 mM de NaCl pendant 11 jours. Il a été établi que l'application de cette concentration de sel cause un stress aux plantes de luzerne qui s'exprime par la réduction de croissance au niveau des feuilles, des tiges et des racines, et surtout après une stress sévère (11 jours d'application du stress). L'augmentation de la teneur en proline dans les racines est marquée chez les plantes traitées par le sel et surtout dans les plantes azotées. L'accumulation des sucres solubles dans les racines est marquée dans les plantes soumises au stress sévère (EL MEKKAOUI et al., 1994 ; EL MIDAOUI et al., 1999). Les résultats obtenus au terme de cette étude montrent que l'azote à un rôle important dans la tolérance des plantes au stress salin.

Mots clés : *Medicago sativa L.*, stress salin, azote, racine, tolérance.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de signalisation et de réponses de la plante à un stress.

Figure 2 : *Medicago sativa* L., grappes de fleurs violettes et graine spiralée, représentation dans la Flore d'Europe.

Figure 3 : distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde.

Figure 4 : Développement de la partie aérienne de la luzerne ramifiée en nombreuses tiges et du réseau racinaire autour de la racine pivot profonde.

Figure 5 : **A**, Système racinaire dense. **B**, Nodules racinaires (symbiose avec *Rhizobium*).

Figure 6 : Schéma explicatif montrent la répartition des plantes dans les bassins.

Figure 7 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'un stress salin sur la croissance de la luzerne.

Figure 8 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse totale de la plante.

Figure 9 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse racinaire de la plante.

Figure 10 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse des tiges de la plante.

Figure 11 : effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse des feuilles de la plante.

Figure 12 : effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse de rapport (Partie aérienne/Partie racinaire).

Figure 13 : effet de la salinité sur la biomasse totale de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 14 : effet de la salinité sur la biomasse racinaire de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 15 : effet de la salinité sur la biomasse des tiges de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 16 : effet de la salinité sur la biomasse des feuilles de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 17 : effet de la salinité sur la biomasse des rapports PA/PR de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 18 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en MDA après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 19 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en proline après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Figure 20 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en sucres solubles après (A) 5 jours et (B) 11 jours.

Sommaire

Dédicace	
Remerciement	
Résumé	
Liste des figures	
Introduction général	10
Partie 1. Synthèses bibliographiques	12
I. Le stress abiotique chez les plantes	13
1. Qu'est qu'un stress.....	13
2. Effet de la salinité sur les plantes	13
3. Effet de la salinité sur l'anatomie de la feuille	13
4. Classification des plantes selon leur tolérance à la salinité	14
5. Réponse de la croissance aux conditions salines.....	14
6. Coordination des réponses de stress de voies de signalisation	15
II. La luzerne (<i>Medicago sp</i>)	16
1. Caractéristiques botaniques, taxonomie et origine du genre <i>Medicago</i>	16
2. Caractères généraux	17
3. Aires de culture de luzerne.....	18
4. Stade végétatif.....	19
5. Les intérêts de la luzerne.....	20
6. Les principales caractéristiques des légumineuses	21
7. Les légumineuses et la salinité.....	22
Partie 2. Matériel et méthodes	23
I. Matériel végétal	24
II. Dispositif expérimental	24
III. Caractérisation du sol	24
1. Détermination de la teneur en nitrates dans le sol.....	24
2. Détermination de la teneur en ammonium dans le sol.....	25

3.	Détermination de la teneur en sulfates dans le sol	26
4.	Détermination de la teneur en phosphore dans le sol	27
IV.	Le transfert des plantes à la culture hydroponique.....	28
V.	Application du stress.....	30
VI.	Détermination des paramètres biochimiques.....	31
1.	Détermination de la teneur en MDA dans les racines de la luzerne	31
2.	Détermination de la teneur en proline dans les racines de la luzerne	31
3.	Détermination de la teneur en sucres solubles dans les racines de la luzerne..	32
Partie 3.	Résultats et discussion.....	33
I.	Caractérisation du sol	34
1.	Détermination de la teneur en nitrates dans le sol	34
2.	Détermination de la teneur en ammonium dans le sol	34
3.	Détermination de la teneur en sulfates dans le sol	34
4.	Détermination de la teneur en phosphore dans le sol	34
II.	Etude des paramètres morphologiques des plantes	35
1.	Effet de la privation de la plante en azote	35
1.1.	La biomasse totale	35
1.2.	La biomasse racinaire.....	35
1.3.	La biomasse des tiges	36
1.4.	La biomasse des feuilles.....	37
1.5.	La biomasse de rapport PA/PR	38
2.	Effet de la salinité sur la croissance des plantes	39
2.1.	La biomasse totale	39
2.2.	La biomasse racinaire	40
2.3.	La biomasse des tiges	41
2.4.	La biomasse des feuilles	42
2.5.	La biomasse de rapport PA/PR	43
III.	Détermination des paramètres biochimiques.....	44

1. Effet de la salinité sur la teneur de la plante en MDA.....	44
2. Effet de la salinité sur la teneur de la plante en proline	45
3. Effet de la salinité sur la teneur de la plante en sucres solubles.....	46
Conclusion	47
Références bibliographiques	49

Introduction générale

Près de 400 millions d'hectares de terre sont affectés par **la salinisation** (Bot *et al.*, 2000), dont 80% sont d'origine naturelle et 20% d'origine anthropique (FAO et IPTRID, 2006). Il a été rapporté qu'à travers le monde, 3 hectares des terres arables sont perdus chaque minute à cause de la salinité du sol (FAO et IPTRID, 2006), plus particulièrement dans les régions arides et semi arides. Ceci est sans doute aux déficits d'humidité consécutifs à la fois à la forte évaporation de l'eau souterraine (Ashraf et O'Leary, 1996) et à la mauvaise gestion de l'irrigation. En région méditerranéenne, où les zones salées couvrent 16 millions d'hectares (Hamdy, 1999), les plantes sont souvent soumises à un fort ensoleillement et à une faible pluviométrie. Sous ces conditions stressantes, l'irrigation devient obligatoire, mais elle se fait à l'aide d'eaux saumâtres. Par conséquent, la forte demande évaporatoire et la faible infiltration dues aux précipitations entraînent l'accumulation du sel à la surface des sols (Gucci *et al.*, 1997).

Les effets du sel sur les plantes dépendent à la fois de leur stade de développement de l'espèce, du cultivar, du génotype et de la durée de l'exposition aux contraintes salines (Cornillon et Palloix., 1997 ; Munns et Termaat., 1986 ; Munns *et al.*, 1995). Les conditions climatiques et édaphiques, notamment le taux d'évapotranspiration, la capacité de rétention de l'eau et la porosité du sol, sont des facteurs supplémentaires amplifiant et/ou réduisant les effets des stress salins sur la croissance et la survie des plantes. Selon le degré de résistance au sel, trois grandes catégories de plantes ont été définies : (i) les halophytes, espèces spontanées adaptées aux milieux salins, poussant sur des sols halomorphes, (ii) les glycophytes tolérantes, espèces qui peuvent supporter des concentrations élevées en NaCl, atteignant 7 g.L⁻¹, et (iii) les glycophytes sensibles qui ne tolèrent pas plus de 2 à 3 g.L⁻¹ de sel dans l'eau de la rhizosphère.

La luzerne (*Medicago sativa* L.), légumineuse herbacée vivace (Teuber et Bick, 1988 ; Barnes et Sheaffer, 1995) a été introduite en Afrique du Nord à la fois pour sa rusticité au regard de la pauvreté du sol, pour sa capacité d'enracinement et du fait de ses qualités nutritionnelles (richesse en protéines, vitamines et matière azotée digestible, Chaibi, 1995, Mauriès, 1994).

Le travail, présenté dans ce mémoire de master, a été réalisé dans le laboratoire de l'Ecologie fonctionnelle et Environnement. Dans cette étude, nous nous attacherons à suivre

l'impact du stress salin sur la croissance et le développement des plantes de la luzerne à teneurs en azote endogène contrastées.

Partie 1
Synthèses bibliographiques

I. Le stress abiotique chez les plantes

1. Qu'est qu'un stress

Un stress biologique n'est pas facile à définir, mais il implique en règle générale des effets hostiles s'exerçant sur un organisme

2. Effet de la salinité sur les plantes

La salinité du sol ou de l'eau est causée par la présence d'une quantité excessive de sels. Généralement un taux élevé de Na^+ et Cl^- cause le stress salin. Le stress salin a un triple effet : il réduit le potentiel hydrique, cause un déséquilibre ionique ou des perturbations en homéostasie ionique et provoque une toxicité ionique. Cet état hydrique altéré conduit à une croissance réduite et une limitation de la productivité végétale. Depuis que le stress salin implique aussi bien le stress osmotique qu'ionique (Hayashi et Murata, 1998), l'arrêt de la croissance est directement relié à la concentration des sels solubles ou au potentiel osmotique de l'eau du sol (Parida et Das, 2005).

La salinité est un facteur environnemental très important qui limite la croissance et la productivité (Allakhverdiev et al., 2000). Durant le début et le développement de stress salin à l'intérieur de la plante. Tous les processus majeurs tels que : la photosynthèse, la synthèse des protéines, le métabolisme énergétique etc.... sont affectés. La première réponse est la réduction de la vitesse d'extension de la surface foliaire, suivie par l'arrêt de cette extension avec l'intensification du stress (Parida et Das, 2005).

3. Effet de la salinité sur l'anatomie de la feuille

La salinité cause une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme. L'épaisseur du mésophylle, la longueur des cellules palissadiques, le diamètre des cellules palissadiques dans les feuilles de l'haricot, du coton et de l'atriplex (Longstreth et Nobel, 1979). La salinité réduit aussi l'espace intercellulaire dans les feuilles (Parida et Das, 2005). L'épaisseur du mésophylle et de l'épiderme ainsi que l'espace intercellulaire diminuent significativement dans les feuilles traitées avec NaCl de la mangrove *Brugueira parviflora* (Parida et Das, 2005). Le stress salin cause le développement de la vacuolisation et un gonflement partiel du réticulum endoplasmique, le gonflement de la mitochondrie, la vésiculation et la fragmentation du tonoplaste et la dégradation du cytoplasme par le mélange de la matrice cytoplasmique et vacuolaire des feuilles chez la patate douce (*Ipomoea batatas*) (Mitsuya et al., 2000).

4. Classification des plantes selon leur tolérance à la salinité

La résistance d'une plante à la salinité s'exprime par sa capacité à survivre et à produire dans des conditions de stress salin. Cependant, les plantes ne sont pas égales face au stress salin ; suivant leur production de biomasse en présence de sel, quatre grandes tendances ont été discernées :

- Les Halophytes vraies, dont la production de biomasse est stimulée par la présence de sel. Ces plantes présentent des adaptations poussées et sont naturellement favorisées par ces conditions : *Salicornia europaea*, *Suada maritima*.
- Les Halophytes facultatives, montrant une légère augmentation de la biomasse à des teneurs faibles en sel : *Plantago maritima*, *Aster tripolium*.
- Les Non-halophytes résistantes, supportant de faibles concentrations en sel : *Hordeum sp.*
- Les Glycophytes ou Halophobes, sensibles à la présence de sel : *Phaseolus vulgaris L.*, *Glycine max.*

5. Réponse de la croissance aux conditions salines

L'augmentation de la salinité présente des répercussions sur une série de processus biochimiques. En effet, une absorption élevée des sels par la plante tend à réduire, plus précisément, la synthèse protéique. Ce qui résulte en une réduction de la division cellulaire et un élargissement cellulaire plus prolongé. Le taux de croissance des plantes tend à diminuer linéairement au fur et à mesure que la salinité du sol dépasse une valeur spécifique pour chaque culture (Rawlins, 1981). Ce dernier a relié la tolérance de la plante aux sels à plusieurs facteurs :

- La plante (stade phénologique, variété...)
- Le sol (texture, niveau de fertilité, capacité de rétention)
- Conditions climatiques (température, humidité, insolation)
- Pratiques d'irrigation et de lessivage

Une des causes principales qui provoque la réduction du taux de croissance suite un stress salin est la limitation de l'activité photosynthétique due à la fermeture des stomates et par conséquent à l'absorption limitée en CO₂. Pour décrire la réponse de croissance d'une plante exposée à un stress salin, des chercheurs scientifiques ont défini un modèle bi-phasique (Munns et Termaat ,1986 ; Munns, 2005):

- Dominance du stress osmotique : la concentration en sel augmente, et donc le potentiel osmotique de la solution du sol diminue. Dans cette phase, le stress physiologique est causé par l'excès d'ions à l'extérieur de la plante et est similaire à un stress hydrique. Un stress osmotique est provoqué dans un milieu où le potentiel hydrique de l'eau est, au moins, réduit de 0.5 à 1 bar suite à l'accumulation de sels (Levitt, 1980). Lorsqu'il survient, ce stress hyperosmotique entraîne immédiatement une réduction de la pression de turgescence et de façon subséquente de la croissance. Néanmoins, l'essentiel de l'inhibition de la croissance sur l'ensemble de la période d'exposition est régulée par des signaux hormonaux en provenance des racines exposées (Mulholland et al., 2003).
- Dominance du stress ionique : pour résorber la sécheresse physiologique et réaliser un ajustement osmotique, la plante accumule éventuellement les osmolytes en excès (i.e, Na⁺ pour un stress sodique) dans ses tissus. L'effet du stress est alors essentiellement dû aux ions à l'intérieur des tissus lorsqu'ils atteignent des concentrations toxiques pour le métabolisme. La croissance est d'autant plus réduite que la plante est sensible à l'effet spécifique de l'ion en excès dans ses tissus (Levitt, 1980).

6. Coordination des réponses de stress de voies de signalisation

Les réponses cellulaires et moléculaires des plantes aux conditions de stress ont été très étudiées. Les mécanismes par lesquels elles perçoivent les signaux environnementaux et les transmettent à la machinerie cellulaire pour activer des mécanismes de réponses adaptés déterminent chaque jour leur survie. La connaissance de ces réponses, basées sur la transmission (la transduction) de signaux de stress, est très importante afin d'améliorer la réponse des plantes cultivées aux différents stress environnementaux. Ainsi, une voie de transduction d'un signal commence par la perception de ce signal au niveau de la membrane (par un senseur ou non), suivie par la production de seconds messagers et de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress incluant des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques (figure 1).

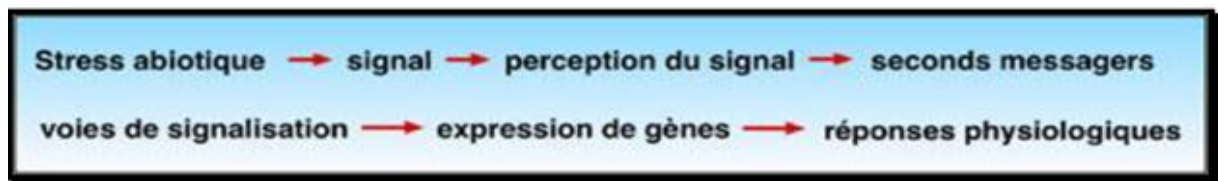


Figure. 1 : Schéma de signalisation et de réponses de la plante à un stress (Hammou, 2010).

L'activation d'effecteurs de réponse au stress est contrôlée par des systèmes régulateurs et des cascades de signalisation, l'analyse de l'expression transcriptionnelle et des interactions protéines/protéines ou protéines/acides nucléiques a révélé l'existence d'un système complexe de facteurs de transcription répondant au stress de façon tardive ou précoce (Hasegawa et al., 2000).

Les réponses précoces nécessitent des composants signalétiques (protéines) qui sont déjà présents dans la cellule et qui sont activés par l'agent stressant et ses senseurs, les gènes induits par ces mécanismes produisent des facteurs qui activent d'autres gènes qui codent pour les effecteurs (les composants de sortie) de l'acclimatation et les réponses plus tardives (Zhu, 2002).

Les contraintes sont détectées par des capteurs constitutifs qui génèrent des signaux activateurs des voies de transduction, les voies de réparation par exemple font intervenir des phospholipases, des protéases, des protéines chaperones ou des enzymes de détoxification des ROS (Reactive oxygen species) (catalase, ascorbate peroxydase...) qui généralement activées grâce à l'intervention de produits comme les lipides peroxydés et les protéines dénaturées issus de dommages physiques occasionnés par le stress (Zhu, 2002).

II. La luzerne (*Medicago sp*)

1. Caractéristiques botaniques, taxonomie et origine du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* appartient à la sous-famille des Faboidées, famille des Fabacées, superfamille des Légumineuses, ordre de Fabales (Papilionacées). Sur la base de la forme des gousses et des graines ce genre comprend sous-genres (Lesins et Lesins, 1979). Il s'agit de *Lupularia*, *Orbicularia*, *Spirocarpos* *Medicago*. Le sous-genre *Medicago* comprend 4 sections dont *Falcato*, elle-même divisée en 4 sous-sections dont *Falcatae*. Sur la base de la couleur des fleurs et la forme des gousses, cette dernière englobe 5 espèces *falcata*, *glomerata*, *glutinosa*, *prostata* et *sativa*. Ces 5 espèces sont pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, ont une corolle jaune, violette, ou jaune et violette. A la base, le genre *Medicago* devait être diploïde,

mais les espèces tétraploïdes, initiées ont été des plantes vigoureuses et hétérozygotes, capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats, accroissant ainsi l'aire de *Medicago* (Quiros et Bauchan, cités par Guinès, 2002). Le nombre chromosomique de base est $x=8$, à l'exception d'espèces annuelle pour lesquelles $n=7$. Trois niveaux de ploïdie existent, les diploïdes avec $2n = 14$ ou 16 , les tétraploïdes $2n= 32$ et les hexaploïdes $2n=48$ (Quiros et Bauchan, 1988) (figure 2, Flore d'Europe).



Figure 2 : *Medicago sativa* L., grappes de fleurs violettes et graine spiralée, représentation dans la Flore d'Europe.

Concernant *Medicago sativa* L., la forme tétraploïde est dénommée *M. sativa ssp sativa* ($2n=4 \times 8=32$) et la forme diploïde *M. sativa ssp coerulea*. La sous-espèce *sativa* (Figure 2) est caractérisée par un port dressé, une racine pivotante qui peut descendre jusqu'à un mètre dans le sol, des fleurs violettes, et des gousses en forme de spirale (Whyte *et al.*, 1953).

2. Caractères généraux

La luzerne est représentée par des plantes vivaces à fortes racines pivotantes ou à tendance fasciculée (luzerne faucille), leurs tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentées au sommet et à inflorescence en grappe de 10 à 20 fleurs. Les fleurs sont violettes, pourpres ou bleuâtres chez la luzerne commune, jaunes chez la luzerne faucille et violettes bigarrées de jaune chez la luzerne intermédiaire. La fécondation est allogame. Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille pour *Medicago falcata*, soit spiralée (de 1 à 4 spires) pour *Medicago sativa*. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 2,5 mm (Camille, 1980).

3. Aires de culture de la luzerne

Medicago sativa est originaire des hauts plateaux iraniens (Prosperi et al., 1995). Soltner (1999) signale l'origine de *Medicago sativa* comme étant méditerranéenne, ce qui confère à cette espèce une adaptation à la sécheresse. *Medicago falcata* est originaire de Serbie occidentale, ce qui explique sa remarquable résistance au froid. Cette double origine géographique et génétique fait que la luzerne soit une des espèces les plus répandues du globe.

La luzerne est l'une des plantes fourragères les plus anciennes sur la planète et c'est aussi celle qui est la plus cultivée à travers le monde (figure 3).

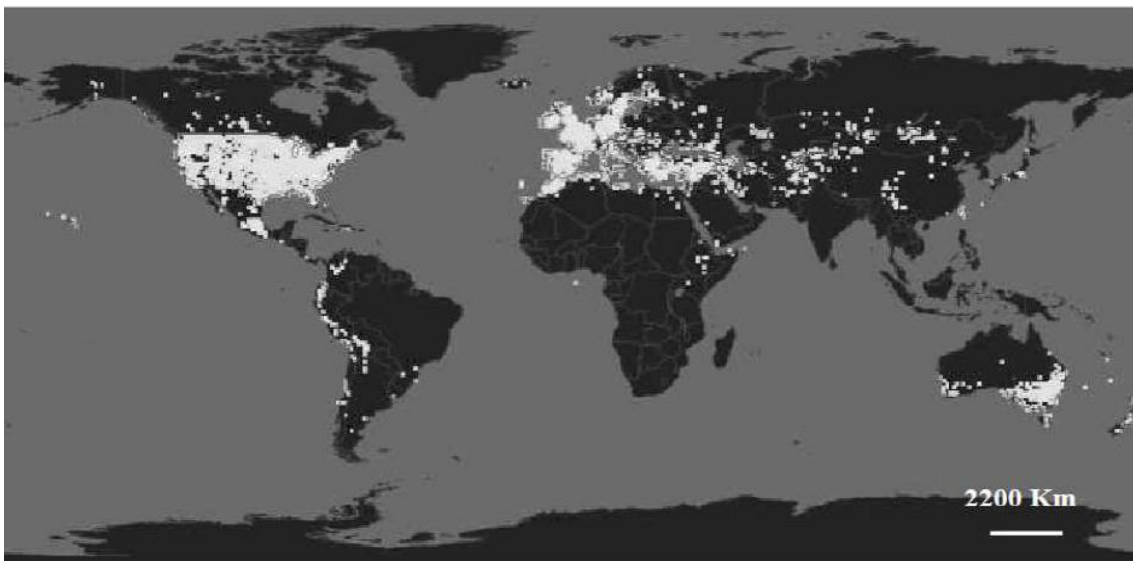


Figure 3 : distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Prolea, 2002).

La luzerne est peu utilisée en pâturage (4%) et en vert (2%) du fait des risques de méthanisation des ruminants. Elle l'est également peu en ensilage (9%). Près de $\frac{3}{4}$ des luzernières sont utilisées en foin (soit 73%). Mais, les tendances vont vers un nouveau mode d'utilisation où la plante est déshydratée. La luzerne déshydratée, reconnue comme une alternative à l'utilisation des farines animales, et comme source fiable des protéines, constitue une alternative (12%) qui a convaincu les éleveurs de bovins. En effet, les luzernes déshydratées sont riches (à plus de 20%) en protéines de qualité en raison du tannage par la chaleur. Elles constituent donc un apport alimentaire de très haute valeur nutritive pour les ruminants. Sans luzerne les vaches ont des problèmes d'acidose dans le rumen, que ce fourrage atténue. Ainsi, selon les agronomes, sa réimplantation permettrait d'améliorer la qualité du lait, le foin et le maïs s'avérant insuffisants. Le problème quant à l'utilisation de la luzerne, notamment lors des récoltes de printemps concerne essentiellement son séchage qui

nécessite de maintenir une température de constante d'au moins 38°C. L'achat de fours pour un séchage forcé, ou seulement une ventilation en période estivale, ou encore le recyclage de la chaleur dégagée par les méthaniseurs dans certaines fermes pour le séchage du fourrage a débuté dans le sud-ouest de la France en 2011. La qualité alimentaire de la luzerne fourragère prend en compte le rapport feuilles/tiges.

Le pied de luzerne, fixé par sa racine principale profonde, entourée d'un réseau racinaire dense, porte une tige principale et de nombreuses tiges secondaires (Figure 4).

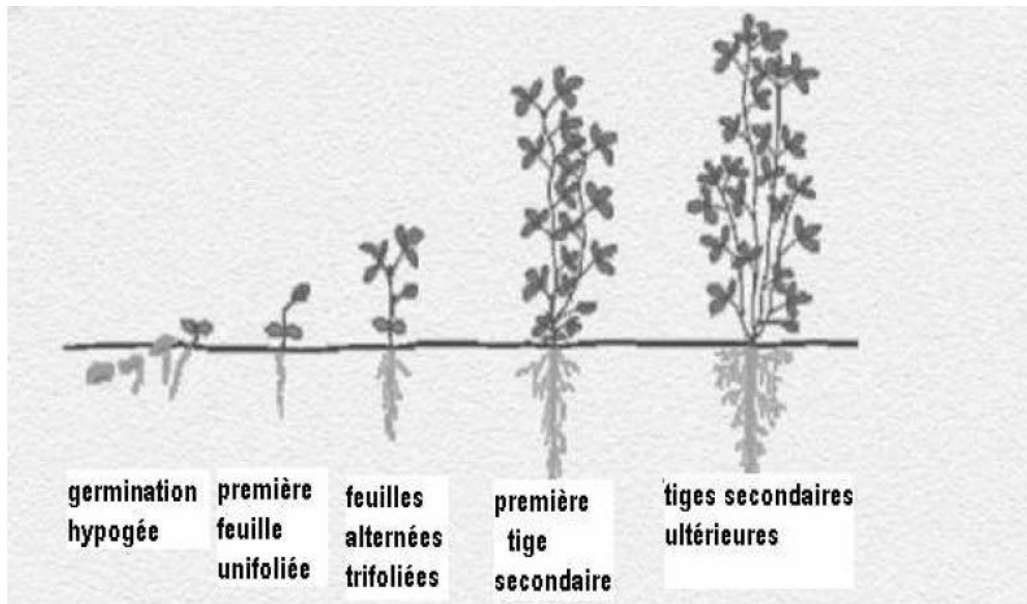


Figure 4 : Développement de la partie aérienne de la luzerne ramifiée en nombreuses tiges et du réseau racinaire autour de la racine pivot profonde.

4. Stade végétatif

Au cours de son développement, la plante passe par différents stades végétatifs :

S1 : cotylédons : à la levée vont d'abord émerger 2 cotylédons

S2 : émission des premières feuilles cotylédonaires ou unifoliées

S3 : feuilles trifoliées : les feuilles suivantes sont composées de 3 folioles rattachées la tige par un pétiole.

Au cours de son développement, la première tige grandit en produisant des feuilles alternées. Les feuilles sont en général de type trifolié mais il existe des variétés dites multifoliées à 4, 5, 6 voire 7 folioles portées sur un pétiole. Des feuilles portant jusqu'à 11 folioles ont déjà été observées.

S4 : émission de bourgeons formateurs de tiges

S5 : croissance des bourgeons en tiges feuillées : le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe pour donner une tige secondaire.

Deux autres tiges secondaires démarrent la suite depuis le niveau des cotylédons . les luzerne de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que les types dormants dont la croissance est stoppée en hiver. C'est cet ensemble de tiges qui va former le collet. Le développement des tiges suit un ordre bien précis. On distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaires.

S6 : élongation des entre nœuds avec croissance de plus en plus rapide. Apparition des boutons floraux : stade bourgeonnement. Les fleurs apparaissent entre le 6ème et le 14ème entre nœud en fonction des conditions du milieu et de leur déterminisme génétique.

S7 : floraison, fécondation, maturité de graines : l'accroissement en matière sèche se poursuit suivant une courbe en S, jusqu'à la pleine floraison. Dès l'apparition des boutons floraux, l'élongation est très ralentie. Parallèlement, la proportion de matière sèche s'accroît dans la plante entière, mais celle des feuilles (riches en protéines) diminue.

5. Les intérêts de la luzerne

- Intérêts nutritionnels

Son utilisation courante dans l'alimentation du bétail lui a valu les noms vernaculaires de : herbe à vaches, herbe à bisons, herbe à lapins. Mais, son utilisation dans l'alimentation humaine vaut la peine d'être mentionnée. En effet, elle est riche en acides aminés, en sels minéraux et en oligo-éléments. Ainsi, au Nicaragua une association déployant son activité sur l'alimentation des populations défavorisées a privilégié l'utilisation de cette plante en complément alimentaire pour lutter contre la malnutrition. Dans les pays « développés » la luzerne présente un intérêt supplémentaire qui est d'être riche en Ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco). Or cette enzyme, qui permet la fixation du CO₂ et son oxygénation, est riche en acides aminés essentiels et sa composition se rapproche de celle des protéines laitières, d'où son potentiel pour l'alimentation humaine si des techniques innovantes permettent un jour d'extraire facilement cette enzyme.

- Intérêts pharmaceutiques

Utilisée depuis longtemps en herboristerie pour lutter contre les rhumes, les abcès, les troubles digestifs, elle possède des propriétés reminéralisantes, anti-infectieuses, désintoxicantes. Elle agirait comme élément protecteur contre le diabète et le cholestérol. Certaines de ces propriétés ont été démontrées in vivo chez les rongeurs : elle renforce l'immunité (Gawel, 2012), aurait des propriétés hypolipidimiques (Yu, 2010), anxiolytiques ((Bora et Sharma, 2011), antidiabétiques (Gray et Flatt, 1997), antioxydantes (Al-Dosari, 2012), oestrogeniques like (Bora et Sharma, 2011). Certains même voient ainsi la luzerne comme nouvelle usine à médicaments....

- Intérêts industriel et biotechnologiques

Concernant l'utilisation de plantes génétiquement modifiées, destinées à la recherche en laboratoire, la luzerne a une place privilégiée puisqu'il s'agit d'un modèle de choix dans l'obtention de molécules précises (domaine de la moléculaire). Industrie : La rubisco peut être favorablement utilisée dans la fabrication de cosmétiques, mais aussi de détergents. *Medicago sativa* est l'une des cultures lignocellulosiques sous études pour la production d'énergie renouvelable tel que le bioéthanol (Godin et al., 2010). La luzerne pérenne appelée aussi Alfalfa présente un potentiel élevé pour la production de bioéthanol en particulier pour son faible lien avec la fertilisation azotée et surtout sa grande diversité génétique par les enzymes impliquées dans la libération du glucose (Duceppe et al., 2012).

- Intérêt environnemental

La luzerne améliore la qualité des sols car elle absorbe les nitrates, donc protège les nappes aquifères par son système racinaire dense. De plus, par la symbiose bactérienne établie dans les nodules racinaires (Figure 5). La luzerne enrichit les sols en composés azotés permettant une rotation des cultures sans apport d'engrais.

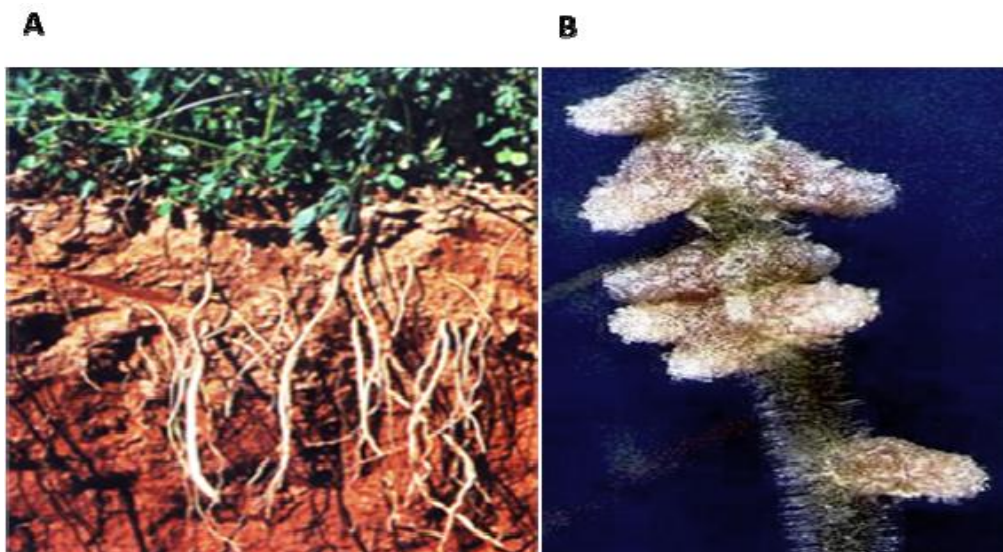


Figure 5 : **A**, Système racinaire dense. **B**, Nodules racinaires (symbiose avec *Rhizobium*).

6. Les principales caractéristiques des légumineuses

- Source d'azote : c'est leur aptitude à entrer en symbiose avec les microorganismes du sol (*rhizobium* et *agrobacterium*) et donc de fixer l'azote, ce dernier est l'un des éléments majeur de la vie et le principal composant de l'atmosphère terrestre et le quatrième constituant des plantes. Il est utilisé pour l'élaboration des molécules les plus importantes comme les protéines, la chlorophylle et les acides nucléiques.

- Source de protéine : dans l'alimentation humaine, les légumineuses et les céréales constituent deux sources de protéines complémentaires. En effet les protéines provenant des céréales sont déficientes en lysine, et les légumineuses à graines sont déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang et al., 2003). C'est pour cette raison que dans la majorité des centres de domestication, les légumineuses et les céréales ont été associées (Gepts, 2004).
- Source d'huile végétale : les Arachides, constituées de 48% d'huile, présentant la plus grande source d'huile végétale des légumineuses
- Source de bois de qualité : on peut citer le bois de rose et l'ébène comme principale source de bois de qualité de ces groupes d'espèces.

7. Les légumineuses et la salinité

La réponse des légumineuses au sel varie énormément, Zahran (1991) a reporté la variabilité de tolérance au sel des espèces cultivées qui vont de sensibles (ex : haricot, pois chiche et le pois) à modérément tolérantes à la salinité (ex : soja).

L'amélioration de la productivité des légumineuses dans les zones salines nécessite l'installation d'une symbiose tolérante. Cette approche implique une amélioration génétique des deux partenaires de la symbiose. Les rhizobiums ont une gamme de tolérance au sel beaucoup plus élevée que celle de sa plante hôte (Zahran, 2001).

La salinité affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Il s'avère que la FSN (fixation symbiotique de l'azote) est plus affectée par le sel que la croissance des plantes (Rao et al., 2002). Généralement l'activité des nodules est plus touchée par le sel que la nodulation, mais l'étape la plus sensible à la présence du sel est le processus infectieux (Payakapong et al., 1998).

En symbiose, la tolérance de la plante hôte constitue un facteur déterminant de la tolérance au sel (Soussi et al., 1998).

Partie 2
MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétal

Deux variétés de luzerne cultivées pérennes sont étudiées.

- variété **Tafilalet**, d'origine marocaine, taux de germination obtenu 80%.
- variété **Moapa** : disponible sur le marché local. Originaires des USA, elle présente un degré de tolérance au gel faible. Rondia et al (1984) la signalent comme étant une variété qui donne de bons résultats. Taux de germination obtenu 65%.

II. Dispositif expérimental

Cette étude a pour objet de comparer le comportement des deux variétés de *Medicago sativa*, Tafilalet et Moapa, dans les conditions salines. Dans ce cadre, les graines, au nombre de 80 graines, sont stérilisées à l'eau de javel à 1% pendant 3 minutes puis rincées abondamment à l'eau distillée pour éliminer toute trace de chlore. Elles sont ensuite mises à germer dans des boîtes en plastique, entre deux couches de papier filtre. Les boîtes sont mises à l'obscurité dans une étuve réglée à une température de 24°C pendant 7 jours. Elles sont ensuite mises à germer sous serre dans des pots en plastique remplis de sable et de sol à raison de 2 semences par pot avec 3 répétitions pour chaque traitement.

Un arrosage tous les deux jours est opéré à l'eau distillée jusqu'à le transfert des plantes à la culture hydroponique.

III. Caractérisation du sol

1. Détermination de la teneur en nitrate dans le sol

- Extraction des nitrates :

On verse dans un tube conique 5 grammes de terre fraîche homogénéisée et 20 ml de KCL 2M, puis on agite le contenu du tube pendant 20 minutes, et après on filtre la suspension de terre et récupérer le filtrat dans une fiole jaugée de 20 ml, compléter avec de l'eau distillée, puis le filtrat constitue l'extrait de sol à analyser.

- Dosage colorimétrique des nitrates par la méthode de Cataldo et al, 1975 :

La gamme d'étalonnage sera réalisée à partir d'une solution mère contenant 2600 µg/ml de NO₃⁻ (dissoudre 4.239g KNO₃ anhydre dans 1000 ml eau distillée).

La préparation des solutions étalons de la gamme : entre 0 et 60 µg/ml de N soit entre 0 et 265 µg/ml de NO₃⁻.

A: 260 µg/ml

B: 130 µg/ml

C: 65 µg/ml

D: 0 µg/ml

Ces concentrations sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage.

Le développement de la coloration :

	A	B	C	D	Extrait
Volume prise (µl)	100	100	100	100	100
Acide sulfosalicylique 5% (µl)	400	400	400	400	400
Laisser agir pendant 20 minutes à température ambiante					
NaOH 2N (pH 12) (ml)	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5
Agiter au vortex et laisser refroidir à température ambiante					
Lire l'absorbance des solutions à 410 nm					

2. Détermination de la teneur en Ammonium dans le sol

- Extraction de l'ammonium :

On verse dans un tube conique 10 grammes de terre fraîche homogénéisée et 40 ml de KCL 2M, puis on agite le contenu du tube pendant 20 minutes, et après on filtre la suspension de terre et récupérer le filtrat dans une fiole jaugé de 50 ml, compléter avec de l'eau distillée, puis le filtrat constitue l'extrait de sol à analyser.

- Dosage colorimétrique de l'Ammonium par la méthode de Nessler :

La gamme d'étalonnage sera réalisée à partir d'une solution mère contenant 10 µg/ml de N-NH₄⁺ soit 12.16 µg/ml de NH₄⁺.

La préparation d'une solution stock de chlorure d'ammonium : dissoudre 3.818 g de NH₄Cl anhydre dans 1000ml d'eau distillée.

La solution mère standard est préparée par dilution de 10 ml de la solution stock dans 1000 ml d'eau distillée.

On prépare des solutions diluées de N-NH₄⁺ :

A: 10 µg/ml

B: 5 µg/ml

C: 2.5 µg/ml

D: 0 µg/ml

- Le développement de la coloration :

	A	B	C	D	Extrait
Volume prise (µl)	50	50	50	50	50
Réactif de Nessler (ml)	2	2	2	2	2
Agiter et laisser agir pendant 15 minutes à température ambiante					
Lire l'absorbance des solutions à 420 nm					

3. Détermination de la teneur en sulfate dans le sol

- Extraction des sulfates :

On verse dans un flacon de 250 ml 10 grammes de sol fraîche, on ajoute 100 ml d'eau distillée puis on l'agite le contenu quelques minutes et on filtre le liquide dans un erlenmeyer de 100 ml.

- Dosage colorimétrique des sulfates :

La gamme d'étalonnage sera réalisée à partir d'une solution mère (SM) (100 mg/l), faire une série de prélèvements dans les fioles jaugées :

A : 30 µg/ml = 30 ml de SM qsp 100ml avec l'eau distillée

B : 15 µg/ml = 15 ml de SM qsp 100ml avec l'eau distillée

C : 10 µg/ml = 10 ml de SM qsp 100ml avec l'eau distillée

D : 0 µg/ml = 100 ml d'eau distillée

- Le développement de la coloration :

	A	B	C	D	Extrait
Volume prise (ml)	50	50	50	50	50
Solution tampon A (ml)	20	20	20	20	20
Agiter la solution au vortex					
Chlorure de barium (g)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Lire l'absorbance des solutions à 420 nm					

4. Détermination de la teneur en phosphore dans le sol

- Extraction de phosphore :

On verse dans une fiole de 100 ml 2 grammes de sol fraîche, puis on ajoute 20 ml de NaHCO₃ 0.5 N à pH 8.5 et on ajoute environ 0.5 gramme de charbon actif, on agite le contenu quelques minutes, puis on filtre dans une fiole de 20 ml.

- Dosage colorimétrique de phosphore :

A partir de la solution mère (SM) (250 mg/l) de phosphore, préparer dans les fioles jaugées les 3 solutions (solution D = eau distillée)

A : 6 µg/ml = 6 ml de SM qsp 25 ml avec l'eau distillée

B : 4 µg/ml = 4 ml de SM qsp 25 ml avec l'eau distillée

C : 2 µg/ml = 2 ml de SM qsp 25 ml avec l'eau distillée

D : 0 µg/ml = 25 ml d'eau distillée

- Le développement de la coloration :

	A	B	C	D	Extrait
Volume prise (ml)	2	2	2	2	2
Solution sulfo-molybdique (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Agiter la solution au vortex					
Eau distillée (ml)	2	2	2	2	2
Acide ascorbique à 1% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Compléter à 10 ml avec l'eau distillée					
Placer les tubes à essai au bain marie à 80°C pendant 15 min					
Refroidir pendant 30 minutes					
Lire l'absorbance des solutions à 825 nm					

Remarque : Pour calculer la quantité des minéraux présente dans le sol, on utilise la relation suivante :

c

Le résultat obtenu est exprimé en mg/Kg de matière fraîche.

IV. Le transfert des plantes à la culture hydroponique

D'après 4 mois où les plantes sont récoltés dans les pots, l'essai a été conduit dans des bassins remplie par 8.5 l de l'eau, sous serre semi contrôlée, au département de biologie de faculté des sciences et techniques de Fès.

Nous avons réalisé trois bassins, 2 parmi elles sont traité par l'azote sous forme de NH_4NO_3 - (Nitrate d'ammonium) (Schéma ci-dessous).

Un arrosage tous les trois jours est opéré à la solution nutritive de Hoagland (1938) contenant 2 mM de NH_4NO_3 - dans les bassins azotés et 0.2 mM dans le bassin non azoté durant 30 jours jusqu'à l'application du stress

	stock	Prise (8.5 L)	Solution stock
KH₂PO₄	1M	4.25 ml	68.04g/500 ml
MgSO₄ (7 H₂O)	0.5M	4.25 ml	61.61g/500 ml
CaCl₂ (2H₂O)	2M	4.25 ml	73.6g/250 ml
K₂SO₄	0.5M	4.25 ml	43.51g/500 ml
H₃BO₃	4 mM	4.25 ml	247.36mg/1 L
Fe-Na EDTA	20 mM	4.25 ml	1.84g/250 ml
ZnSO₄ (7H₂O)	1 mM	4.25 ml	287.56mg/1 L
CuSO₄ (5H₂O)	1 mM	1.7 ml	250mg/1 L
MnSO₄ (H₂O)	2 mM	4.25 ml	338.04mg/1 L
COCl₂	1 mM	0.85 ml	237.93mg/1 L
Na₂MoO₂ (2H₂O)	1 mM	0.85 ml	121mg/500 ml

Tableau 1 : constitution de la solution nutritive de Hoagland (1938) contenant 2 mM de NH₄NO₃- pour les bassins azotés et 0.2 mM pour les bassins non azotés.

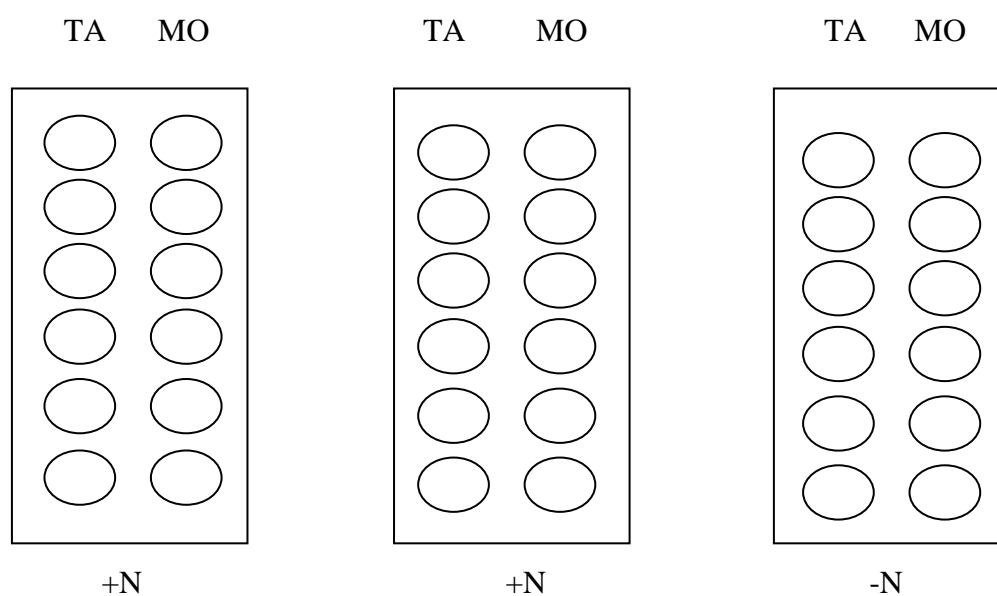


Figure 6 : Schéma explicatif montrant la répartition des plantes dans les bassins tel que chaque bassins contient une série de 6 plantes de variété Tafilalet et une autre série de 6 plantes de variété Moapa, +N : présence d'azote, -N : absence d'azote

V. Application du stress

Le stress salin est appliqué au 30^{ème} jour après le transfert des plantes en culture hydroponique, répartie en trois traitements (A, B et C), 3 répétitions ont été réalisées pour chaque traitement :

A : plantes « témoins » arrosées par une solution nutritive contenant 2mM de NH_4NO_3 .

B : plantes arrosées par le même solution nutritive contenant 0. 2 mM de NH_4NO_3 - additionnée par 200 mM de NaCl (11.7g/L)

C : plantes arrosées par la même solution nutritive contenant 2 mM de NH_4NO_3 - additionnée par 200 mM de NaCl (11.7g/L)

A chaque date de récolte, les plantes ont été récoltées en raison de trois répétitions pour chacun des traitements :

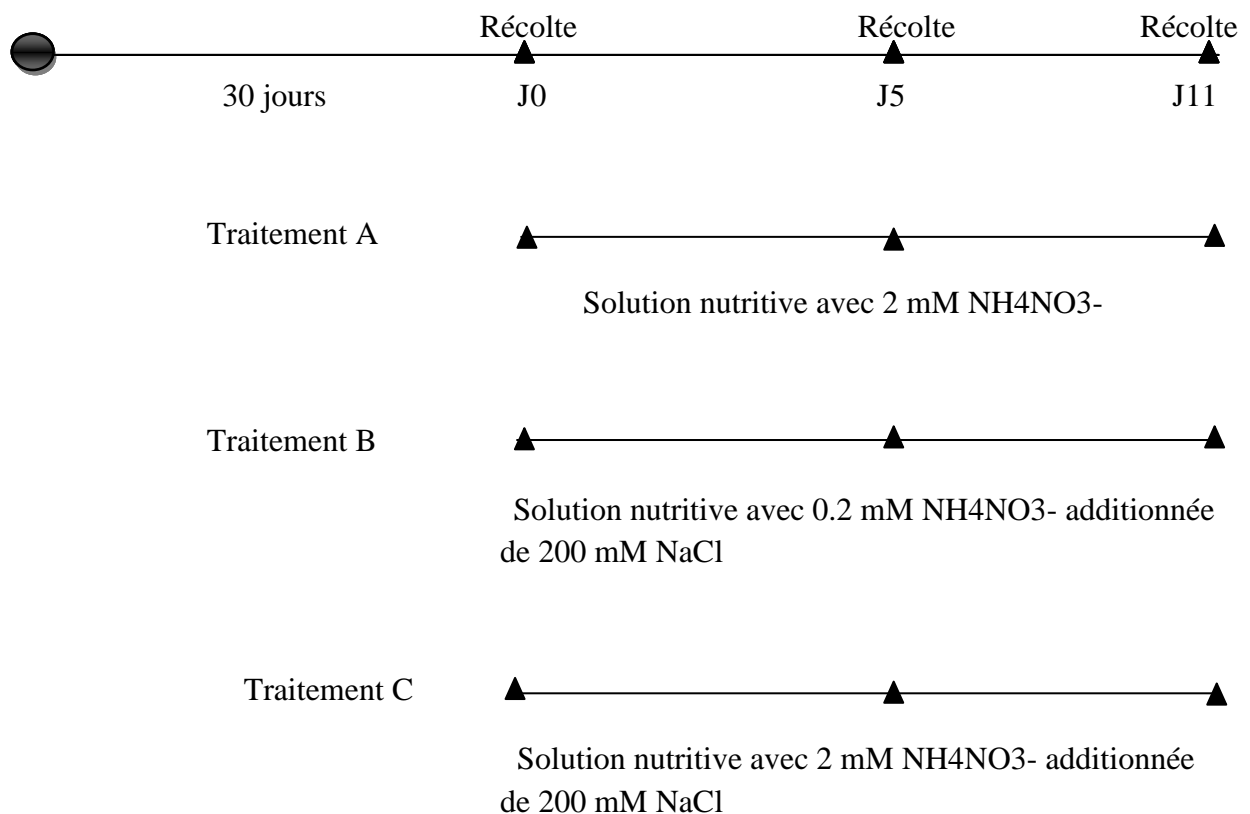


Figure 7 : Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'un stress salin sur la croissance de la luzerne.

VI. Détermination des paramètres biochimiques

1. Détermination de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) dans les racines de la luzerne :

- Extraction du MDA :

200 mg de la matière fraîche des racines sont broyées avec le mortier, un volume de 5 ml de thiochloroacétique 0.5% (TCA 0.5%), puis on place les tubes en centrifugeuse (5000 tour par minutes pendant 15 minutes)

- Dosage du MDA

Après une centrifugation, on récupère 1 ml de surnageant puis on ajoute 3 ml d'acide thiobarbiturique 0.5 % (TBA 0.5 %), les tubes sont placés au bain marie bouillon pendant 30 minutes et après on lire l'absorbance sur 532 et 600 nm.

On calcule la concentration de l'échantillon par la relation suivante :

$$\text{Abs} = \epsilon * c * L$$

Abs : Absorbance

ϵ : Coefficient d'extinction

C : concentration de l'échantillon

L : largeur de la cuve (1 cm)

2. Détermination de la teneur en Proline dans les racines de la luzerne :

- Extraction de proline :

200 mg de la matière fraîche des racines sont broyées avec le mortier, un volume de 5 ml de l'acide sulfosalicylique 3%, puis on place les tubes en centrifugeuse (5000 tour par minutes pendant 10 minutes).

- Dosage de proline :

Après une centrifugation, on récupère 2 ml de surnageant puis on ajoute 2 ml d'acide acétique glacial et 2 ml de réactif ninhydrine, les tubes sont placés au bain marie bouillon pendant une heure de temps et après la lecture de l'absorbance sur 546 nm.

3. Détermination de la teneur en Sucres solubles dans les racines de la luzerne :

- Extraction des sucres solubles :

200 mg de la matière fraîche des racines sont broyées avec le mortier, un volume de 5 ml de l'éthanol 95 %, puis on place les tubes en centrifugeuse (4000 tour par minutes pendant 10 minutes), puis on récupère le surnageant et on ajoute un autre 5 ml d'éthanol 95 sur le culot, puis on mélange le contenu pour placé les tubes un autre fois en centrifugeuse (4000 tour par minutes pendant 10 minutes), puis on récupère l'extrait.

- Dosage des sucres solubles :

Après une deuxième centrifugation, on récupère 0.1 ml de surnageant puis on ajoute 3 ml de solution Anthrone , les tubes sont placés au bain marie bouillon pendant 10 minutes et après on lire l'absorbance sur 625 nm.

Partie 3

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractérisation du sol

1. Détermination de la teneur en nitrate dans le sol

La concentration obtenue des nitrates de sol après une lecture de la densité optique de l'extrait à donner une valeur de 5,385 µg/ml. Alors on peut calculer la quantité des nitrates par la relation suivante : *(Concentration de l'extrait * volume de l'extraction) / (Quantité de matière fraîche)*.

Application numérique : $(5.385 * 25) / 10 = 13.46$

Donc, la quantité des nitrates présente dans un Kg de sol est **13.46** mg.

2. Détermination de la teneur en Ammonium dans le sol

La concentration obtenue de l'ammonium de sol après une lecture de la densité optique de l'extrait à donner une valeur de 0.091 µg/ml.

Application numérique : $(0.092 * 50) / 10 = 0.46$

Donc, la quantité de l'ammonium présente dans un Kg de sol est **0.46** mg.

3. Détermination de la teneur en sulfate dans le sol

- ✓ La concentration obtenue des sulfates solubles de sol après une lecture de la densité optique de l'extrait à donner une valeur de 0.243 µg/ml.

Application numérique : $(0.243 * 50) / 10 = 1.215$

Donc, la quantité des sulfates solubles présente dans un Kg de sol est **1.215** mg.

- ✓ La concentration obtenue des sulfates adsorbés de sol après une lecture de la densité optique de l'extrait à donner une valeur de 0.285 µg/ml.

Application numérique : $(0.285 * 50) / 10 = 1.425$

Donc, la quantité des sulfates solubles présente dans un Kg de sol est **1.425** mg.

4. Détermination de la teneur en phosphore dans le sol

La concentration obtenue des phosphores de sol après une lecture de la densité optique de l'extrait à donner une valeur de 0,621 µg/ml.

Application numérique : $(0.621*25)/10 = 1.55$

Donc, la quantité des phosphores présente dans un Kg de sol est **1.55** mg.

Alors, d'après les résultats précédentes, on constate que les nitrates sont les minéraux les plus riches présentent dans le sol.

II. Etude des paramètres morphologiques de la luzerne

1. Effet de la privation de la plante en azote

1.1 La biomasse totale

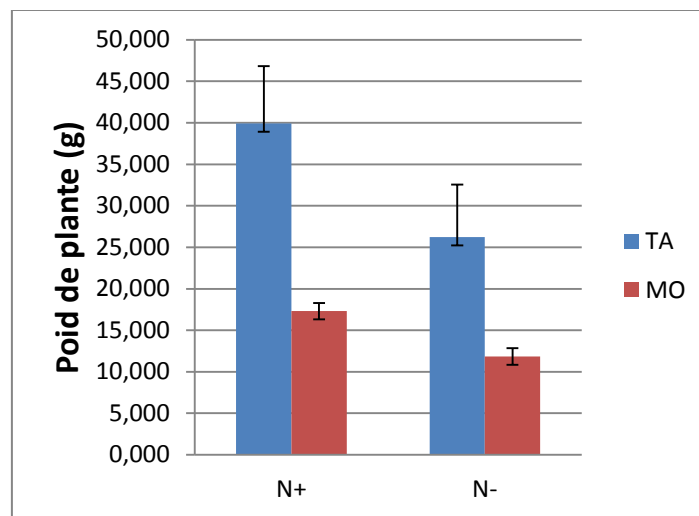


Figure 8 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse totale de la plante. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 8 montre que la production de la matière fraîche de la variété Moapa est plus faible par rapport à la variété Tafilalet soit en présence ou en absence de l'azote exogène. La figure montre aussi que les plantes traitées par le nitrate d'ammonium ont une croissance plus rapide que les plantes privé en azote, ce qui nous à donne une idée générale sur l'effet additif de l'azote sur les deux variétés de la luzerne (Tafilalet et Moapa).

1.2 La biomasse racinaire

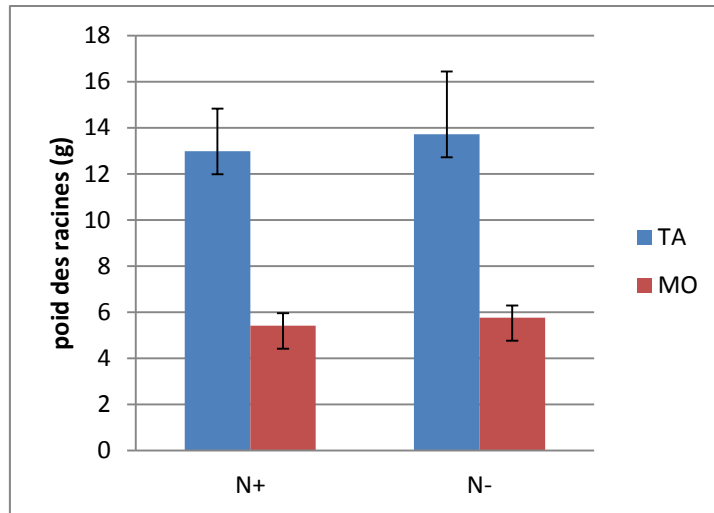


Figure 9 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse racinaire de la plante. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

L'analyse de résultats consignés sur la figure 9 montre que les racines de la variété Tafilalet à un taux de production de matière fraîche plus grand que la variété Moapa soit en présence ou absence de l'azote, selon la figure, on constate que l'apport en nitrate d'ammonium n'a pas d'effet sur la croissance des racines de la luzerne, ce qui montre que les racines n'accumulent pas d'azote en grande quantité par rapport aux autres organes végétales.

1.3 La biomasse des tiges

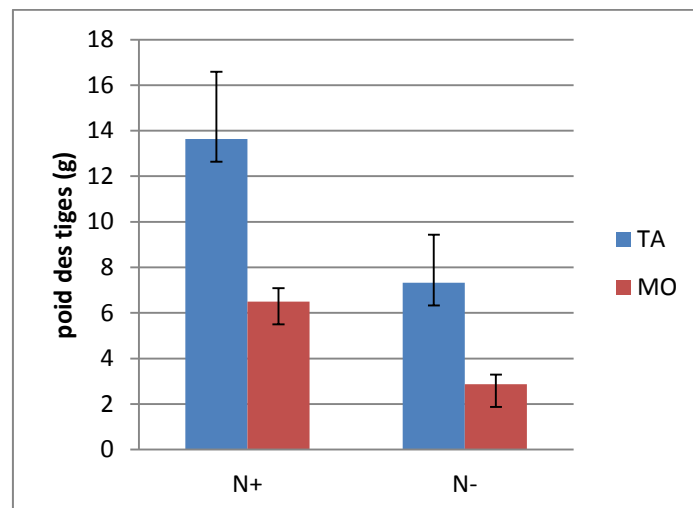


Figure 10 : Effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse des tiges de la plante. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 10 révèle une réduction remarquable de la biomasse de la tige chez la variété Moapa par rapport à la variété Tafilalet, soit en présence ou en absence de l'azote, selon la figure, on constate que l'apport en nitrate d'ammonium à un effet sur la croissance de la tige, tel que les plantes traité par NH_4NO_3^- ont une croissance des tiges plus importante que les plantes privé en azote, ce qui montre que le nitrate d'ammonium à un rôle efficace dans la production de la matière fraiche des tiges des deux variété de luzerne (Tafilalet et Moapa).

1.4 La biomasse des feuilles

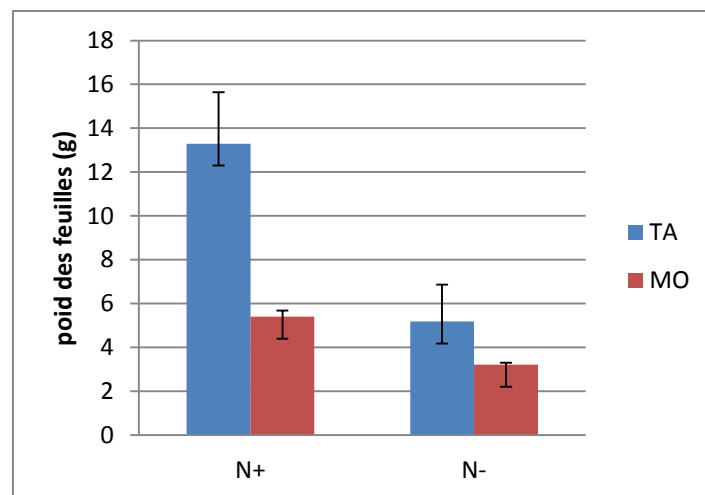


Figure 11 : effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse des feuilles de la plante. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

L'examen de la figure 11 montre qu'il y a une réduction remarquable de la biomasse de la feuille chez la variété Tafilalet par rapport à la variété Moapa, soit en présence ou en absence de l'azote, ce qui montre que l'apport en nitrate d'ammonium à un effet sur la croissance des feuilles, tel que les plantes traitées par NH_4NO_3^- ont une croissance des feuilles plus important que les plantes privées en azote, ce qui montre que le nitrate d'ammonium à un rôle efficace dans la production de la matière fraiche des feuilles des deux variété de luzerne (Tafilalet et Moapa).

1.5 La biomasse de rapport PA/PR

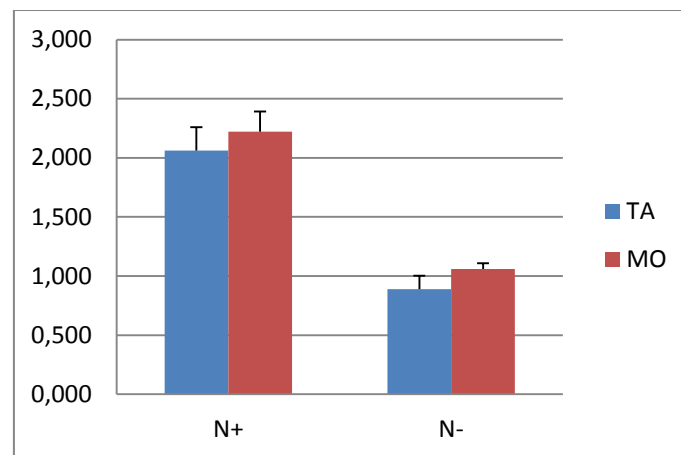


Figure 12 : effet de la privation des deux variétés de luzerne en azote sur la biomasse de rapport (Partie aérienne/Partie racinaire). TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

L'analyse des résultats consignés sur la figure 12 montre que les rapports PA/PR des variétés Moapa et Tafilalet ne sont pas significativement différents. La réduction de l'approvisionnement en azote dans le milieu a provoqué une chute du rapport PA/PR chez les 2 variétés. La biomasse de la partie aérienne représentait le double de la partie racinaire en présence de N 2mM. Par contre après un traitement à 0,2 mM les valeurs de PA et PR sont devenues équivalentes avec un rapport PA/PR proche de 1.

Alors, d'après les résultats précédents, on constate que la variété Tafilalet a un taux de production de matière fraîche plus grand que la variété de Moapa. Concernant l'azote, la partie aérienne (feuilles et tige) est plus adaptée par la présence de nitrate d'ammonium à l'inverse des racines, ce résultat est dû principalement à la translocation des nitrates depuis les racines jusqu'à la partie aérienne via le xylème.

2. Effet de la salinité sur la croissance des plantes

2.1 La biomasse totale

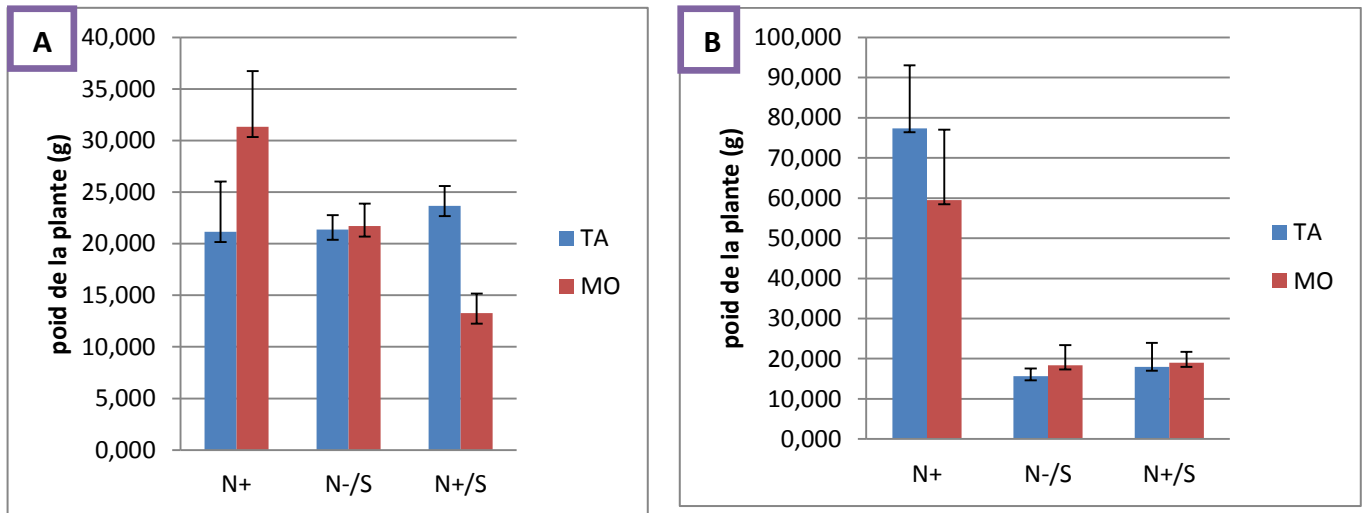


Figure 13 : effet de la salinité sur la biomasse totale de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

L'analyse des résultats consignés sur la figure 13 montre que d'après 5 jours (figure 13A) d'application de stress, la variété Moapa traité par le sel à une réduction remarquable de biomasse totale par rapport au témoin à l'inverse de la variété Tafilalet, le sel n'a aucun effet sur la croissance de biomasse fraîche de cette variété, tel que le nitrate d'ammonium n'a pas de rôle sur la croissance des deux variété.

La figure 13B montre une forte diminution du poids frais de la biomasse totale des deux variétés de luzerne après 11 jours d'application de stress, ainsi les plantes stressés et azotés résistent mieux que les plantes stressés et privés en azote.

Alors, d'après les résultats précédents, la figure 13 montre que la variété Tafilalet résiste mieux que la variété Moapa et principalement en présence d'azote après 5 jours de stress, mais après 11 jours d'application de sels, la variété Moapa à un taux de résistance non significatif par rapport à l'autre variété (Tafilalet) et surtout en présence de nitrate d'ammonium.

2.2 La biomasse racinaire

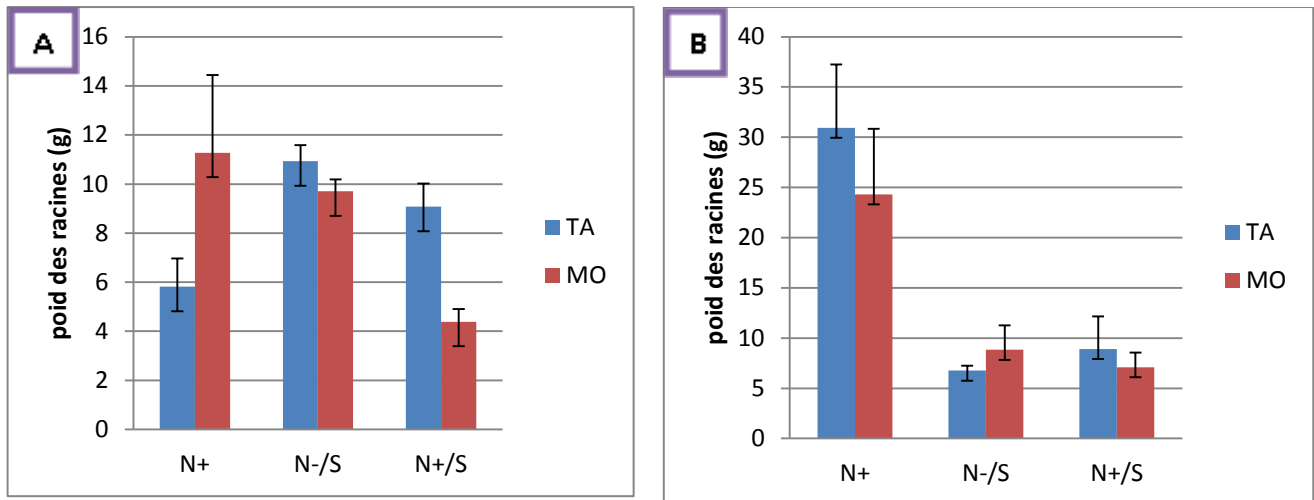


Figure 14 : effet de la salinité sur la biomasse racinaire de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 14A montre qu'après 5 jours d'application de stress, la variété Moapa traitée par le sel présente une réduction remarquable de biomasse racinaire par rapport au témoin à l'inverse de la variété Tafilalet, cette dernière connaît une biomasse racinaire forte dans le cas de stress salin.

D'après les résultats consignés dans la figure 14B, une forte réduction remarquable chez les deux variétés MO et TA après 11 jours de stress, la variété Tafilalet connaît un taux de croissance non significatif lors de stress en présence d'azote.

Donc, le stress affecte négativement le poids frais des racines avec une réponse variable selon la durée du stress induit. Cette caractéristique est en accord avec les résultats obtenus par Simane et al. (1993) et Ali Dib et al. (1994).

2.3 La biomasse des tiges

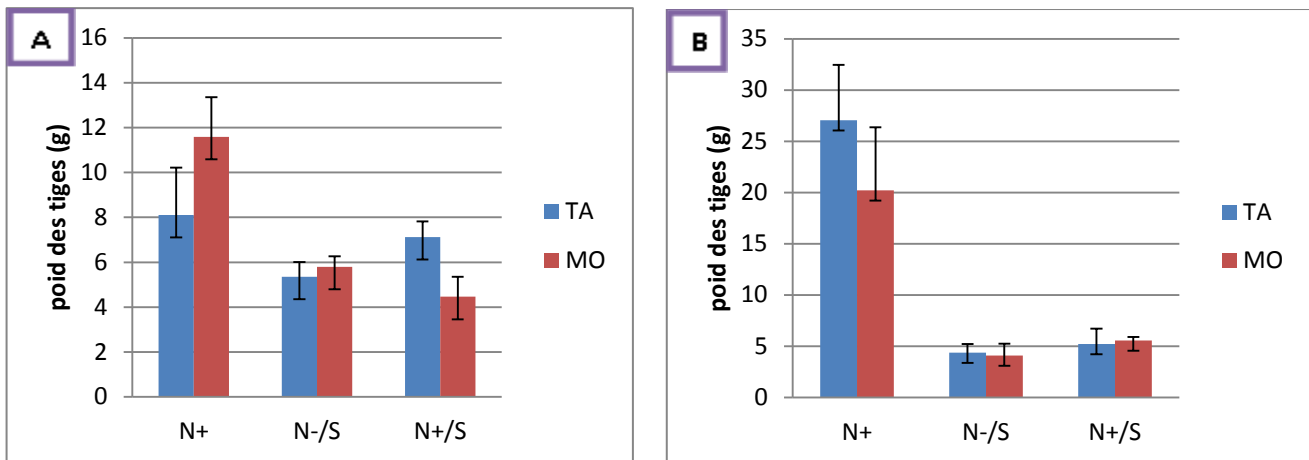


Figure 15 : effet de la salinité sur la biomasse des tiges de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

Concernant les tiges, la figure 15A montre une faible réduction de la biomasse des tiges et surtout la variété Moapa, ainsi, la variété Tafilalet résiste à la présence du sel dans le milieu mieux que la variété Moapa et principalement en présence d'azote.

La figure 15B montre une forte réduction remarquable de la biomasse des tiges des deux variétés, ainsi que ces deux dernières à un taux de croissance mieux en présence d'azote que celles privées en azote.

Donc, le stress affecte négativement le poids frais des tiges avec une réponse variable selon la durée du stress induit. Cette caractéristique est en accord avec les résultats obtenus par Simane et al. (1993) et Ali Dib et al. (1994).

2.4 La biomasse des feuilles

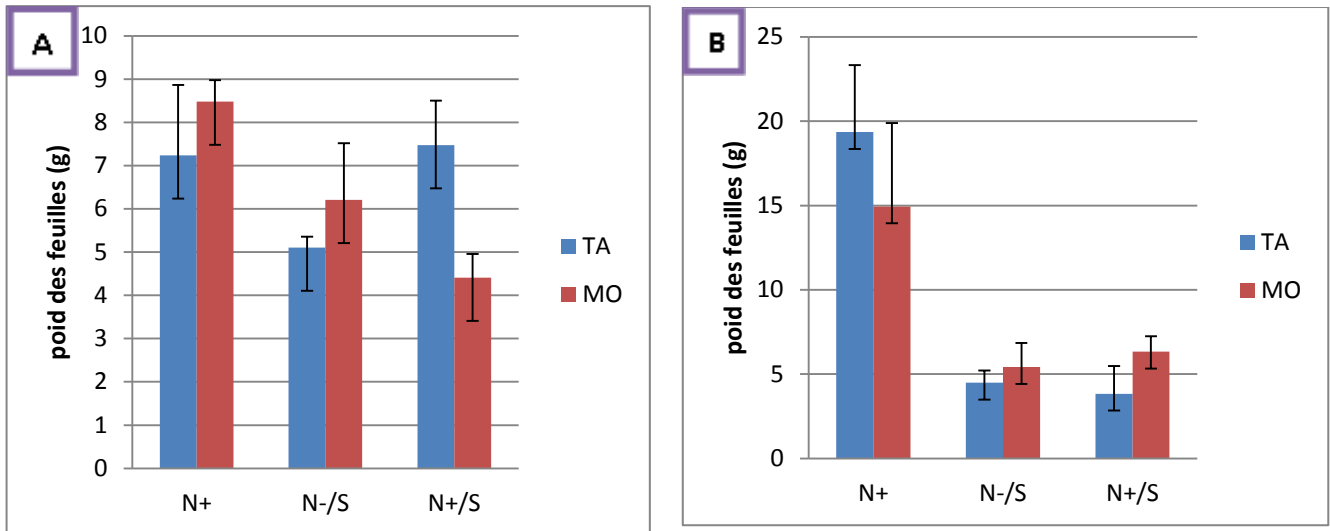


Figure 16 : effet de la salinité sur la biomasse des feuilles de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

D'après la figure 16A, on constate une faible réduction de biomasse des feuilles et surtout la variété Moapa, donc le stress après 5 jours d'application réduit le poids frais des feuilles de cette variété, à l'inverse la variété Tafilalet est moins sensible au sel par rapport au Moapa.

La figure 16B montre une forte réduction remarquable chez les deux variétés MO et TA soumise au stress salin (200 mM), ainsi qu'au niveau des plantes traités, la variété Moapa résiste mieux que la variété Tafilalet et surtout en présence d'azote.

2.5 La biomasse de rapport PA/PR

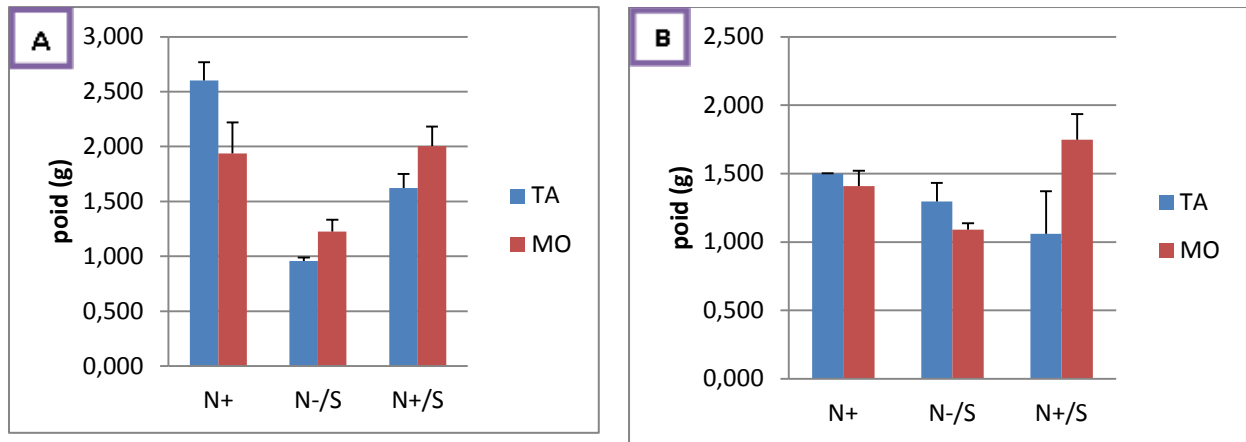


Figure 17 : effet de la salinité sur la biomasse des rapports PA/PR de la plante après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 17B montre qu'il y a une faible réduction de biomasse de rapport PA/PR, tel que les plantes soumises au stress et traitées en azote sont bien adaptées au sel, ce qui prouve l'effet additif de l'azote sur la plante lors du stress.

Les résultats consignés sur la figure 17B montrent une faible réduction de poids frais chez la variété Tafilalet, par contre, la variété Moapa est bien adaptée au sel lorsqu'elle est traitée par l'azote.

Alors, d'après les résultats précédents, on constate que la variété Tafilalet a un taux de croissance forte par rapport au Moapa chez les essais témoins, par contre quand les plantes sont soumises au stress salin, la variété Moapa résiste mieux que la variété Tafilalet dans les parties aériennes, par contre au niveau racinaire, la variété Tafilalet est plus adaptée contre le sel par rapport à la variété Moapa et surtout en présence d'azote, ce qui montre que l'azote a un rôle très important dans la résistance des plantes contre le sel.

Cette réduction de poids frais est due principalement à des perturbations de concentrations des régulateurs de croissance (acide abscissique et cytokinines) comme décrit par Termaat et al. 1985 et Kuiper et al. 1990., mais aussi à une réduction de la capacité

photosynthétique suite à une diminution de la conductance stomatique du CO₂ induite par la contrainte saline (Walker et al.1981 ; Santiago et al., 2000).

III. Détermination des paramètres biochimiques

1. Effet de la salinité sur la teneur du plante en

1.1 Le malondialdéhyde (MDA)

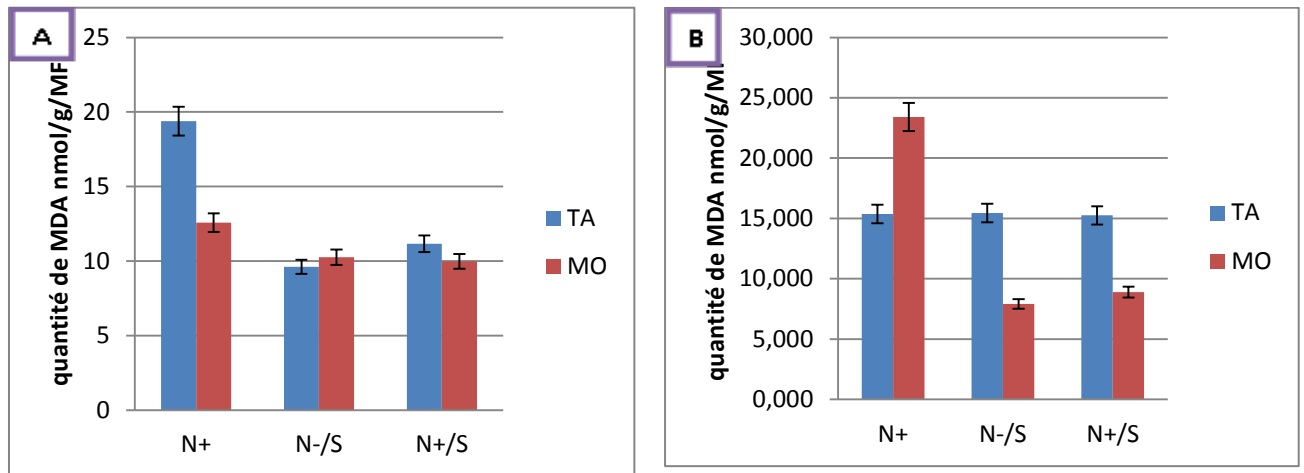


Figure 18 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en MDA après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d’azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d’azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 18A montre une accumulation du MDA au niveau des plantes témoins et surtout la variété Tafilalet par rapport aux plantes stressés soit en absence ou en présence d’azote.

La figure 18B montre une faible accumulation du l’MDA chez les plantes traitées et principalement la variété Moapa, par ailleurs la variété Tafilalet une accumulation similaire entre les plantes soumises à des stress et les témoins.

Alors, les résultats montrent une variabilité d’accumulation de MDA, produit final de la peroxydation lipidique, considéré comme indicateur de stress oxydatifs résultant de plusieurs stress abiotiques (J. A. Hernández, et al., 2000). Cette variabilité s’observe aussi bien chez les plantes témoins que chez les plantes traitées par le sel, ce qui met en relief la variabilité intra spécifique.

1.2 La proline

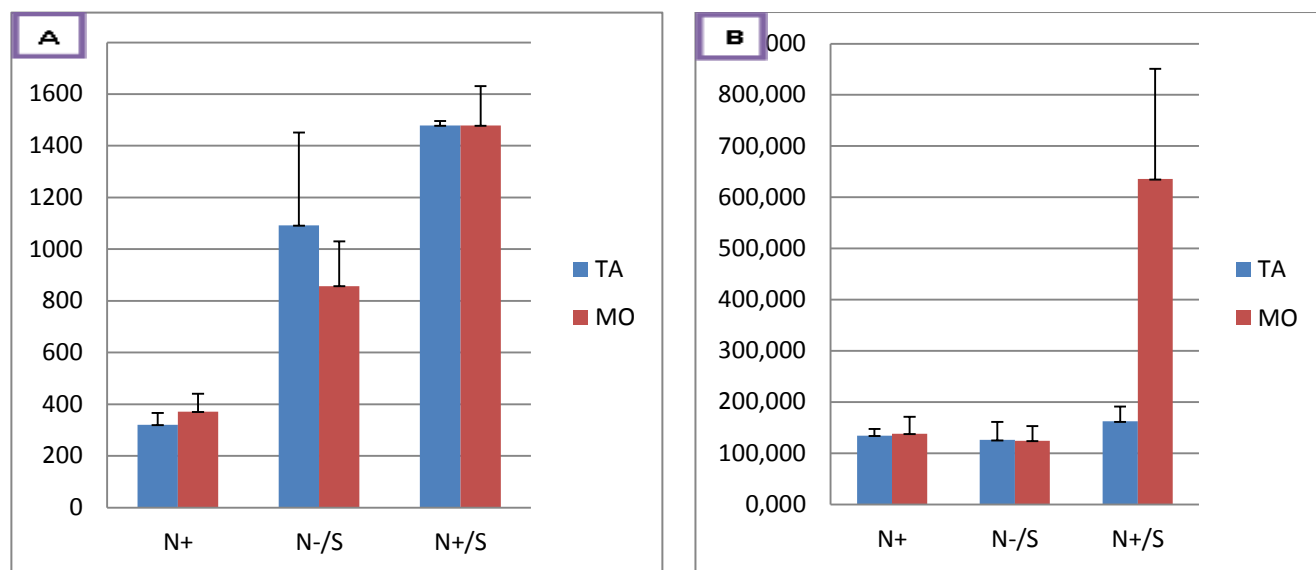


Figure 19 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en proline après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

Les résultats consignés dans la figure 19A montre une accumulation de la proline au niveau des racines des deux variétés de luzerne lors de stress salin (Tafilalet et Moapa) et surtout dans les plantes traitées avec l'azote, ce qui prouve que les plantes deviennent tolérantes au stress salin après 5 jours d'application.

La figure 19B constate une faible accumulation de la proline lors de stress chez la variété Tafilalet, ce qui montre que cette variété devient sensible contre le sel, par contre la variété Moapa à un taux d'accumulation forte de la proline dans les racines traités en azote, ce qui prouve que la variété Moapa résiste mieux dans les conditions de stress salin dure que la variété Tafilalet, donc on peut conclure que l'azote à un rôle très important dans la résistance des plantes de type Moapa contre le sel.

D'après les résultats précédents et en plus de son rôle d'osmoprotecteur, la proline a un rôle dans le renforcement du système antioxydant et de lutte contre les dommages du stress. (Khedr et al., 2003 ; Demiral & Turkan., 2004 ; Ma et al., 2006 ; Molinari et al., 2007). Elle pourrait également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique (Pesci &

Beffagna 1984) ou constituer une réserve d'azote utilisée par la plante après stress (Tal & Rosenthal 1979).

1.3 Les sucres solubles

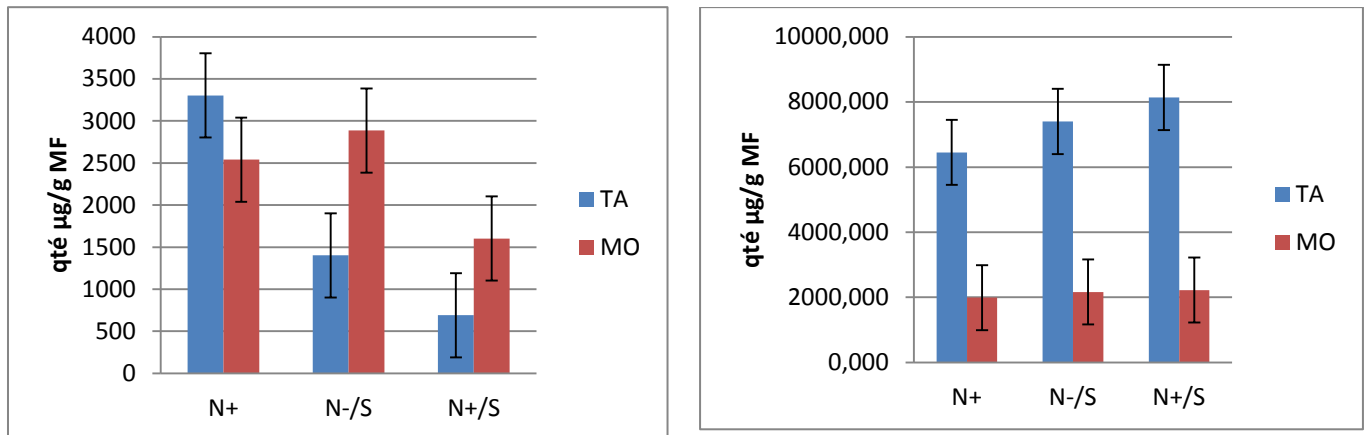


Figure 20 : effet de la salinité sur la teneur de la racine en sucres solubles après (A) 5 jours et (B) 11 jours. TA : Tafilalet, MO : Moapa, N+ : présence d'azote à 2 mM, N- : réduction de la concentration d'azote à 0.2 mM, S : plantes traitées avec 200 mM de NaCl. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE pour n=3.

La figure 20A constate une faible accumulation des sucres solubles chez la variété Tafilalet dans les plantes traitées par rapport aux plantes témoins, par contre la variété Moapa connaît une accumulation des sucres dans les plantes stressées et privées en azote, qui est en accord avec la bibliographie, tel que Talouizte et al., 1984a ont montré que la concentration des sucres solubles des racines augmente par une carence en azote et diminue quand une réalimentation en azote est restaurée.

Dans le cas de stress sévère (figure 20B), on remarque une forte accumulation des sucres chez la variété Tafilalet et principalement dans les plantes traitées lors de stress, la variété Moapa à un taux d'accumulation des sucres solubles mais de degré moins que la variété Tafilalet.

Conclusion

La luzerne (*Medicago sativa L.*) constitue la plante fourragère principale cultivée au Maroc. Elle a un rôle agronomique, économique et participe activement au développement de l'élevage grâce à son adaptation aux conditions salines et de sécheresse de milieu. Les résultats de cette étude expérimentale montrent que des conditions de salinité provoquent des effets néfastes aux différents paramètres morphologiques et biochimiques tel que l'accumulation de la proline et surtout en présence d'azote. Donc d'après cette étude, le comportement de tolérance à la salinité est intimement lié à la vigueur de la variété ainsi qu'à l'aptitude d'accumuler et de stocker des chlorures de sodium au niveau des tissus végétaux. Et l'amélioration de la productivité des luzernes au Maroc doit passer par la sélection d'un matériel génétique adapté.

Alors, d'après les résultats précédentes, on peut conclure que :

- ✓ La variété Tafilalet à un taux de production de matière fraîche plus important que la variété de Moapa.
- ✓ L'azote joue un rôle important dans la croissance et dans la tolérance de la luzerne au sel.
- ✓ La variété Moapa tolère bien le sel que la variété Tafilalet.

Références bibliographiques

- Ali Dib, T., Monneveux, P., Acevedo, E. et Nachit, M.M., 1994.** Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolerance indicators in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Euphytica*, 79 : 65-73.
- Ashraf M., O’Leary JW.- 1996-** Effect of drought stress on growth, water relations and gas exchange of two lines of sunflower differing in degree of salt tolerance. *J. Plant Sci.* 157 6: 729-732p.
- Barnes DK., Sheaffer CC.- 1995** Alfalfa. In : Forages: An Introduction to Grassland Agriculture, 205-216p. Barnes R.F., Miller DA., Nelson CJ., eds. 5th ed. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Bora KS., Sharma A.- 2011** Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biol.* 49: 211-220p.
- Bot A., Nachtergaele F., Youg A.-2000** Land resource potential and constraints at regional and country levels. World Soil Resources Report N 90. **Rome:** FAO of UN.
- Chaibi W.- 1995** Etude physiologique ultrastructurale et cytoenzymatique de l’effet de chlorure de sodium chez *Medicago sativa* L. (cultivar Gabès). Thèse Doctorat, Faculté des Sciences, Tunis.
- Cornillon P., Palloix A.- 1997** Influence of sodium chloride on the growth and mineral nutrition of Pepper cultivars. *J. Plant. Nutr.* 20: 1085-1094p.
- Duceppe MO., Bertrand A., Pattathil S., Miller J., Castonguay Y., Hahn MG., Michaud R., Dubé MP.-2012** Assessment of genetic variability of cell wall degradability for the selection of Alfalfa with improved saccharification efficiency. *BioEnergy Res.* 5(4): 904-914p.
- EL MEKKAOUI M., AGBANI M., MONNEVEUX P. (1994)** : “Rôle de la sélectivité K⁺/Na⁺ et de l’accumulation de proline dans l’adaptation à la salinité de l’orge (*Hordeum vulgare* L.) et du blé dur (*Triticum durum* Desf.)”, Actes Inst. Agron. Vét. (Maroc), 14 (2), 27-36.

EL MIDAOUI M., TALOUIZTE A., BENBELLA M., SERIEYS H., BERVILLE A. (1999) : “Responses of five sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) to different concentrations of sodium chloride”, *Helia*, 22 (30): 125-138.

FAO et IPTRID- 2006 Conférence électronique sur la salinisation: extension de la salinisation et stratégies de prévention et réhabilitation. <http://www.ciseau.org>.

Gawel E.-2012 Chemical compositions of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11: 303–309p.

Gucci R., Aronn G., Lombardini L., Tattini M.- 1997 Salinity tolerance in *Phillyrea* species. *New Phytol.* 135: 227-234 p.

Hamdy A.- 1999 Saline irrigation and management for **substainabel** use. *Advanced short Course on saline Irrigation Proc.* Agadir: 152-227p.

Hammou B., 2010. Recherche de marqueurs génétiques liés à la tolérance à la salinité chez des écotypes d'espèces de *Medicago*. Thèse de Magister. Université d'Oran p100.

Kuiper D, Schuit D, Kuiper JC, 1990. “Actual cytokinin Concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereal”. *Plant Soil*, 123 243-245.

Levitt., 1980: reponses of plants to environnemental stresses: water, radiation, salt and other stresses, Academic press, New York, pp 365-488.

Longstreth DJ et Nobel P.S, 1979: salinity effects on leaf anatomy. Consequence for photosynthesis. *Plant physiol.* Apr 63(4): 700-703.

Mauriès M.- 1994 La luzerne aujourd'hui : Vaches laitières, vaches allaitantes, chèvres, brebis, chevaux. Ed. France agricole, Paris.

Mitsuya S. Takeoka Y. and Miyake H., 2000; affects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas*) plantlets grown under light and dark conditions in vitro. *Journal of plant physiology* 157, 661-667.

Munns R., Termaat A.- 1986 Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160 p.

Munns R., Schatman DP., Condon AG.- 1995 The significance of a two- phase growth reponse to salinity in wheat and barely. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 561-569 p.

Parida A.K. and DAS (AB) 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A. Rev. ecotoxicol. Nviron. Safety, 60:324-349.

Prosperi, J.M; Guy, P; Genier, G, Angervian, M; 1995 "Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon", ed. INRA, Paris.

Quiros CF., Bauchan GR.-1988 The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In : Alfalfa and alfalfa improvement, 93-124p. Hanson AA., Barnes DK., Hill RR. Jr., eds. ASA-CSSA-SSSA WI.

Rawlins, 1981, Water potential :thermocouple psychrometry. In methods of soil analysis. Part 1.

Santiago LS, Lau TS, Melcher PJ, Steele OC, Goldstein G, 2000. "Morphological and physiological responses of Hawaiian Hibiscus tiliaceus populations to light and salinity". Int. J. Plant Sci., 161 99-106.

Simane, B., Struik, P.C., Nachit, M.M. et Peacock, J.M.,1993. Ontogenic analysis of yield stability of durum wheat in water-limited environments. *Euphytica*, 71 : 211-219.

Termaat A, Passioura JB, Munns R, 1985. "Shoot turgor does not limit shoot growth of NaClaffected wheat and barley". Plant Physiol., 77 869-872.

Teuber LR., Brick MA.- 1988 Morphology and anatomy. Pp. 125-162. In: Alfalfa and alfalfa improvement, Hanson AA., Barnes DK., Hill RR. Jr, eds. ASA-CSSA-SSSA, Madison WI.

Walker RR, Torokfalvy E, Scott NS, Kriedemann PE, 1981. "An analysis of photosynthetic response to salt treatment in *Vitis vinifera*". Aust. J. Plant Physiol., 8 (359-374).

Wang J., Zuo K., Wu W., Song J., Sun X., Lin J., Li X., Tang K.- 2003 Molecular cloning and characterization of a new Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Brassica napus*. *DNA Seq.* 14:351p.

Whyte RO., Leissner N., Trumble HC.-1953 Legumes in Agriculture. FAO, Rome.

Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W.- 2010 Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 188.762–773p.

ZHU J.K 2002, salt and drought stress signal transductions in plants. *Plant biol* 53 :247-273.