



UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH

Faculté des Sciences et Techniques Fès



Master Sciences et Techniques : Gestion et Conservation de la Biodiversité

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master Sciences et Techniques

**Contribution à l'étude de l'influence de la disponibilité de l'azote
sur la tolérance au stress abiotique chez *Medicagosativa* L.**

Présenté par :

BENLAKHDAR Manar

Soutenu le 24 juin 2015 devant le jury composé de :

Pr. LOUAHLIA Said	FPT Taza	Président
Pr. El HARCHLI Elhassan	FST Fès	Encadrant
Pr .BENJELLOUN Meriem	FST Fès	Examinatrice
Pr. MIKOU Karima	FST Fès	Examinatrice
Pr .AMRANI JOUTEI Khalid	FST Fès	Examineur
Pr.FATEMizineabidine	INRA Meknès	Examineur

Stage effectué au laboratoire EFE de la Faculté des Sciences et Technique de Fès en collaboration avec le laboratoire des Ressources Naturelles et Environnement de la Faculté Polydisciplinaire de Taza

Année Universitaire : 2015/2016

Remerciements

Avant tout, je remercie le bon Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force, le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail,

J'ai le plaisir d'adresser mes remerciements les plus chaleureux à mon encadrant

***Mr Said LOUAHLIA** pour son aide, sa compréhension, et ses conseils qui m'ont beaucoup enrichi, sa patience avec moi tout au long de l'élaboration de ce stage.*

*Mes sincères remerciements à **Mr Elhassan El HARCHALI** pour ses conseils, ses orientations ainsi que pour ses critiques qui m'ont été d'un apport précieux.*

*Je tiens à assurer mon plus grand respect au chef du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnel et Environnement à la FST de Fès **Mr Lahsen EL GHADRAOUI** qui m'a encouragé d'effectuer ce stage au sein du laboratoire.*

*J'associe à ces remerciements tous les membres du jury à savoir Mme **Meriem BENJELLOUN**, Mme **Karima MIKOU**, Mr **Khalid AMRANI JOUTEI** et Mr **Fatemi ZINE ABIDINE**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce rapport de stage de Master.*

*Je remercie également mes collègues de laboratoire de Fes surtout **Mariame HOUHOU** et **Chaimae RAIS** et **Safae CHENTOUFI** du laboratoire RNE de Taza pour leurs aides et leur sympathie. Vraiment j'ai passé des moments inoubliables avec vous je vous souhaite beaucoup de succès dans vos études.*

Mes vifs remerciements à tous les enseignants qui ont participé dans ma formation, ainsi qu'à tous mes chers amis et collègues de Master promotion 2014 -2015.

Enfin merci à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Résumé

*La luzerne (*Medicago sativa* L) est une des légumineuses fourragères, de la famille des fabacées la plus cultivée dans le monde, originaire des hauts plateaux iraniens, sa diffusion est la conséquence de ses rôles agronomique, écologique, économique et nutritionnel. La culture de la luzerne est principalement soumise à des contraintes de salinité. Ce facteur est un limitant majeur de la production des légumineuses.*

*L'objectif de ce travail consiste à étudier les effets du stress salin en relation avec la teneur en azote endogène, chez deux génotypes de luzerne (*Medicago sativa* L), Tafilalet et Moapa originaire de deux environnements pédoclimatiques différents.*

L'analyse des résultats récoltés a dévoilé une meilleure croissance et production chez la variété Tafilalet dans des conditions de culture optimale. L'application d'un stress salin modéré (200mM/5 jours) a provoqué une diminution des paramètres mesurés (Biomasse sèche, Surface foliaire, Teneur en chlorophylle...) chez les deux variétés de luzerne par rapport aux témoins. En revanche ce traitement a présenté une adaptation importante chez les plantes déficientes en azote. Par contre lors d'un stress salin prolongé (200mM/11 jours) les plantes non déficientes en azote ont manifesté une meilleure adaptation.

Mots-clés : *Luzerne, *Medicago sativa* L., Stress salin, Azote, paramètres morphologiques, Chlorophylle*

Liste Des Abréviations

Cm	Centimètre
DMSO	Dimethyle Sulfoxyde
DO	Densité optique
HCl	Acide chlorhydrique
H2SO4	Acide sulfurique
KCl	Chlorure de potassium
NH₄NO₃	Nitrate d'ammonium
mM	milli molaire
MDA	Malondialdehyde
Min	Minute
MS	Matière sèche
MO	Moapa
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
N₂	azote atmosphérique
TA	Tafilelt
TCA	Trichloacetic
v/v	volume par volume
w/v	poids par volume

Liste Des Figures

Figure 1: Distribution géographique du genre <i>Medicago</i> dans le monde (Source: Prolea. 2002).....	4
Figure 2: Morphologie de la luzerne <i>Medicago sativa</i> L. (Childers. 2008).....	6
Figure 3: A, Système racinaire dense. B, Nodules racinaires (symbiose avec <i>Rhizobium</i>).	7
Figure 4: Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl).	13
Figure 5: Dispositif expérimental des deux variétés de luzerne cultivées sous serre sur substrat sableux.	18
Figure 6: Dispositif expérimental des deux variétés de luzerne cultivées sous serre en hydroponie.	18
Figure 7: Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'un stress salin de 200 mM sur la croissance de la luzerne.	19
Figure 8: Dispositif expérimentale pour le dosage de phosphore.....	22
Figure 9: Dispositif expérimentale pour le dosage de la chlorophylle	24
Figure 10: Dispositif expérimentale pour le dosage de nitrate réductase.3.5 Dosage des protéines solubles:	24
Figure 11: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la production de la biomasse sèche de la plante entière chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO)..	29
Figure 12: Effet d'une déficience nutritive en azote sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles, des tiges, et des racines chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).	30
Figure 13: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la surface foliaire spécifique chez deux variétés de luzerne Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	31
Figure 14: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la teneur en chlorophylle a, chlorophylle b, et chlorophylle totale, chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).	32
Figure 15: Effet d'une déficience nutritive en azote sur l'activité enzymatique de nitrate réductase au niveau des feuilles chez deux variétés de luzerne Tafilalet (TA) et Moapa (MO).	33
Figure 16: Effet d'une déficience en azote sur la teneur en protéines solubles des feuilles des deux génotypes de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	34
Figure 17: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200 mM) sur l'évolution de la biomasse sèche totale chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).	35
Figure 18: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO)..	36

Figure 19: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la surface foliaire spécifique (cm ² /g) chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	38
Figure 20: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en chlorophylle a , chlorophylle b et chlorophylle totale chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	39
Figure 21: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en protéine chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	41
Figure 22: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en proline chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	42
Figure 23: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la MDA chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	43
Figure 24: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	44
Figure 25: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles des tiges et des racines chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	45
Figure 26: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en chlorophylle a, chlorophylle b, et chlorophylle totale de la chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	47
Figure 27: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la surface foliaire spécifique chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	49
Figure 28: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la protéine chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	50
Figure 29: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la proline chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	51
Figure 30: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la MDA chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).....	52

Liste Des Tableaux

Tableau 1: Pourcentage d'augmentation des rendements de blé après quelques légumineuses.....	9
Tableau 2: composition de la solution nutritive utilisée pour la culture de la luzerne.....	19
Tableau 3: Résultats regroupant des analyses physico-chimique effectuées dans le but d'évaluer la qualité du sol destiné à la culture de la luzerne.	28

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I :Revue Bibliographique	
1. Généralités sur la luzerne.....	3
2. Origine géographique et aire de répartition	3
3. Exigences de la culture	4
4. Systématique	5
5. Germination et développement physiologique de la plante	5
6. Description morphologique.....	6
6.1. Racine	7
6.2. Tige	7
6.3. Fleur.....	8
6.4. Fruits.....	8
7. Intérêt et utilisation de la luzerne	8
7.1. Intérêt agronomique	8
7.2. Intérêt écologique de la culture de luzerne	9
7.3. Intérêt économique.....	10
8. Stress abiotique chez les végétaux.....	10
8.1. Problème de la salinité des sols	11
8.2. Effet de la salinité sur les plantes	11
8.3. Les mécanismes touchés par la salinité	12
9. Les stratégies d'adaptation	12
9.1. Homéostasie cellulaire	12
9.2. Séquestration du sodium dans des vacuoles	13
9.3. Prélèvement de K ⁺	14
9.4. Biosynthèse d'osmoprotectants.....	14
9.5. Synthèse de protéines induites par le sel.....	15
9.6. Synthèse d'antioxydants	15
9.7. Régulation de croissance.....	15
Chapitre II :Matériel Et Methodes	
1.Description des dispositifs expérimentaux	17

1.1 Matériel végétal et condition de culture.....	17
2.2 Application des traitements	17
2. Méthodes analytiques utilisées.....	20
2.1. Caractérisation du sol.....	20
2.1.1 Type de sol.....	20
2.1.2. Détermination de la capacité au champ	20
2.1.3. Détermination de la teneur en nitrate NO_3^-	20
2.1.4 Détermination de la teneur en ammonium NH_4^+	21
2.1.5 Détermination du phosphore assimilable du sol	21
2.1.6 Détermination de la teneur de sulfate soluble et adsorber.....	22
3. Description des méthodes.....	22
3.1 Détermination de la biomasse	22
3.2 Détermination de la surface foliaire.....	23
3.3. Dosage de la chlorophylle	23
3.4. Détermination de l'activité de nitrate réductase.....	24
3.5. Dosage des protéines solubles:	25
3.6. Dosage de la proline	25
3.7. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)	25
Chapitre III :Résultats Et Discussions	
1. Caractérisation du sol.....	28
1.1 La capacité au champ	28
2.2 Composition du sol.....	28
2. Effet d'une déficience nutritive en azote	29
2.1. La Biomasse sèche totale de la plante	29
2.2. La biomasse sèche des différentes parties de la plante.....	30
2.3. La surface foliaire spécifique	31
2.4. La teneur en chlorophylle des feuilles.....	32
2.5. L'activité enzymatique du nitrate réductase des feuilles.....	33
2.6. La teneur en protéines solubles des feuilles	34
3. Effet d'un stress salin modéré (200 mM de NaCl pendant 5 jours)	35
3.1. La biomasse sèche de la plantes	35
3.2. La biomasse sèche des différentes parties de la plante.....	36
3.3. La surface foliaire spécifique	38
3.4. La teneur en chlorophylles des feuilles	39

3.5. La teneur en protéines solubles des feuilles	41
3.6. La teneur des en proline des feuilles.....	42
3.7. La teneur en Malondialdéhyde (MDA) des feuilles.....	43
4. Effet d'un stress salin sévère (NaCl à 200 mM pendant 11 jours)	44
4.1 La biomasse sèche de la plante	44
4.2. La biomasse sèche des différentes parties de la plante.....	45
4.3. La teneur en chlorophylle des feuilles.....	47
4.4. La surface foliaire spécifique	49
4.5. La teneur des en protéines solubles des feuilles.....	50
4.6. La teneur en proline des feuilles	51
4.7. La teneur malondialdéhyde (MDA) des feuilles	52
Conclusions Et Perspectives	
Références bibliographiques	55

Introduction générale

La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une des légumineuses fourragères les plus répandues sur tous les continents. Sa superficie de culture est estimée à 32 millions d'hectares en 1999, dont 13 millions en Amérique du Nord (Maurières, 1994). Soumise à des cycles d'exploitation de coupe/repousse, comme les autres légumineuses fourragères, la luzerne est une plante essentiellement récoltée par la fauche. Elle tolère la sécheresse et les hautes températures. De plus, elle est cultivée essentiellement sur des sols non acides et non hydromorphes.

La luzerne possède de nombreux avantages agronomiques (pérennité, rusticité, production estivale, économie d'intrants) et zootechniques (richesse en protéines, richesse en substances minérales). Ces caractéristiques lui confèrent un double intérêt économique et écologique par une réduction de la fertilisation azotée par des engrais de synthèse chimique. En plus, la luzerne est très importante écologiquement, vu qu'elle est responsable pour une partie substantielle de conversion de flux globale de l'azote atmosphérique en forme fixe, tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables. Toutefois les modifications climatiques, les exploitations intensives ainsi que l'apparition de pathogènes résistants aux traitements phytosanitaires classiques entraînent des baisses de productivité, de la qualité et de la pérennité de la luzerne. Ceci se traduit depuis de nombreuses années par un net recul de cette culture dans les systèmes fourragers en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord. En Afrique, la culture de la luzerne est particulièrement limitée par son manque de pérennité et sa production médiocre. En effet, 39 Mha sont des sols salins (soit 2 % des terres arables), dont 34 Mha sont des sols sodiques (FAO, 2008).

Au Maroc, la luzerne occupe la plus vaste superficie de fourrage semé, avec 85000 hectares, soit environ 26 % de la SAU (Superficie Agricole Utile) (DVP/MADR 2006). Dans les zones de Tadla, la vallée de Moulouya, Houz, Souss Massa, et Tafilalet, la luzerne, cultivée en système irrigué, représente la principale source de fourrages. Elle assure la moitié de l'unité fourragère totale de la surface cultivée au Maroc (Birouk et al, 1997 ; Berkat et tazi, 2004).

Cependant, la culture de la luzerne au Maroc subit plusieurs contraintes environnementales dont les stress abiotiques qui limitent considérablement sa production. En effet, la salinisation prend des dimensions alarmantes en réduisant les terres cultivables et en mettant en péril l'équilibre alimentaire (Kinet et al 1998).

La salinisation des sols peut être d'origine naturelle, en affectant 80 % des terres salinisées. Il s'agit de la salinisation primaire. La seconde, dite salinisation secondaire, est d'origine anthropique. Elle est due essentiellement à l'irrigation par des eaux souterraines (IPTRID-FAO, 2006).

Au Maroc, plus de 5 % de la superficie est déjà affecté par la salinisation (Antipolis, 2003) par conséquent, l'amélioration de la tolérance des plantes à la salinité constitue une proposition attractive pour les agriculteurs. De nos jours, la création des variétés de luzerne plus tolérante s'avère une solution intéressante comme remédiation à ce problème.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à suivre les effets du stress salin en relation avec la teneur en azote endogène, chez deux variétés de luzerne (*Medicago sativa* L.). En d'autres termes, la richesse des plantes en azote constituerait-elle un trait adaptatif de la plante au stress salin ? Ces investigations ont été menées sur des géotypes de luzerne : Moapa et Tafilalet originaires de deux environnements pédoclimatiques différents.

Chapitre I :
Revues Biblographiques

1. Généralités sur la luzerne

La luzerne est la plante fourragère la plus répandue dans le monde. Elle jouit d'un regain d'intérêt lié notamment à sa richesse en protéines.

C'est une plante herbacée vivace, allogame à pollinisation entomophile. La luzerne cultivée est le résultat de l'hybridisme deux espèces différentes : la luzerne commune *Medicago sativa* L et la luzerne faucille *Medicago falcata* (MARBLE. 1993).

Les arabes lui donnèrent le nom d'Alfalfa, superlatif d'alfa, et qui signifie, d'après Rupesh (Ram. 2007) et Le François et (Ruby. 2003), « le meilleur fourrage » ou « père de tous les aliments ». Chez nous et depuis toujours, la luzerne a été, considérée comme une plante miracle. Quant à l'appellation luzerne, elle provient de l'ancien français luiserne ou du latin lucerna signifiant flamme ou lumière. Selon (MARBLE. 1993), la Luzerne constitue :

- Une source d'azote pour d'autres cultures d'assolement ;
- Une culture propre à améliorer les sols ;
- Une source complète d'éléments nutritifs pour la production de viande et de lait ;
- Un aliment de hautes qualités pour les chevaux.

2. Origine géographique et air de réparation

Medicago sativa est originaire des hauts plateaux iraniens (Prosperi et al. 1995). (Soltner.1999) a signalé par la suite que 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.

(Prosperi et al.1995) ont rapporté que les aires d'origine de toutes les espèces du genre *Medicago* comme étant « le croissant fertile » recouvrant les pays ou régions actuelles de Turquie, d'Iran, d'Irak, du Sud du Caucase et du pourtour méditerranéen. Ces espèces ont ensuite conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne et les steppes avoisinantes au cours du XIX^{ème} siècle, elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américains et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine. La

luzerne est une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde, son plus grand développement se trouve dans les zones tempérées chaudes : Etats-Unis, Europe, Amérique du Sud, Asie, Japon, Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique du Nord et Argentine (Barnes et *al.*1990); (Mauriès.1994).

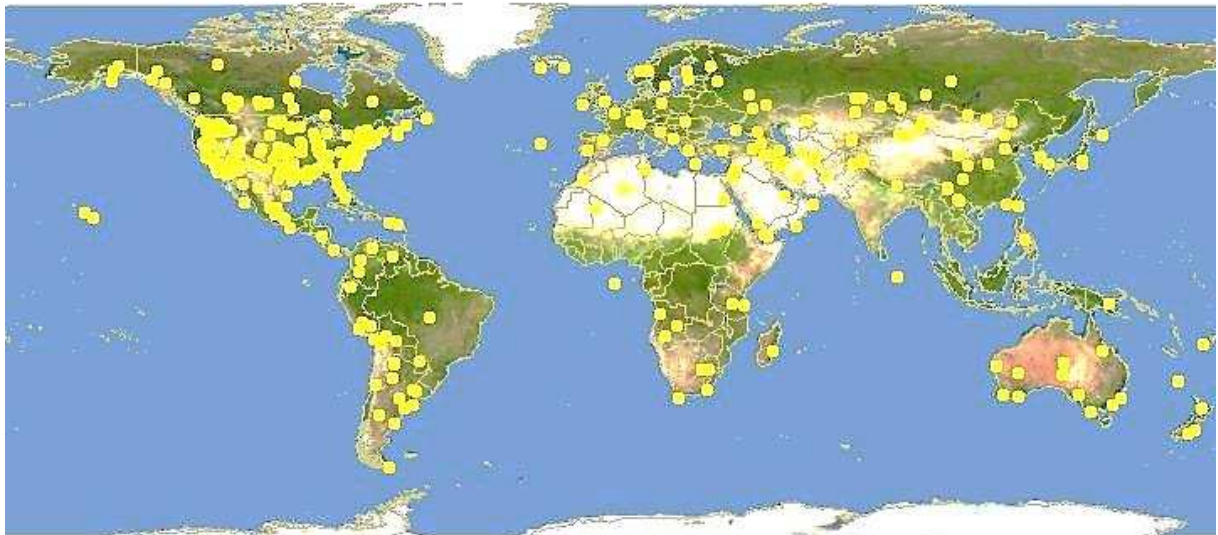


Figure 1 : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Source: Prolea. 2002).

3. Exigences de la culture

La température est le premier facteur limitant l'expansion de la luzerne, selon (Rochat. 2005), la luzerne tolère la chaleur jusqu'à 40°C et jouit d'une bonne résistance au froid. La luzerne ne craint pas la sécheresse et les chaleurs estivales: des quantités non négligeables peuvent être produites pendant la période estivale (Chaabena et *al.* 2004). Alors que les températures très élevées (+ 40 °C) peuvent réduire la croissance, le rendement et la pérennité.

Le froid limite aussi son adaptation à cause de la destruction des plantes pendant l'hiver (Matilieu. 2003) et (Mauris.2003). Selon (Chaabena. 2001), la germination intervient si la température est au minimum de 7°C ; l'optimum étant de 25°C.

La luzerne est très exigeante en eau mais elle peut présenter une résistance à la sécheresse de 2 à 3 mois à cause de leur pivot qui pénètre profondément. Elle exige 12000 à 13000m³/ha/année (I.N.R.A. Maroc. 1965). Elle est calcicole et ne tolère pas les terrains

acides et demande des terrains sablonneux profonds, à sous-sol perméable permettant un bon drainage (I.N.R.A, Maroc. 1965)

4. Systématique

D'après (Quezel et Santa. 1962), l'espèce est classée comme suit :

Embranchement : Spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous- Classe : Dialipétales.

Ordre : Rosales.

Famille : Fabacées.

Sous-famille : Papilionacées.

Tribu: Trifoliées.

Genre: *Medicago*

Espèce: *Medicago sativa* L.

5. Germination et développement physiologique de la plante

Au cours de son développement, la plante passe par différents stades végétatifs : le stade S1 est représenté par l'apparition des deux cotylédons à la levée ; au cours du stade S2 il y a l'émission des deux feuilles cotylédonaires ou unifolié; au stade S3 (stade trifoliées), les feuilles composées de trois folioles, rattachées à la tige par un pétiole apparaissent, et la tige grandit en produisant des feuilles alternées ; puis au stade S4, les bourgeons émis forment des tiges secondaires ; Au stade S5, les bourgeons donnent naissance à des tiges feuillées, alors que le bourgeon axillaire de la première feuille aboutit à une tige secondaire, deux autres tiges secondaire pousse depuis le niveau des cotylédons, les luzernes de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau du cotylédon que les types dormants, dont la croissance est stoppé 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 ; Au stade S6, on observe l'élongation des entrenœuds

avec une croissance de plus en plus rapide, et l'apparition des boutons floraux, au stade bourgeonnement, les fleurs apparaissent entre le 6 et le 14^{ème} entrenœuds, selon les conditions du milieu de culture et le déterminisme génétique ; enfin, le stade S7 est le stade de la floraison, de la fécondation, et de la maturité des 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 (riche en protéines) diminue (Hireche. 2006).

6. Description morphologique

Au niveau morphologique, la plante de luzerne, dont la hauteur varie de 30 à 80cm, se décompose en six parties : le collet, les tiges, les feuilles, les fleurs, les gousses et la racine (figure2).



Figure 2: Morphologie de la luzerne *Medicago sativa* L. (Childers. 2008).

- | | |
|---------------------|---|
| 1: Fleur. | 6: Une inflorescence en stade fructification. |
| 2: Fleur épanouie. | 7 : Une gousse. |
| 3: Fleur ouverte. | 8 : Une graine. |
| 4 et 5 : Un pétale. | 9 : Coupe longitudinale d'une graine |

6.1. Racine

Le système racinaire se caractérise par une racine pivotante centrale très puissante capable d'aller puiser l'eau et les éléments nutritifs très profondément dans le sol, et des racines secondaires plus ou moins ramifiées qui peuvent aller rechercher l'humidité à des profondeurs de 2 à 3 m ; ces racines portent des nodosités (Nedjai. 1973) où a lieu la symbiose fixatrice d'azote avec le *Rhizobium meliloti* (Figure 2), (Rochat. 2005 ; Soltner. 1988 ; Gunter et Bounedjmat. 1997). (Figure 3)

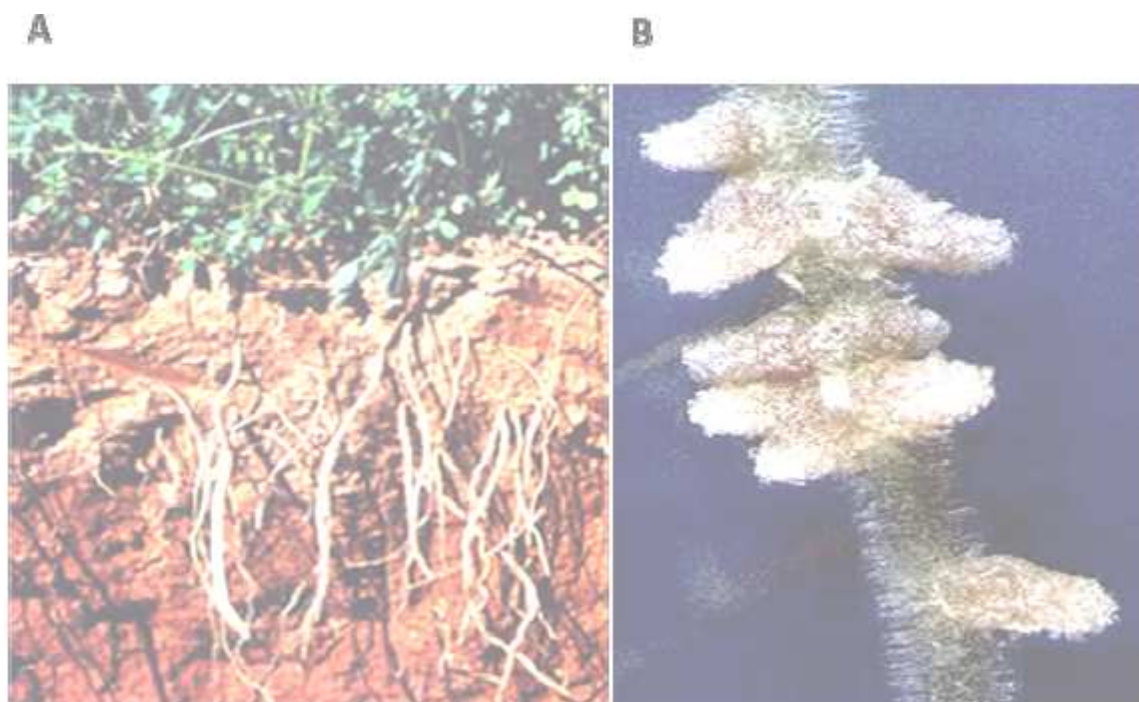


Figure 3: A, Système racinaire dense. B, Nodules racinaires (symbiose avec *Rhizobium*).

6.2. Tige

Les tiges sont plus ou moins dressées, elles portent des feuilles nombreuses, portant à leur extrémité un mucron. Les luzernes 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 (Mauriès. 1994).

6.3. Fleur

La luzerne est allogame. Les fleurs hermaphrodites, symétriques, sont longues (7 à 11mm). Elles sont regroupées en inflorescences en grappe longues de 20 à 40 mm et de 15 à 30 fleurs (Camille. 1980) et à corolle bleu violacé, un pédicelle généralement plus court que le tube du calice et dont les gousses sont contournées en hélice à 1,5 -3,5 tours.

Les couleurs des fleurs sont très diversifiées. La plus fréquente chez les *Medicago sativa* est le mauve-violet alors que les *Medicago falcata* ont des fleurs jaunes (Mauriès. 1994).

6.4. Fruits

Les fruits sont des gousses noires, indéhiscentes. Elles sont plus ou moins enroulées soit spiralées (de 1 à 4 spires) pour *Medicago sativa*. Elles sont couvertes de petites soies et d'un réseau de nervures. La gousse contient plusieurs graines brun-jaunes, réniformes.

7. Intérêt et utilisation de la luzerne

La diffusion de la luzerne est la conséquence de ses rôles agronomique, écologique, économique et nutritionnel.

7.1. Intérêt agronomique

Parmi les légumineuses, la luzerne a vraiment bien mérité l'appellation de « reine des cultures fourragères », car elle fournit un fourrage riche en éléments nutritifs, en protéines, en matières azotées digestibles et en vitamines (Benabderrahim et al. 2008).

Elle permet, non seulement d'économiser l'azote, mais encore elle en restitue à la culture, (Poste.1969 ; 1974) a comparé en Australie occidentale les effets du trèfle souterrain et de la luzerne pérenne, utilisés comme précédent cultural, sur le rendement du blé. Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau suivant.

Tableau 1: Pourcentage d’augmentation des rendements de blé après quelques légumineuses.

Précédent cultural	Rendement en blé en %	
	1ère année	2ème année
<i>M. littoralis</i>	132	138
<i>M. scutellata</i>	120	118
<i>M. truncatula</i>	132	118
<i>Trifolium Subterraneum</i>	131	130
<i>M. sativa</i>	118	116
Végétation spontanée	100	100

Selon (Thiebeau et *al.* 2001), la moyenne de production de deux ans de luzerne est de 689 kg d’N/ ha, que l’agriculteur n’aura pas à apporter sous forme d’engrais minéral.

Cet azote est soustrait à l’environnement pour être transféré à l’alimentation animale par le biais de la culture de luzerne. (Waligora.2010), a rapporté qu’une luzerne peut suffir, à elle seule à fertiliser tout un système cultural sans apport d’azote. Par sa particularité de pouvoir utiliser l’azote atmosphérique en plus de ses racines descendant à deux ou trois mètres de profondeur, la luzerne assure l’amélioration des qualités physico-chimiques du sol (Thiebeau et *al.* 2003). Elle mobilise fortement les nitrates du sol, limitant leur lessivage (Hnatyszyn et Guais. 1988) et elle empêche ainsi les mauvaises herbes de se développer. Par conséquent la culture de la luzerne permet de réduire le stock des graines de mauvaises herbes dans le sol et limiter l’utilisation des produits phytosanitaires (Abdelguerfi et Chebouti. 2002 ; Robert et *al.* 2010).

7.2. Intérêt écologique de la culture de luzerne

La fonction écologique de la luzerne se manifeste par la conservation du sol et de sa fertilité (Beaudoin et *al.* 1992). En effet, Le système racinaire pivotant, très développé et profond (jusqu’à deux mètres) permet de fragmenter le sol et d’améliorer sa structure (Thiebeau et *al.* 2003). La fixation d’azote atmosphérique et le piégeage de carbone lié au processus de la photosynthèse, montrent qu’elle contribue à limiter les effets de l’activité de l’homme sur son environnement. D’après (Thiebeau et *al.* 2001), le total de carbone fixé par la culture après deux années d’exploitation est de 16.0 t C/ha. Cette fixation de carbone et d’azote, permet de placer la luzerne comme une culture "dépolluante".

Une étude menée par (Robert et *al.* 2010), a montré que les indicateurs mesurés (oiseaux, papillons, criquets, sauterelles, chauve-souris et abeilles) sont significativement supérieurs dans une parcelle de luzerne par rapport à une parcelle de céréales. En outre, (Chatelier. 2010), confirme qu'en couvrant le sol en permanence et fleurissant toute l'année, la luzerne offre un gîte et surtout un couvert de choix pour les animaux suscités et de nombreux autres constituants de la biodiversité ordinaire.

Restant en place 26 à 38 mois, la luzerne diminue fortement l'exposition des sols cultivés qu'elle occupe aux phénomènes d'érosion dus aux écoulements de surface des pluies ou aux vents (Robert et *al.* 2010).

7.3. Intérêt économique

La luzerne présente un intérêt économique très important, elle est qualifiée de plante «nitratophage », grâce à l'azote qu'elle prélève à partir du sol, et d'atmosphère (Thiebeau et *al.* 2001). Ces mêmes auteurs, rapportent que la luzerne exporte 2 à 3 t/ha/an de protéines, sans aucun apport d'engrais azoté de la part de l'agriculteur.

La luzerne affiche une plus grande régularité de rendement que ses partenaires et permet ainsi de sécuriser le rendement fourrager de l'exploitation. Sa production est assez bien étalée sur toute l'année, cette répartition présente l'avantage d'avoir du fourrage vert pendant l'été et de pouvoir réaliser moins de stocks dans certaines situations (Renault. 2003).

8. Stress abiotique chez les végétaux

Les plantes répondent aux contraintes de l'environnement par de nombreux changements, révèlent le caractère multifactoriel des mécanismes de tolérance et d'adaptation aux stress abiotiques (Ben naceur et *al.* 2001).

Les stress environnementaux nés de la fluctuation des facteurs abiotiques (sécheresse, salinité, basse température) affectent les conditions de croissance et le rendement végétal, les végétaux perçoivent les signaux environnementaux et les transmettent à la machinerie cellulaire pour activer des mécanismes de réponses. La connaissance de ces réponses, basée sur la transduction des signaux de stress, est donc la base des études visant à améliorer la réponse des plantes cultivées dans différents stress (Bouchelaghem. 2012).

Le stress perturbe les structures normales et la coordination des processus variés au niveau moléculaire, cellulaire, et de l'organisme entier. Le retour à la stabilisation et les réactions de répartition, l'accomplissement d'un réajustement, d'états adaptés, et le maintien de grands pouvoirs de résistance font tous appel à une énergie additionnelle et à des métabolites (Larcher. 2001).

En effet, la plupart des plantes cultivées, et particulièrement les plantes fourragères, sont des glycophytes dont la croissance, le développement et la productivité sont réduites par des taux trop élevés en sel.

Dans la majorité des sols salins, le NaCl est la forme chimique principalement retrouvée et représente entre 50 à 80 % des sels solubles totaux (Rengasamy. 2010).

8.1. Problème de la salinité des sols

Plusieurs contraintes environnementales limitent la croissance et le développement des légumineuses. La salinité et la sécheresse sont considérées comme deux facteurs majeurs influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides. Approximativement 40 % des surfaces sur terre sont caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité (Zahran. 1997).

Les sols salins sont caractérisés par un niveau toxique des chlorures et sulfates de sodium, la conductivité électrique des solutions de sols saturés en sel est supérieure à 4 dS/m, l'équivalent de 40 mM NaCl (Shirokova et *al.* 2000). Les régions du bassin méditerranéen sont fortement touchées par ce fléau.

8.2. Effet de la salinité sur les plantes

La salinité affecte différents mécanismes physiologiques et la nécessité de survivre dans un environnement salin nécessite de multiples mécanismes d'adaptation pour les plantes (Yeo et Flowers. 1986). L'évolution de ces mécanismes adaptatifs implique un ensemble complexe de paramètres parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore connus.

8.3. Les mécanismes touchés par la salinité

La majorité des changements physiologiques notés chez les plantes soumises à un stress salin est une réponse à des composantes osmotiques. Néanmoins, en présence d'une osmorégulation, les plantes traitées par le sel sont confrontées au problème d'accumulation d'ions toxiques dans leurs tissus, ce qui est considéré comme un élément clé limitant la croissance des plantes en milieu salin (Munns et *al.* 1995).

L'inhibition de la croissance foliaire chez les plantes sensibles est la première réponse à l'excès de sel dans le milieu.

Chez les graminées soumises à court terme à une salinité, une inhibition de la croissance foliaire résulte d'une réponse aux composantes osmotiques du stress salin à travers l'ABA (Munns et Termaat. 1986). En conséquence à la diminution de la surface foliaire, l'assimilation du carbone photosynthétique est sévèrement réduite. En effet, les composantes stomatiques et non stomatiques reliées aux cycles du CO₂ sont affectés par les sels. Le contrôle des stomates a été attribué surtout à l'ABA (Sibole et *al.* 2003).

9. Les stratégies d'adaptation

Les mécanismes de tolérance au sel chez les plantes peuvent être groupés en :

- 1) une homéostasie cellulaire regroupant homéostasie ionique et ajustement osmotique (Zhu. 2003).
- 2) un contrôle et une réparation des dommages causés par le stress ou détoxification.
- 3) une régulation de la croissance.

9.1. Homéostasie cellulaire

L'homéostasie ionique au niveau des cellules est atteinte sous stress salin par les stratégies suivantes:

- 1) exclusion des ions Na⁺ des cellules par les canaux ioniques: anti-port Na⁺/H⁺, ou bien par la limitation d'entrée des ions Na⁺,
- 2) compartimentation de Na⁺ dans des vacuoles intracellulaire pour un ajustement osmotique,

3) la sécrétion de Na^+ .

Ainsi la régulation du transport ionique joue un rôle fondamental pour la tolérance au sel chez les plantes. L'analyse génétique d'un mutant d'*Arabidopsis* SOS (Salt Overly Sensitive) a permis l'identification des mécanismes (the SOS pathway) qui régulent l'homéostasie cellulaire et la tolérance au sel (Zhu, 2002).

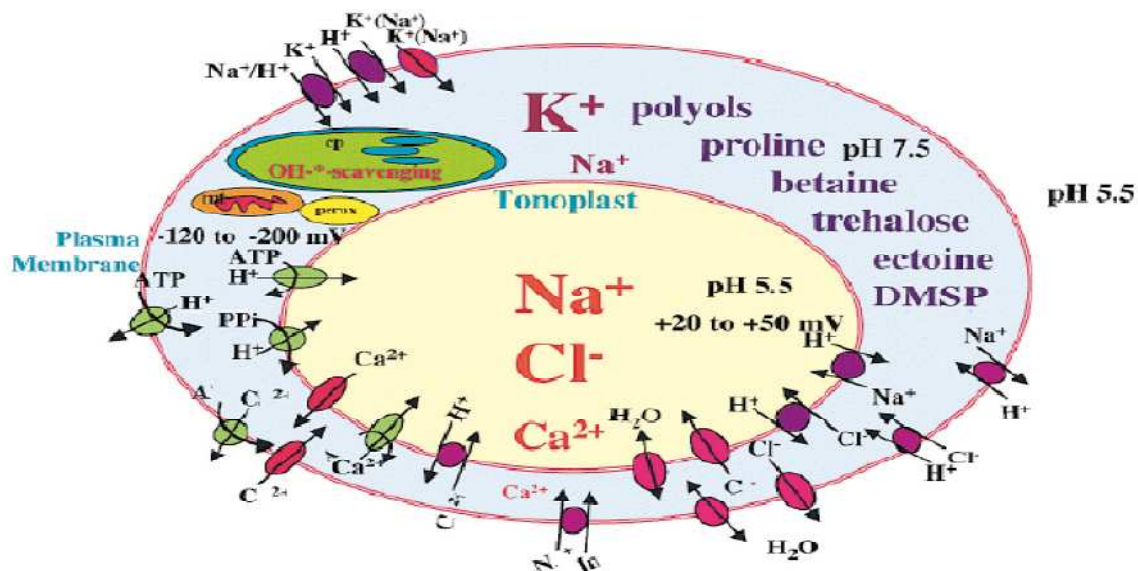


Figure 4: Homéostasie cellulaire établie après l'adaptation au sel (NaCl). Présentation des osmolytes et des ions compartimentés dans la vacuole, des transporteurs protéiques responsables de l'homéostasie pour Na^+ et Cl^- des canaux aqueux, et des potentiels électrochimiques à travers la membrane plasmique et le tonoplaste. Chloroplaste (cp), mitochondrie (mt) et peroxisome (perox), organites dans lesquels le ROS « scavenging » est impliqué (Hasegawa et al. 2000).

A l'équilibre, les plantes acclimatées aux sels ont ainsi complètement redistribué les osmolytes de part et d'autres du plasmalemm et progressivement compartimenté les ions Na^+ et Cl^- . L'homéostasie ionique est alors réalisée, mais ceci au prix d'une consommation énergétique importante, à la fois pour le transport des ions dans les différents compartiments, mais également au travers de la synthèse des nouveaux métabolites et de nouvelles protéines. En effet, la majorité des transporteurs sont énergisés, soit de façon directe, soit de façon indirecte par des pompes à proton **figure 4** selon (Hasegawa et al. 2000).

9.2. Séquestration du sodium dans des vacuoles

La compartimentation de Na^+ dans des vacuoles est une stratégie très importante chez les plantes permettant de maintenir ces ions à une faible concentration dans le cytoplasme et conserver un faible potentiel osmotique cellulaire. L'exclusion de l'excès de sodium du

cytoplasme nécessite la synthèse d'osmolytes compatibles avec la réduction du potentiel osmotique; ce dernier est essentiel pour pouvoir prélever de l'eau dans des conditions de stress salin. Ce processus est coûteux en énergie pour la plante.

Des plantes transgéniques de tomate et de *Brassica napus*, sur-exprimant le gène *AtNHX1* codant pour anti-port Na^+/H^+ , accumulent du sodium dans leur feuilles mais pas dans les fruits ou les graines. Ces plantes se sont montrées extrêmement tolérantes au stress salin et conservent dans ces conditions des bonnes qualités de fruit chez la tomate et d'huile chez *Brassica napus* (Zhang et Blumwald 2001; Zhang et al. 2001).

9.3. Prélèvement de K^+

Dans les conditions optimales, les plantes maintiennent un haut ratio cytosolique K^+/Na^+ . Le stress salin entraîne la diminution de ce ratio, du fait que les ions Na^+ sont en concurrence avec les ions K^+ , ce qui est défavorable pour les processus biochimiques cellulaires. De même, une forte concentration de potassium augmente le potentiel osmotique ou pression osmotique qui entraîne une entrée d'eau à partir du milieu extérieur (Claussen et al. 1997). Le prélèvement de K^+ est essentiel pour la turgescence cellulaire et le déroulement des processus biochimiques sous stress salin.

Le niveau de transcription des gènes codant pour les transporteurs de K^+ reflète probablement une différence de capacité de la plante à prélever le K^+ sous stress salin. Par exemple chez *Arabidopsis*, le stress salin augmente le niveau de transcription du gène *AtKC1* correspondant à un transporteur de K^+ (Pilot et al. 2003).

9.4. Biosynthèse d'osmoprotectants

Les gènes impliqués dans la synthèse d'osmoprotectants sont surexprimés sous stress salin (Zhu. 2002). Les osmoprotectants compatibles pour différents solutés sous stress salin protègent les plantes par ajustement osmotique ce qui maintient la turgescence cellulaire, par détoxification des espèces réactives d'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species), et par stabilisation de la structure (quaternaire) des protéines. Chez des plantes transgéniques, il a été prouvé que l'accumulation de mannitol (Shen et al. 1997), glycine bétaine (Prasad et al. 2000), et proline (Zhu et al. 1998) améliorent leur tolérance au stress salin.

9.5. Synthèse de protéines induites par le sel

Chez les plantes supérieures, le stress osmotique induit différentes protéines dans les tissus végétatifs. Ces protéines sont nommées LEA : late-embryogenesis-abundant. Chez *Medicago saliva*, le gène *Alfin1* code pour une famille de facteurs de transcription et leur expression est corrélée avec la tolérance au sel (Winicov et Bastola. 1999). In vitro le gène *Alfin1* se lie au promoteur du gène *MsPRP2*, qui code pour une protéine racinaire du cytosquelette induite par le sel.

9.6. Synthèse d'antioxydants

Les plantes produisent des espèces d'oxygène actif nommées ROS (radicaux superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et radicaux hydroxyl (OH)) en réponse à un stress salin (Hernandez et al. 2001). Les ROS causent d'importants dommages dans des lipides membranaires, des protéines et acides nucléiques. La détoxification des ROS constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress salin. Les enzymes responsables de cette détoxification nommées antioxydantes incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion.

9.7. Régulation de croissance

Maintenir une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel que le milieu salin.

L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation d'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette: par exemple la xyloglucan endotransglycosylase (Wu et al. 1994). L'autre cause peut être l'accumulation de proline (Ober et Sharp 1994). Ces deux actions sont régulées par l'acide abscissique (ABA), qui est induit par le stress salin (Jia et al. 2002). Ainsi chez le maïs, il a été montré que l'élongation racinaire est inhibée par la présence d'un inhibiteur de biosynthèse d'ABA. Mais elle peut être restaurée par un traitement des racines avec un inhibiteur de synthèse d'éthylène. Ces données suggèrent que l'élongation racinaire par l'intermédiaire de l'ABA doit être causée par une inhibition de biosynthèse d'éthylène (Spollen et al. 2000).

Chez *Arabidopsis*, les régulations de la division cellulaire et de l'élongation cellulaire sous stress salin sont effectuées par l'intermédiaire de l'ABA (Wang et *al.* 1993). Cependant le mécanisme exact de cette régulation est encore mal connu.

Chapitre II :
Matériel Et Methodes

1. Description des dispositifs expérimentaux

1.1 Matériel végétal et condition de culture

Au cours de ce stage effectué au sein de laboratoire d'écologie fonctionnel et environnement, deux génotypes de luzerne (*Medicago Sativa L*) ont été étudiés : Moapa, une variété étrangère fréquemment utilisée par les agriculteurs marocains et Tafilalet, écotype d'origine marocaine.

Avant de lancer la germination, les graines ont été traitées avec de l'eau de javel à (10 %) pendant 15 min, et lavées avec l'eau du robinet. Ensuite, les graines ont été trempées dans l'éthanol à 70 % pendant 5 min, suivi par un rinçage avec de l'eau distillée, et mises à germer dans des boîtes de pétrie sur des couches de papier absorbant imbibé d'eau distillée.

Les boîtes de pétri, contenant les graines à germer, ont été fermées hermétiquement pour éviter l'évaporation et pour pouvoir garder une humidité relative constante (~ 80 %). La germination a été effectuée à une température de 25°C. Une graine est considérée comme ayant germée lorsque la radicule apparaît à travers les téguments.

Les plantules au stade cotylédonnaire ont été conduit dans des pots de plastique de 15cm, chacun des pots a été rempli de 950g de substrat stérilisé : sol/sable (1 :1), Dans chaque pot nous avons disposé 2 plantules de luzerne.

Les plantes ont été fertilisées (macro et oligo-éléments) et l'irrigation a été réalisé avec de l'eau distillée afin de maintenir l'humidité du substrat à environ 85% de la capacité au champ. Après 4 mois de culture dans le sol les plantes ont été transférées en hydroponie pendant 1 mois avant l'application de stress salin.

2.2 Application des traitements

Afin d'obtenir des plantes de luzerne contrastée en terme de teneur en azote endogène, les plantes de luzerne ont été réparties en 3 lots : **C**, **S1** et **S2**. Les lots C et S1 ont été cultivées pendant une période de 11 jours sur une solution nutritive contenant 2mM de nitrate

d'ammonium alors que les plantes du lot S2 ont reçu une alimentation azotée 0,2mM sous forme de NH_4NO_3 .

L'effet de la salinité sur la croissance et le développement des plantes de luzerne en relation avec le statut azoté de la plante a été étudié en appliquant un traitement salin en hydroponie en serre. Les plantes du lot C appelées plantes témoins (Contrôle) ont été maintenues sur une solution nutritive 2 mM NH_4NO_3 sans NaCl. Par contre les plantes des lots S1 et S2 ont été transférées sur une solution nutritive à 2 mM de avec NaCl 200 mM pendant 11 jours de traitement (Figure 7).



Figure 5: Dispositif expérimental des deux variétés de luzerne cultivées sous serre sur substrat sableux (premier stade de germination).



Figure 6: Dispositif expérimental des deux variétés de luzerne cultivées sous serre en hydroponie.

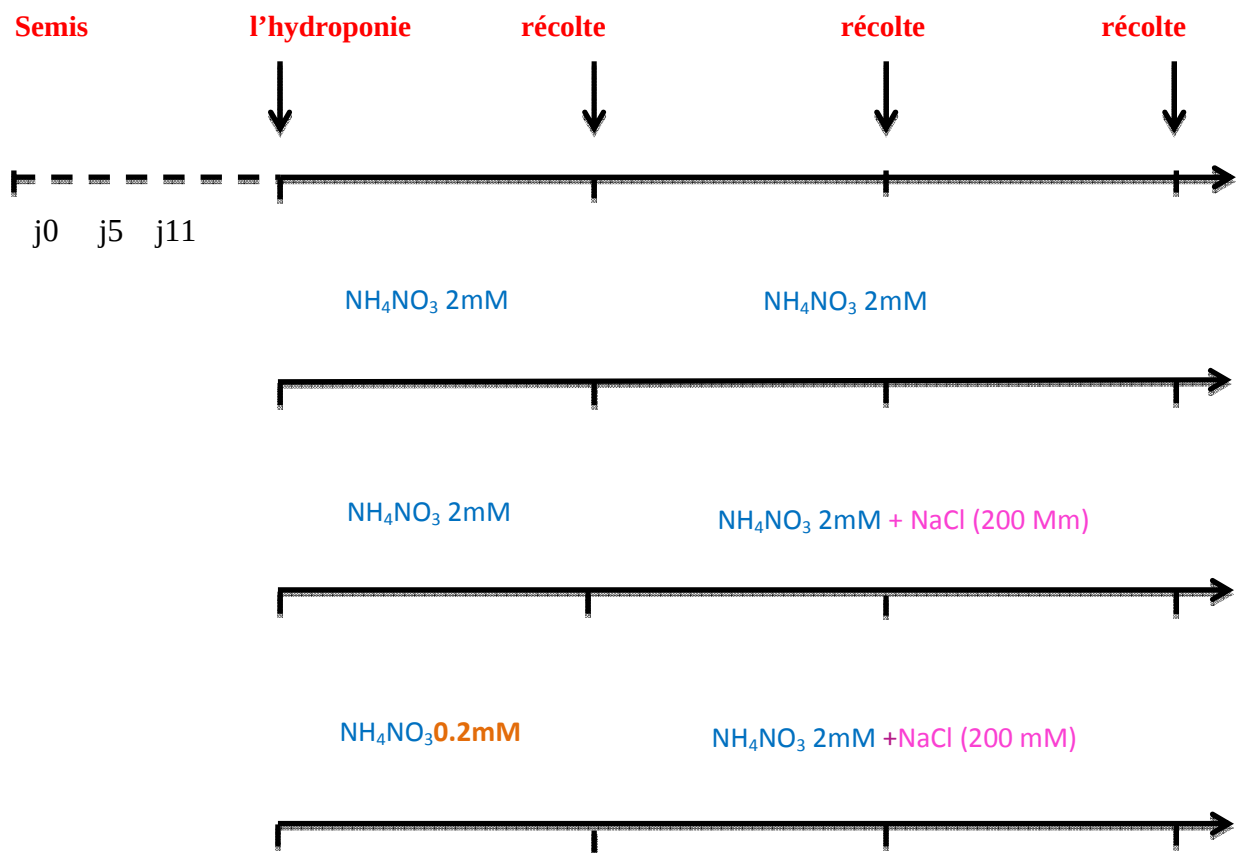


Figure 7: Dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'effet d'un stress salin de 200 mM sur la croissance de la luzerne.

Tableau 2: composition de la solution nutritive utilisée pour la culture de la luzerne

Macroélément	Concentration	Oligoélément	Concentration
NH ₄ NO ₃	1.7 M	H ₃ BO ₃	4mM
KH ₂ PO ₄	0.5M	ZnSO ₄	1mM
MgSO ₄	0.5M	CuSO ₄	1mM
CaCl ₂	2M	MnSO ₄	2mM
K ₂ SO ₄	0.5M	CoCl ₂	1mM
Fe-Na-EDTA	20mM	Na ₂ MoO ₄	1mM

2. Méthodes analytiques utilisées

2.1. Caractérisation du sol

2.1.1 Type de sol

L'échantillon du sol choisi a été prélevé de la région Ain Bida, il a été utilisé dans un mélange avec du sable (1 :1), le substrat a été stérilisé et disposé dans des pots.

2.1.2. Détermination de la capacité au champ

Les pots qui contiennent le sol séchés et pesés ont été arrosés avec de l'eau distillée jusqu'à saturation. Ensuite les pots ont été égouttés à température ambiante pendant 24h. Après la pesé, la capacité au champ a été calculée comme suite :

$$CC = P_2 - P_1$$

CC : capacité au champ

P1 : poids de pot contenant le sol avant l'arrosage

P2 : poids de pot contenant le sol après la saturation

2.1.3. Détermination de la teneur en nitrate NO₃⁻

La détermination de la teneur en ion nitrate contenu dans le sol a été effectuée en utilisant la méthode de **(Cataldo et al 1975)**, 3 répétitions ont été réalisées.

A 5g de sol frais tamisé à une maille de 2 mm, nous avons ajouté 20ml de solution de KCL 2M, le mélange est agité pendant 20 minutes puis filtré. Le filtrat est récupéré dans une fiole jaugée de 20ml.

A 100 µl de l'extrait ont été ajouté 400µl d'acide sulfosalicylique 5% (w/v) et après 20 min à température ambiante, le développement de la coloration a été réalisé par l'addition de 9.5 ml de NaOH 2N. Le mélange a été agité au vortex et refroidi à température ambiante. La lecture de la densité optique a été effectuée au spectrophotomètre à 410nm.

La gamme d'étalonnage est constituée de solutions de concentrations différentes de nitrates (0µg/ml ; 65µg/ml ; 130µg/ml et 260µg/ml) préparées à partir de .

2.1.4 Détermination de la teneur en ammonium NH_4^+

La détermination de la teneur en ammonium a été effectuée en utilisant la méthode **(d'Anderson et Ingram 1993)**. A 5g de sol frais tamisé à une maille de 2 mm, nous avons ajouté 20 ml de KCl 2M. Le mélange est agité pendant 20 minutes ensuite la suspension est filtré et le filtrat est récupéré dans une fiole jaugée de 25 ml. A 100 μ l de de l'extrait, ont été ajouté 5ml de réactif A (constitué de salicylate de sodium, de citrate de sodium, de sodium tartarate et de sodium nitropruside). Le mélange est agité et laissé agir pendant 15 min à température ambiante, ensuite 5 ml de réactif B (hydroxyde de sodium 3% (w/v) et sodium hypochlorite 1% (v/v)) ont été ajouté. Après 1h de réaction à une température ambiante la lecture de l'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre à 655nm. La gamme d'étalonnage a été constituée de solutions de concentration différentes d'ammonium (0 μ g/ml, 2.5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml) préparées à partir de NH_4Cl

2.1.5 Détermination du phosphore assimilable du sol

Le dosage du phosphore est effectué par colorimétrie à l'aide de la méthode ceruléomolybdique de **DUVA**, qui est basée sur la formation et la réduction d'un complexe de l'acide ortho-phosphorique et l'acide molybdique. 2g de sol tamisé à une maille de 2 mm et mis dans un flacon ont été mélangés avec 20 ml de HCO_3^- vérifier si c'esl le bon produit 0.5N à PH=8.5. Le mélange est agité pendant 1h à 140 tours/min puis filtré dans un erlenmeyer de 20ml. Dans un tube à essai, 2ml de l'extrait ou de la solution standard ont été mélangés avec 2.5ml de solution sulfo-molibdique puis 2ml de l'eau distillée suivi de 0.5ml d'acide ascorbique à 1% ont été ajoutés. Après avoir complété le volume à 10 ml avec de l'eau distillée, les tubes à essai ont été placés au bain marie à 80°C pendant 15 min. la lecture de l'absorbance a été réaliser à 650 nm.

La gamme d'étalonnage est constitué de solutions de concentration différentes de Phosphore (0 μ g/ml ; 0.2 μ g/ml ; 0.4 μ g/ml ; 0.6 μ g/ml ; 0.8 μ g/m] préparées à partir de KH_2PO_4 .(figure:8)



Figure 8:gamme étalon pour le dosage de phosphore

2.1.6 Détermination de la teneur de sulfate soluble et adsorber

La détermination de la teneur du sol en ions sulfate solubles est effectué par l'ajout de 10 g de sol à 50 ml de CaCl_2 0.15%(w/v), le mélange a été agité pendant 30 min puis filtré et le filtrat constitue l'extrait à analyser. Pour la détermination de sulfates solubles adsorbés la même quantité de sol a été ajoutée à KH_2PO_4 contenant 500mg/l de phosphate. Dans un erlenmeyer nous avons déposé 50ml de la solution standard. Ensuite nous avons ajouté 20 ml de solution tampon, le mélange est bien agité au vortex et 0.15 g de chlorure de barium a été ajouté. La lecture de l'absorbance a été effectuée au spectrophotomètre à 420nm. La gamme d'étalonnage est constituée de solutions de concentrations différentes de S-SO_4 (0 à 12 $\mu\text{g/ml}$).

3. Description des méthodes

3.1 Détermination de la biomasse

A chaque date de la récolte, 3 répétitions biologiques sont récoltées pour chacun de traitement le système racinaire des plantes a été soigneusement rincé. Les lots de plante sont ensuite séparés en catégorie d'organes: Racine, Feuille et Tige. Les différents organes sont pesés à l'état frais, congelés à -20°C en attendant les analyses. La matière sèche des différents organes a été déterminée par pesée après passage à l'étuve 65°C pendant 48h.

3.2 Détermination de la surface foliaire

Après la récolte, les feuilles ont été scannées et l'image a été imprimée sur papier. La surface foliaire totale a été ensuite calculée par rapport à la surface spécifique d'un témoin de surface connue constitué de papier (80g/m²). Les paramètres morphologiques étudiés ont été calculés pour chaque répétition en appliquant les équations suivantes :

Surface foliaire spécifique (SFS) : Surface foliaire/ Biomasse sèche foliaire.

3.3. Dosage de la chlorophylle

Ce dosage nous a permis de quantifier les chlorophylles a, b et la chlorophylle totale dans les plantes stressées et témoins et d'établir une comparaison entre les différents types d'expériences.

Méthode

- Prélever 10 à 15 mg de la matière végétale
- Mettre la matière végétale dans un tube avec 3 ml de DMSO
- Mettre les tubes dans l'étuve à une température de 65°C pendant 1 heure.
- Sortir les tubes de l'étuve, puis passer dans un spectrophotomètre pour mesurer la DO à une longueur d'onde de 663 nm puis à 645nm, après avoir régler le zéro avec le DMSO (**Hiscox & Israelstam 1979**).

Puis calculer les concertations des chlorophylles a, b et totale avec la formuleD'Arnon (1949) :

$$\text{Chl a (g/l)} = 0,0127 * A_{663} - 0,00269 * A_{645}$$

$$\text{Chl b (g/l)} = 0,0229 * A_{645} - 0,00468 * A_{663}$$

$$\text{Chl Tot (g/l)} = 0,0202 * A_{645} + 0,00802 * A_{663}$$



Figure 9: Dosage de la chlorophylle des variétés de luzerne étudiées.

3.4. Détermination de l'activité de nitrate réductase

Le dosage du phosphore est effectué par colorimétrie à l'aide de la méthode de (**Griess. 1879**). Pour l'extraction 100mg de matière fraîche des feuilles ; coupées en petits fragments de 3 à 4 mm ; sont ajoutées à 2.5ml de milieu d'incubation. Les échantillons sont mis au bain marie 30°C pendant 30min à l'obscurité, ensuite 2.5ml d'eau distillée bouillon est ajoutée immédiatement enfin les échantillons sont mis dans un bain marie bouillon pendant 1 à 2 min.

A 2ml de la solution standard sont ajouté 1ml de **Griess 1** et 1ml de **Griess 2**, ensuite la lecture de l'absorbance est faite dans un spectrophotomètre à 520 nm. La gamme d'étalonnage est constituer de 4 solution de concentration différentes (0 µg/ml, 0.25 µg/ml; 0.5 µg/ml ; 1 %g/ml) préparé à partir de NaNO₂.



Figure 10: gamme étalon pour le dosage de nitrate réductase.

3.5.Dosage des protéines solubles:

Pour le dosage des protéines nous avons mis au point la méthode d'extraction modifiée de **(Lowry et al 1951)**. A 200 mg de matière fraîche de feuilles sont broyées au mortier en présence de sable fin (quartz) afin de faciliter le broyage, Ensuite 5 ml de tampon sodium-phosphate (100mM, PH=7,5) a été ajouté peu à peu. Après centrifugation à 6000/min pendant 10min à 4°C le surnageant a été récupéré pour les analyses ultérieures.

A 0.2ml d'échantillon est ajouté 2ml de réactif Lowry, le mélange est bien agité et laissé 10 min à une température ambiante ensuite 0.2 ml de réactif Folin est ajouté. L'absorbance est lue à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et la concentration en protéines solubles est déterminée par référence à une droite d'étalonnage établie à partir d'une gamme de concentration de Serum Albumine Bovine (BSA) comprise entre 0 et 0.8 mg/ml.

3.6.Dosage de la proline

Pour le dosage de la proline nous avons mis au point la méthode d'extraction modifiée de **(Bates L et al 1973)**. A 200mg des feuilles fraîches sont broyées dans un mortier sont ajouté 5 ml acide sulfosalicylique 3% (w/v), le mélange est centrifugé à 5000tr/min pendant 10min. le surnageant est récupéré pour analyser.

A 2ml de d'échantillon est ajouté 2ml d'acide acétique glaciale et 2ml de réactif ninhydrine (2.5 g de ninhydrin/100ml de solution qui contient acide acétique glaciale, eau distillée, acide ortho-phosphorique (6:3:1)), ensuite les tubes sont placés au bain marie bouillant pendant 1 h. Enfin les tubes sont refroidis dans la glace et la lecture de l'absorbance est effectuée par un spectrophotomètre à 546nm. la gamme d'étalonnage a été constituée de 4 solutions de concentration différentes (50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml) préparé à partir d'une solution mère de proline à 1.25mg/ml par dilution dans du HCL (0.3N) .

3.7.Dosage du Malondialdéhyde(MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de **(Heath et Paker 1968)**, sur 250 mg de matière végétale fraîche broyé dans 5ml d'acide Trichloacétique (TCA) (0.5% w/v), L'homogénat est centrifugé à 5000trs/min pendant 15 min. les surnageant sont récupérés dans des tubes à essais.

A 1 ml de surnageant, sont ajoutés 3 ml d'acide thiobarbiturique à 0.5% (préparé dans TCA 20%) ; les échantillons sont chauffés pendant 30 min au bain-marie bouillant puis refroidis dans de la glace. L'absorbance est mesurée à 532 nm puis à 600 nm. Pour éliminer l'absorbance non spécifique, l'absorbance lue à 532 nm sera soustraite à celle lue à 600 nm. La quantité de MDA est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 157 mM-1.cm-1, selon la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Absorbance} = \epsilon \times L \times [C]$$

ϵ : Coefficient d'extinction molaire,

L : largeur de la cuve (1cm)

$[C]$: Concentration).

Chapitre III :
Résultats Et Discussions

1. Caractérisation du sol

1.1 La capacité au champ

$$CC = P2 - P1 = 180g$$

CC : capacité au champ

P1 : poids de pot contenant le sol avant l'arrosage

P2 : poids de pot contenant le sol après la saturation

2.2 Composition du sol

Tableau 3: Résultats regroupant des analyses physico-chimique effectuées dans le but d'évaluer la qualité du sol destiné à la culture de la luzerne.

	Valeurs mg/Kg sol Sec
Nitrate	23
Ammonuim	46
Posphate	9.493
Sulfate soluble	40.609
Sulfate adsorbé	26.556

2. Effet d'une déficience nutritive en azote

2.1. Biomasse sèche totale de la plante

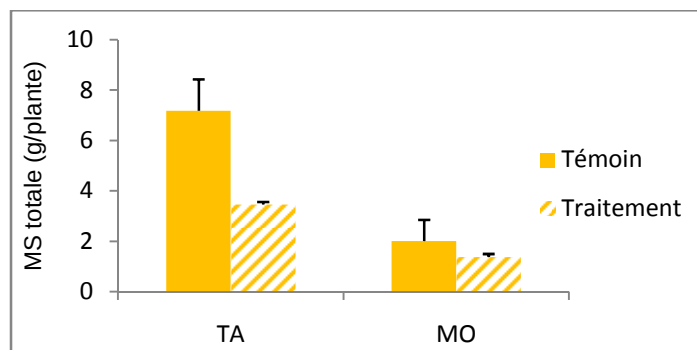


Figure 11: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la production de la biomasse sèche de la plante entière chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoin et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour $n=3$.

Les plantes de la variété TA produisent une biomasse plus grande que celle des plantes de la variété MO, La différence de biomasse enregistrée dans les conditions de notre expérimentation est de 71.98%. Le traitement appliqué par une réduction de l'approvisionnement en azote a provoqué une baisse de la production de la biomasse sèche de 51.96% et 31.63% respectivement chez les variétés TA et MO. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Boulbaba et *al* (2008) qui ont montré que la fertilisation azotée a entraîné une augmentation de la production de la biomasse sèche chez le pois chiche, Ce qui a été expliqué par Salsac et *al* (1984) par l'azote qui pourrait jouer un rôle important dans la synthèse de molécules diverses au niveau de la cellule végétale et contribue à l'ajustement osmotique vu le faible cout énergétique de son accumulation.

2.2. Biomasse sèche des différentes parties de la plante

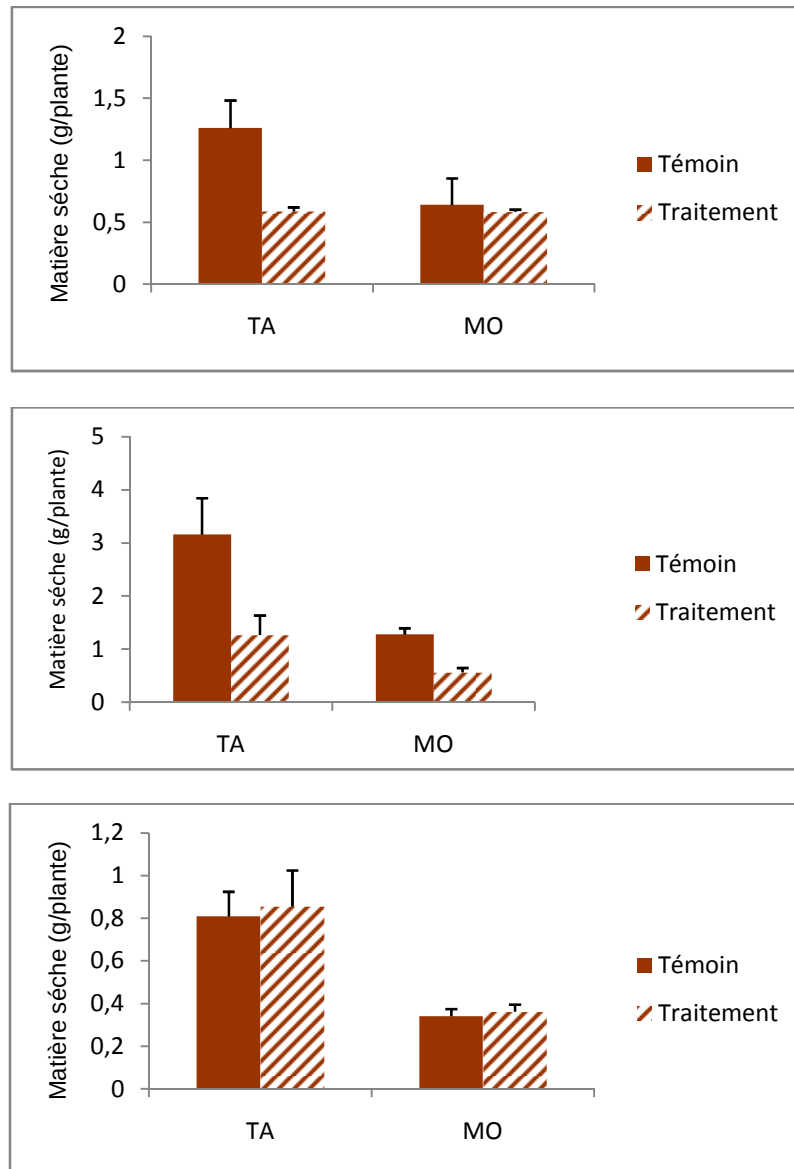


Figure 12: Effet d'une déficience nutritive en azote sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles (A) des tiges(B) et des racines (C) chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoin et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour $n=3$.

En comparant les plantes témoins des deux variétés on note que la variété TA a une biomasse des feuilles (figure 12A), des tiges (figure 12B) et des racines (figure 12C) supérieure à celle de la variété MO. Cette différence est de 49.20% dans les feuilles et 59.50% dans les tiges et 57.86% dans les racines.

Suite à l'application du traitement à 0,2 mM de , les plantes de la variété TA produisent une biomasse aérienne des feuilles et des tiges supérieure à celle des plantes traitées, elle est respectivement de 53.39% et de 59.78% supérieure chez les plantes témoin. De même chez les plantes traitées de la variété MO nous avons remarqué une importante baisse de 55.76% de la biomasse des tiges. Par contre, Aucune baisse significative n'a été enregistrée au niveau des feuilles suite à la réduction de l'approvisionnement des plantes en azote sous forme de .

Contrairement à la partie aérienne qui a montré une différence remarquable entre les plantes témoin et les plantes déficientes en azote, la partie racinaire n'a pas enregistré de différence significative eu importe la variété considérée.

2.3. Surface foliaire spécifique

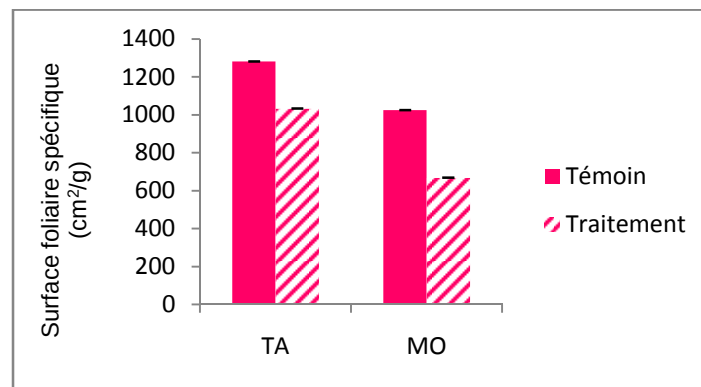


Figure 13: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la surface foliaire spécifique chez deux variétés de luzerne Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoin et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard pour n=3

En comparant les plantes témoins des deux variétés on remarque que La surface foliaire de la variété TA est supérieure à celle de la variété MO de l'ordre de 19.93%. Lors de l'application de traitement la surface foliaire des deux variétés traitées a diminué de 19.36% et de 34.79% respectivement chez TA et MO. L'effet de la réduction de l'approvisionnement en azote minérale sur la surface foliaire spécifique est plus marqué chez Moapa que chez Tafilalet.

2.4. Teneur en chlorophylle des feuilles

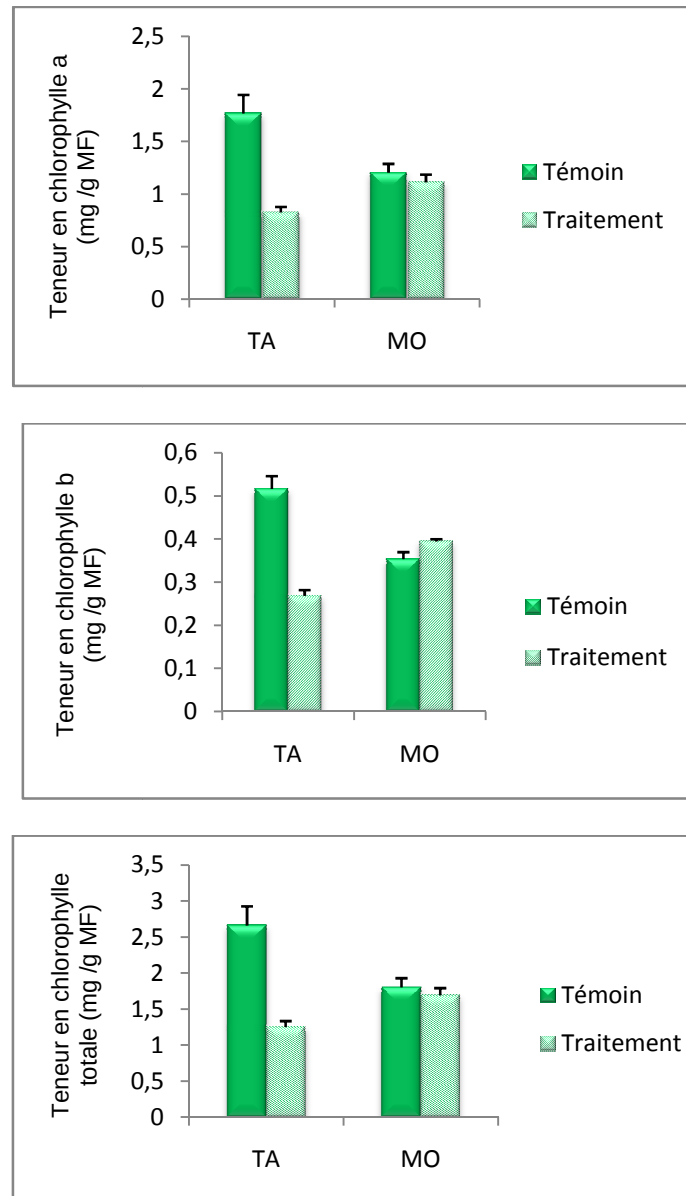


Figure 14: Effet d'une déficience nutritive en azote sur la teneur en chlorophylle a (A), chlorophylle b (B) et chlorophylle totale (C) chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoins et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour $n=3$.

La figure 14 présente l'effet d'une déficience en azote sur la teneur en chlorophylle dans les tissus foliaires des deux variétés de luzernes TA et MO. En comparant la teneur en chlorophylle a (figure 14A) des deux variétés de luzerne témoins TA et MO, on note que la variété MO produit moins de chlorophylle que la variété TA avec une différence de 31.85%. Au niveau des traitements, une déficience en azote entraîne une baisse importante de 53.24%

de la chlorophylle a par rapport au témoin chez la variété TA, et une légère baisse de 8.17% chez la variété MO.

En ce qui concerne la (figure 14B) les plantes témoins de la variété TA produisent 31.51% de chlorophylle b de plus que la variété MO témoin..

En comparant les plantes témoins et celles traitées de la même variété, on constate que la teneur en chlorophylle b a diminué de 47.94% chez la variété TA traitée alors qu'elle a connu une légère augmentation de 10.35% chez la variété MO traité.

La teneur en chlorophylle total des plantes témoins (Figure 14C) chez la variété TA est plus élevée de 32.20% que la variété MO. Lorsque les plantes de luzerne étudiées sont traitées on note une chute de 52.88% chez TA, alors que chez la variété MO il n'y a pas une différence significatif.

2.5. Activité enzymatique du nitrate réductase des feuilles

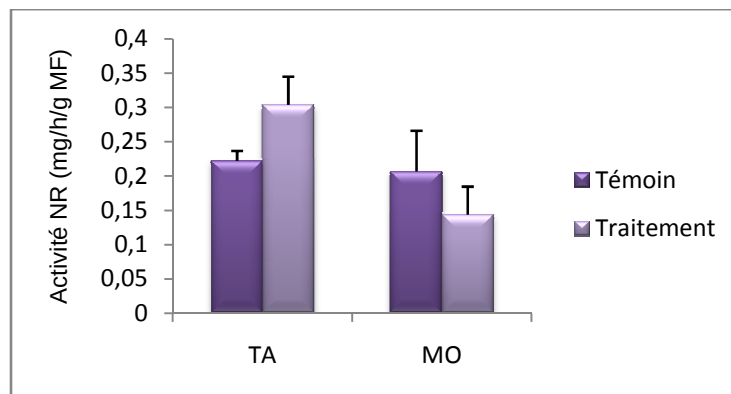


Figure 15: Effet d'une déficience nutritive en azote sur l'activité enzymatique de nitrate réductase au niveau des feuilles chez deux variétés de luzerne Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoin et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard pour n=3.

La figure 15 présente l'effet d'une déficience nutritive en azote sur l'activité enzymatique du nitrate réductase chez les deux variétés de luzerne, TA et MO. En comparant les activités NR des deux variétés témoins en conditions optimales de culture, il a été noté qu'elles sont similaires. Dans les conditions de notre expérimentation, aucune différence significative n'a été enregistrée. Par contre quand les plantes traitées sont comparées aux plantes témoins nous observons des légères augmentations de 26.92% chez TA, en revanche une diminution de 30.46% chez MO.

2.6. Teneur en protéines solubles des feuilles

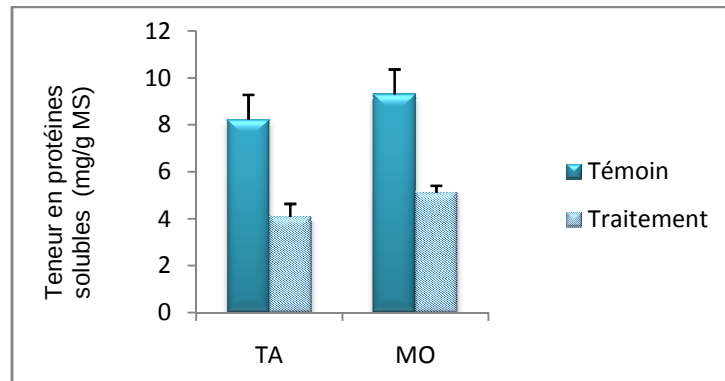


Figure 16: Effet d'une déficience en azote sur la teneur en protéines solubles des feuilles des deux génotypes de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Les plantes témoin et les plantes traitées ont été cultivées en présence d'azote sous formes de nitrate d'ammonium respectivement à 2 mM et 0.2 mM. Les barres verticales correspondent à l'erreur standard pour n=3

La figure 16 présente l'effet d'une déficience en azote sur la teneur en protéines solubles des feuilles des deux génotypes de luzerne TA et MO. Pour les plantes témoins la teneur en protéines solubles des feuilles est plus faible chez la variété TA. Elle est de 11.62% de moins que chez la variété MO. L'application du traitement a provoqué une diminution de la teneur en protéines solubles chez les deux variétés de luzerne avec respectivement 50.21% et 44.99% chez TA et MO.

3. Effet d'un stress salin modéré (200 mM de NaCl pendant 5 jours)

3.1. Biomasse sèche de la plantes

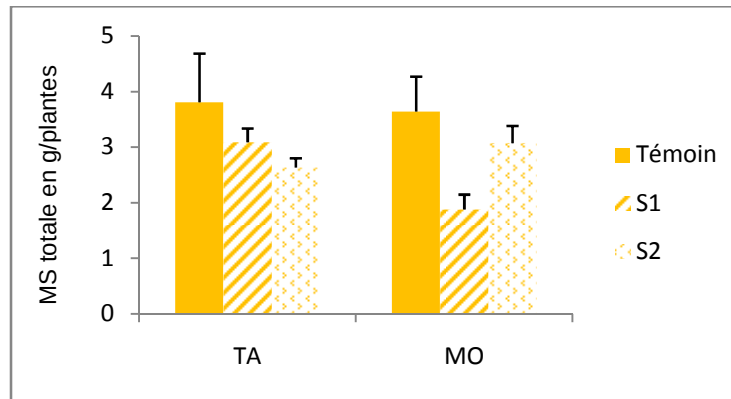


Figure 17: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200 mM) sur l'évolution de la biomasse sèche totale chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium.S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

En comparant les plantes des deux variétés on note que la variété TA a une biomasse élevée de 4.41% . Au niveau traitement on note que le stress a provoqué une diminution de la biomasse sèche de 19.04%, 30.97% de moins respectivement chez les plantes non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**) par rapport aux plantes TA témoin , nous observons également une baisse de 48.47% et 15.65% chez les plantes de la variété par rapport aux plantes MO témoins.

Ces résultats corroborent avec celle de (R'him et *al* 2013) qui a mentionné que les effets de la salinité se manifestent principalement par une diminution de la biomasse sèche chez le piment au niveau des feuilles et des racines, Ainsi Ben (Ahmed et *al*. 2008), a confirmé que l'action dépressive du sel se manifeste par une réduction de la production de matière sèche des différents organes de la plante.

3.2. Biomasse sèche des différentes parties de la plante

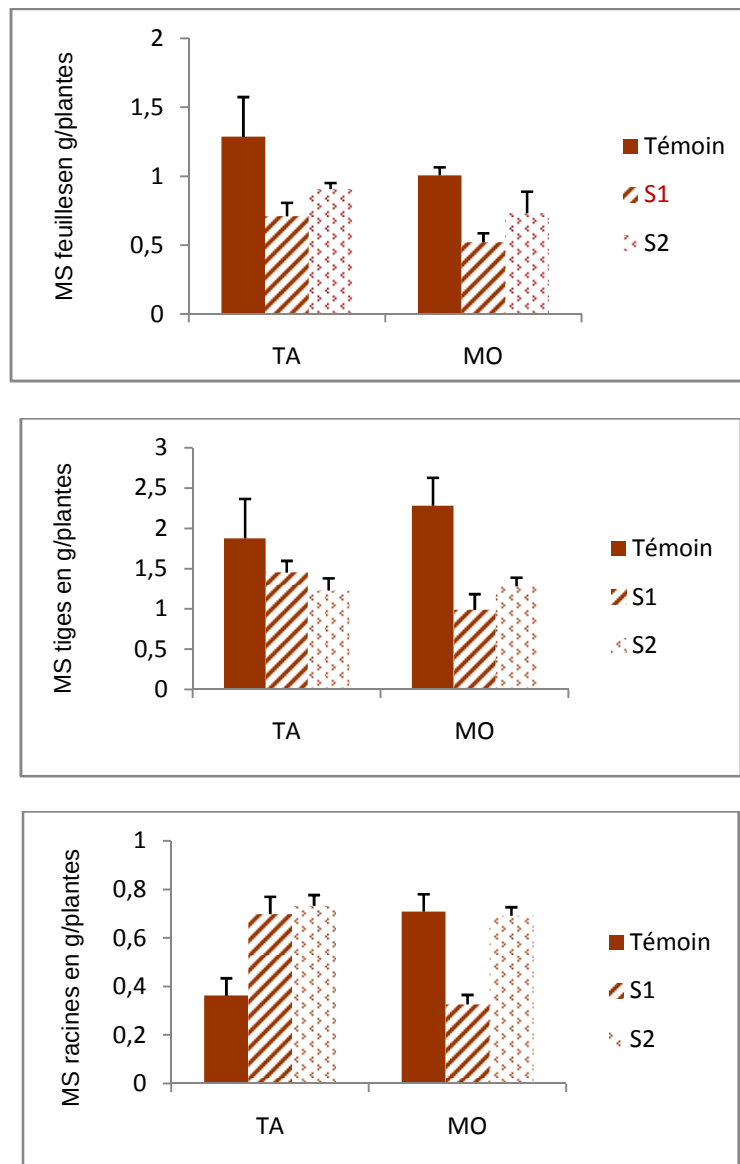


Figure 18: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme denitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

En conditions optimales de culture il a été observé que la biomasse sèche foliaire des plantes est supérieure chez la variété TA que chez la variété MO, avec une différence de 21.76% (figure 18A). Au niveau traitement la biomasse sèche foliaire des plantes TA stressées (**S1**) non déficiente en azote a diminué de 40.80% par rapport aux plantes témoins. Par contre les

plantes stressées (**S2**) déficientes en azote ont montré une diminution moins importante de 32.61% comparativement au témoin .

En comparant la biomasse sèche des tiges (figure 18B) on note qu'elle est supérieure chez les plantes témoins de la variété MO de 17.75% de différence. Le traitement des plantes a provoqué une diminution de l'ordre de 22.53% et 34.52% respectivement chez plantes (**S1**) et (**S2**) par rapport aux plantes témoins TA, et une diminution de l'ordre de 56.70% et 43.79% des plantes (S1) et (S2) par rapport aux plantes MO témoins.

Au niveau racinaire (figure 18C) la biomasse sèche de la variété TA est de 48.80% inférieur par rapport à la variété MO. Le traitement chez la variété TA a provoqué une augmentation remarquable de la biomasse des plantes (**S1**) et (**S2**) de 48.05% par rapport aux plantes TA témoins. Alors que chez MO nous observons que le stress a provoqué une diminution de 53.76% chez les plantes (S1) par rapport aux plantes témoins, par contre aucune différence significative n'a pas été enregistrée chez les plantes (S2).

D'après Termmt(1986) et Munns(1993), l'accumulation progressive, des ions Na^+ et Cl^- dans les feuilles accélère leur sénescence en limitant la formation de nouvelles feuilles photo synthétiquement active, ainsi La diminution du poids sec des tiges est attribuée à une diminution du nombre de ramification chez les plantes stressées, ceci a été déjà observé par (Siakhène. 1984), chez la luzerne annuelle. Nos résultats ont enregistrés également que le stress augmente la biomasse sèche racinaire des deux variété TA et MO, le même comportement a été observé par Boulbaba et al(2008) au cour de leurs travaux sur le pois chiche où il ont observé que la fertilisation azoté provoque une augmentation de la biomasse sèche racinaire, alors que Ibiza M. (2005) a démontré que le stress salin provoque une baisse remarquable chez 3 variété de luzerne « Drâa Tamegroutte (DT) » et « Ziz Aouffous (ZA) » et « Siriver (SIR) ».

3.3. Surface foliaire spécifique

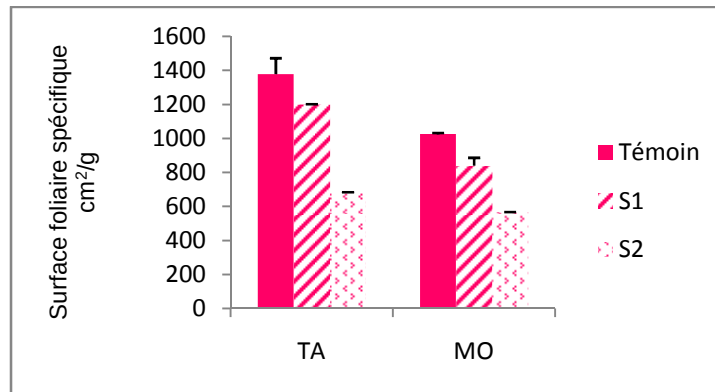


Figure 19: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la surface foliaire spécifique (cm²/g) chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM). Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La surface foliaire spécifique des plantes de la variété TA est supérieure que celle de la variété MO de 25.60% de différence. Le traitement des plantes TA a provoqué une diminution de la surface foliaire de l'ordre de 12.89%, et 50.31% par rapport à la variété TA témoins respectivement chez les plantes non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**). De même on note une diminution chez les plantes stressées (**S1**) de la variété MO de 18.06% de moins par rapport aux plantes témoins, et de 44.60% de moins chez les plantes stressées déficientes en azote (**S2**).

La réduction de la surface foliaire enregistrée chez les 2 variétés de luzerne est très souvent associée à un évitement de la contrainte hydrique (Keim et Kroustard, 1981 ; Fussel et al, 1991). Ainsi Darera et al (1969) pensent que la diminution de la surface foliaire est un trait majeur des plantes visant à limiter leurs besoins en eau, lorsque celle-ci est très insuffisante.

3.4. Teneur en chlorophylles des feuilles

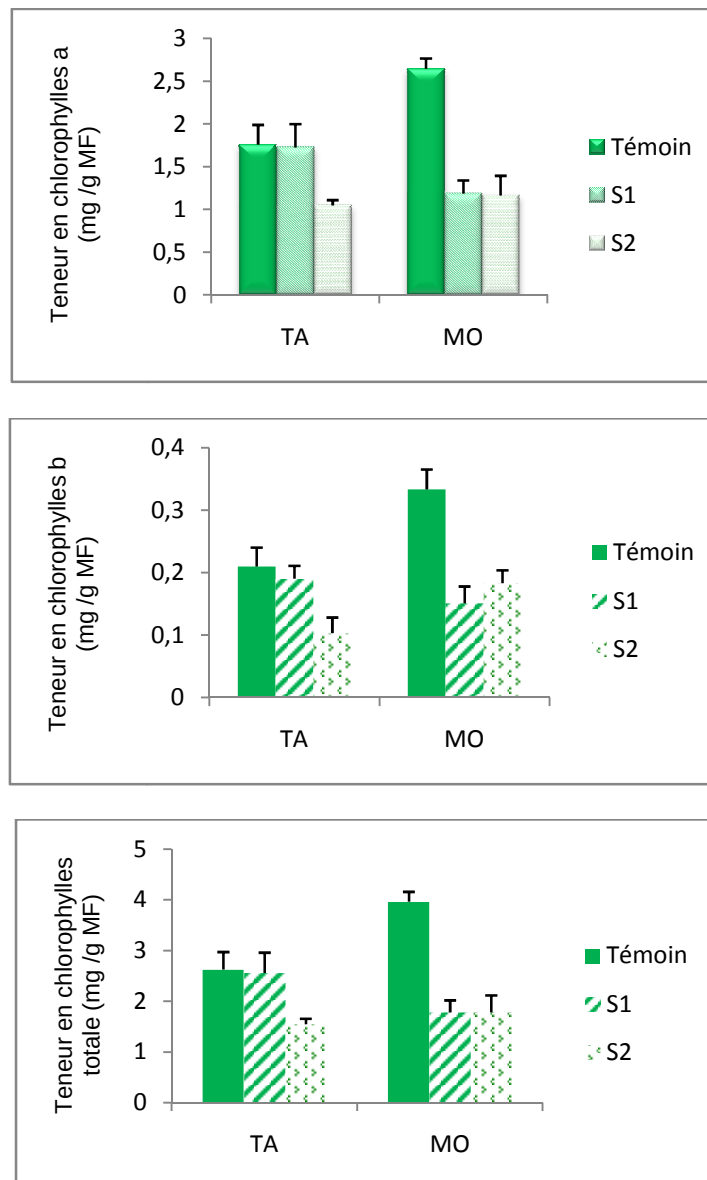


Figure 20: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en chlorophylle a (A), chlorophylle b (B) et chlorophylle totale (C) chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

En comparant les plantes témoins de la variété TA et MO on note que la variété MO produit plus de chlorophylle a que la variété TA avec une différence de 33.54% (figure 20A).

Le stress chez la variété TA n'a pas provoqué aucune différence significative chez les plantes stressées (**S1**) par rapport aux plantes témoins, par contre si ces plantes stressées sont moins

azotées (**S2**) on observe une remarquable diminution de la teneur en chlorophylle de 40.34%. Alors que le traitement chez les plantes MO a diminué la teneur en chlorophylle a des plantes de 55.13% et 56.02% chez les plantes stressées azotées (**S1**) et stressées non azotées (**S2**) par rapport au plantes MO témoins.

En ce qui concerne la chlorophylle b c'est la variété MO témoin qui produit plus de chlorophylle que la variété TA de l'ordre de 37.06% (figure 20B). Au sein de cette même variété TA on remarque que le traitement a provoqué une diminution de la chlorophylle b respectivement chez les plantes stressées riches en azote (**S1**) et stressées pauvre en azote (**S2**) avec une différence de 9.25% et 50.86% par rapport aux plantes TA témoins. Chez la variété Moapa, ce traitement a provoqué une diminution de 54.68% chez les plantes stressées riches en azote (**S1**) et 45.02% chez les plantes stressées pauvres en azote (**S2**), par rapport aux plantes témoins.

La chlorophylle totale est faible chez la variété TA témoins avec une différence de 33.81% par rapport à la variété MO (figure 20C). Par ailleurs, on remarque que le traitement n'a enregistré aucune différence significative chez les plantes stressées (**S1**) par rapport aux plantes TA témoins. En revanche, il a provoqué une diminution de 41.11% chez les plantes (**S2**) déficientes en azote. Ce traitement chez MO a enregistré une diminution de la teneur en chlorophylle totale de l'ordre de 55.10% chez les deux lots **S1** et **S2**.

La réduction de la concentration en chlorophylle durant la période de stress a été également observée par Hirech (2006) et Siakhène (1984) chez d'autres variétés de luzerne, Cette réduction est la conséquence de la diminution de l'ouverture des stomates visant à limiter les pertes en eau par l'évaporation et par l'augmentation de la résistance à l'entrée du CO₂ atmosphérique nécessaire à la photosynthèse (Brown etTanner, 1983 ; Slatyer, 1974).

3.5. Teneur en protéines solubles des feuilles

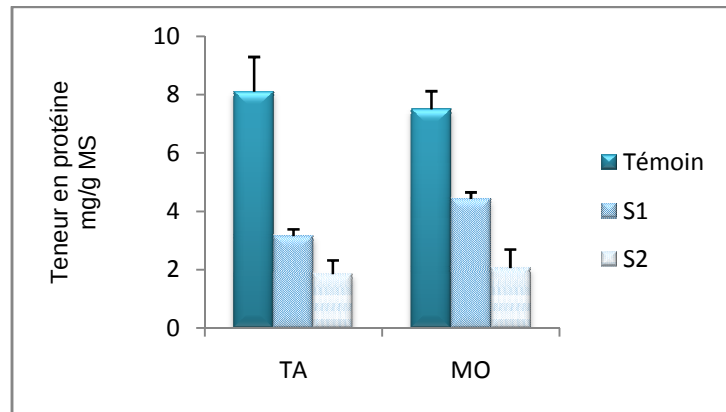


Figure 21: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en protéine chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La teneur en protéines solubles des plantes témoins chez la variété TA est de 7.42% de plus par rapport à la variété MO. Au niveau du traitement appliqué on remarque que le stress a provoqué une diminution importante de la teneur en protéines solubles foliaires chez la variété TA de 61.01 % et 68.86% respectivement chez les plantes stressées non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**) par rapport aux plantes témoins. Il a été également observé une diminution de 40.99% et 72.54% chez la variété MO respectivement chez les plantes stressées non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**). Cette réduction est signalée également par plusieurs auteurs parmi lesquels André et Dias (2004) dans leurs travaux sur le sorgho ; Khosravine jad et al. (2009) dans leurs travaux sur deux variétés d'ogre appelées Afzal et EMB2-12 et Amini et Ehsanpour (2005) dans leurs travaux sur la variété de tomate (Shirazy). Ces auteurs rapportent que la salinité induit la diminution de certaines protéines solubles et que cette variation de la teneur en protéines ne confère pas forcément à la plante une tolérance au stress salin.

3.6. Teneur des en proline des feuilles

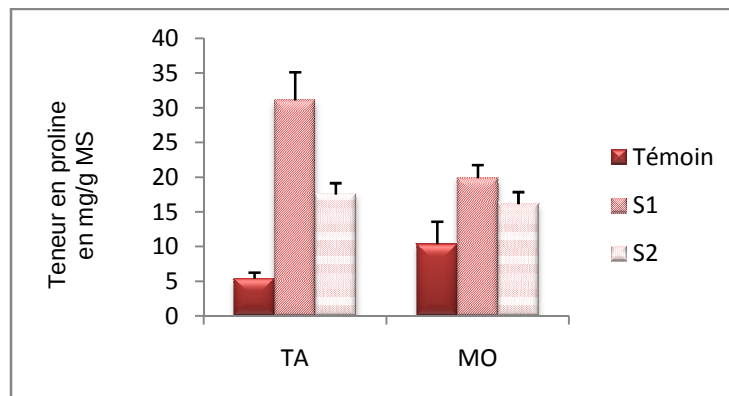


Figure 22: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en proline chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur NH_4NO_3 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour $n=3$.

La teneur en proline des deux variétés de luzerne témoins est de 47.66% de plus chez MO par rapport à la variété TA. En comparant les plantes de la variété TA on remarque que le stress salin a provoqué une forte augmentation de la proline qui arrive jusqu'à 31.07 mg/g MS et 17.53 mg/g MS soit des augmentations respectives de 82.51% et 69.02% de plus par rapport aux plantes témoins chez les plantes non déficientes en azote (S1) et les plantes déficientes en azote (S2). De même les plantes stressées de la variété MO ont subi une augmentation de la proline avec 47.83% et 35.76% de plus par rapport aux plantes témoins respectivement chez les plantes non déficients et déficientes en azote.

Ces résultats corroborent celle observée chez la luzerne Hireche et *al* (2006), chez différentes espèces de blé dur (Nouri, 2002) et chez le trèfle (Laaziza B et *al* 2003). En plus plusieurs auteurs dont Hernandez et *al.* (2000) ; Khedr et *al.* (2003) ; Claussen (2005) et Debnath et *al.* (2008), avaient mentionné que cet acide aminé fait partie des osmotocums que les plantes synthétisent une fois exposées au stress salin ou hydrique, Il a un rôle nécessaire pour l'ajustement osmotique pour équilibrer le potentiel osmotique conformément à ce qui a été démontré par d'autres travaux dont ceux de Gadallah (1999) et Demir (2000). Par contre une forte accumulation de cet acide aminé est un signe de perturbation métabolique (Cheikh M'hamed et *al.* 2008).

3.7. Teneur en Malondialdéhyde (MDA) des feuilles

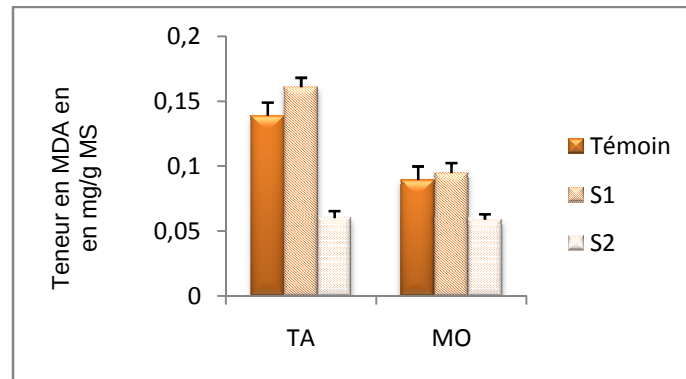


Figure 23 : Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la MDA chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La teneur en MDA des deux variétés chez les plantes témoins est supérieure chez la variété TA que MO avec une différence de 35.59%.

Chez les plantes de la variété TA, la teneur de la MDA des plantes stressées non déficientes en azote (**S1**) a légèrement augmenté de 13.65% de plus par rapport aux plantes TA témoins, en revanche chez les plantes stressés déficientes en azote (**S2**) la teneur en MDA a diminué de l'ordre de 57.50%. Chez MO on note une légère augmentation de 5.78% chez les plantes stressées (**S1**) par rapport aux témoins, par contre chez les plantes déficientes en azote (**S2**) la teneur en MDA est de 34.02% de moins.

Cette peroxydation est le symptôme le plus attribué aux dommages oxydatifs souvent employé comme indicateur du stress oxydatif (Zhang et Kirkham 1994). Le dosage du MDA est un moyen efficace pour évaluer les dommages de stress oxydatif au niveau de la membrane cellulaire (Katsuhara et *al.* 2005).

4. Effet d'un stress salin sévère (NaCl à 200 mM pendant 11 jours)

4.1 Biomasse sèche de la plante

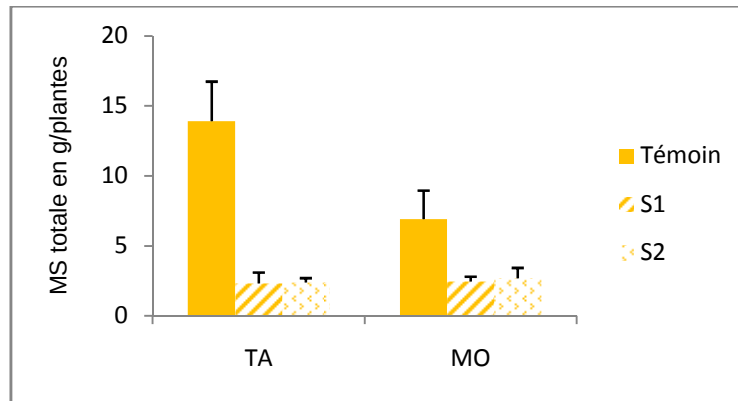


Figure 24: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

Les plantes témoins de la variété TA produisent une biomasse de 50.37% de plus par rapport à la variété MO, en revanche lors de l'application d'un stress sévère de 11 jours on remarque une chute similaire de la production de la biomasse sèche de 83.37% chez les plantes (**S1**) et (**S2**) par rapport aux plantes TA témoins, de même chez MO la teneur en MDA a diminué de 64.61% chez les plantes (**S1**) et (**S2**) par rapport aux plantes témoins.

4.2. Biomasse sèche des différentes parties de la plante.

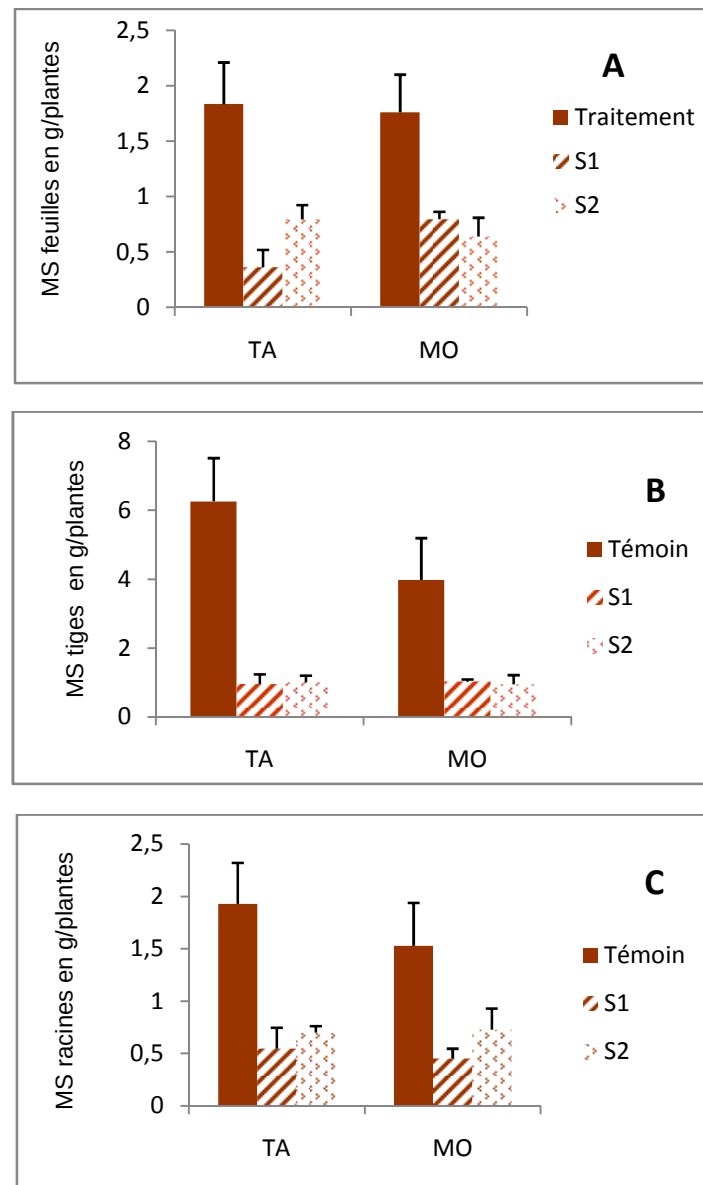


Figure 25: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la biomasse sèche des feuilles des tiges et des racines chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S2 : Plantes stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La biomasse sèche foliaire des plantes des deux variétés (figures 25A) est relativement égales, le traitement des plantes TA a provoqué une chute de 80.14% et 56.47% respectivement chez les plantes **(S1)** et **(S2)** par rapport aux plantes TA témoins, alors qu'il a provoqué chez les plantes MO une diminution de 54.71% et 63.61% respectivement chez les plantes **(S1)** et **(S2)** par rapport aux plantes MO témoins.

Au niveau des tiges (**figure 25B**) la biomasse sèche est aussi supérieure chez les plantes témoins de la variété TA de 36.45%. De plus, le stress salin sévère a provoqué une forte diminution de 84.69% à la fois chez les plantes non déficientes **(S1)** et déficientes en azote **(S2)** par rapport aux plantes TA témoins. Chez la variété Moapa, une diminution de 74.18% de la biomasse sèche a été enregistrée chez les plantes non déficientes **(S1)** et déficientes en azote **(S2)** ; par rapport aux plantes témoins.

Concernant la biomasse sèche racinaire (figure 25C) elle est de 20.78% de plus chez la variété TA par rapport à la variété MO. Au niveau du traitement le stress sévère a diminué la biomasse sèche racinaire de la variété TA de 71.60% et 36.28% par rapport au témoin, respectivement chez les plantes stressés non déficientes **(S1)** et déficientes en azote **(S2)**. Chez la variété Moapa, cette diminution a été évaluée de 70.37% et 52.29% par rapport aux plantes témoins respectivement chez les plantes **S1** et les plantes **S2**.

4.3. Teneur en chlorophylle des feuilles

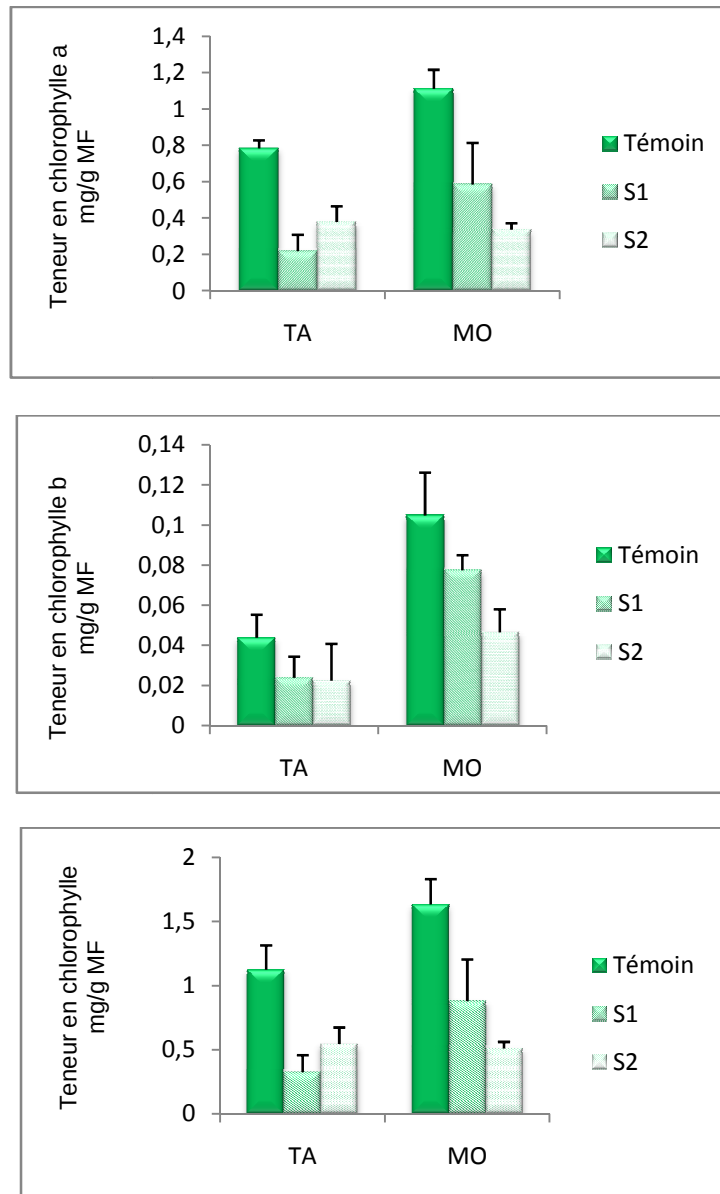


Figure 26 : Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur en chlorophylle a (A), chlorophylle b (B) et chlorophylle totale (C) de la chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d’azote sous forme de nitrate d’ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

Les plantes MO témoins ont une teneur en chlorophylle a supérieure de 29.38% par rapport aux plantes TA(figure 26A).

Au niveau du traitement on remarque que le stress a provoqué toujours une baisse de la teneur en chlorophylle a chez la variété TA de 45.33% et 48.79% par rapport aux plantes témoins, respectivement chez les plantes non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**). Chez la variété Moapa, une baisse de 26.01% et 55.56% de la teneur en chlorophylle a par rapport aux plantes témoins a été enregistrée, respectivement chez les plantes **S1** et les plantes **S2**.

La teneur en chlorophylle b des plantes de la variété MO est supérieure par rapport aux plantes de la variété TA avec 58.16% chez les plantes témoins (figure 26B). Au sein de ces deux variétés on remarque que le stress a provoqué une diminution de la chlorophylle b de 45.33% et 48.79% respectivement chez les plantes stressées non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**) par rapport aux plantes TA témoins, et une diminution de 26.01% et 55.56% par rapport aux plantes MO témoins.

La chlorophylle total (figure 26C) est faible chez les plantes TA témoins de l'ordre de 31.09% et 62.99%. Au niveau traitement on note que le stress a provoqué une diminution de chlorophylle totale de l'ordre de 71.05% et 51.52% respectivement chez les plantes stressées non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**) par rapport aux plantes TA témoins, et diminution de l'ordre de 40.09 et 68.77% par rapport aux plantes MO témoins.

La diminution de La teneur en chlorophylle observé chez les plantes MO et TA qui ont subi un stress salin sévère corroborent avec les observations de (Cengiz et al 2009) dans son travail sur le piment. Nous avons également observés des teneurs très faible de la chlorophylle b, ce qui a été expliqué par (Reynolds *et al.* 2005) où la plante reconvertie en conditions défavorables de stress une partie de la chlorophylle a en chlorophylle b et elle prend de ce fait une couleur moins foncée, (vert clair) permettant de réfléchir la luminosité reçue et par conséquence de réduire la température foliaire et la transpiration.

4.4. Surface foliaire spécifique

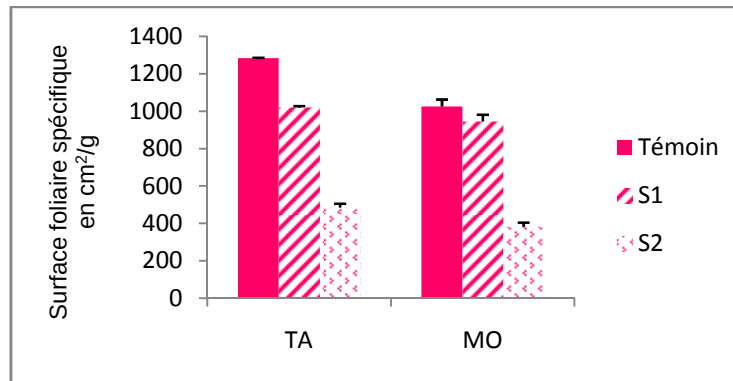


Figure 27 : Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur l'évolution de la surface foliaire spécifique chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

Au niveau variétale les plantes de la variété TA ont enregistrées une surface foliaire spécifique plus élevé que celle des plantes de la variété MO de l'ordre de 20.10%.

Le stress a provoqué une diminution de la surface foliaire des plantes des deux variétés où la surface a diminuée de 20.41% et de 62.41% respectivement chez les plantes stressées non déficients (**S1**) et déficientes en azote (**S2**), par rapport aux plantes témoins de la variété TA. De même on note une légère diminution de 7.82% et 62.64% respectivement chez les plantes stressés non déficientes et déficientes en azote par rapport aux plantes MO témoins.

Nous pensons que la diminution du poids sec des feuilles par plante est due à une diminution du nombre de feuilles. Les chercheurs ont noté chez le pois qu'un déficit hydrique entraîne un arrêt précoce de l'émission de nouvelles feuilles (INRA, 2000). Il est signalé que la plante ajuste sa taille à l'eau disponible dans le milieu en réduisant la surface et/ou le nombre de ses feuilles (INRA 2000).

4.5. Teneur en protéines solubles des feuilles

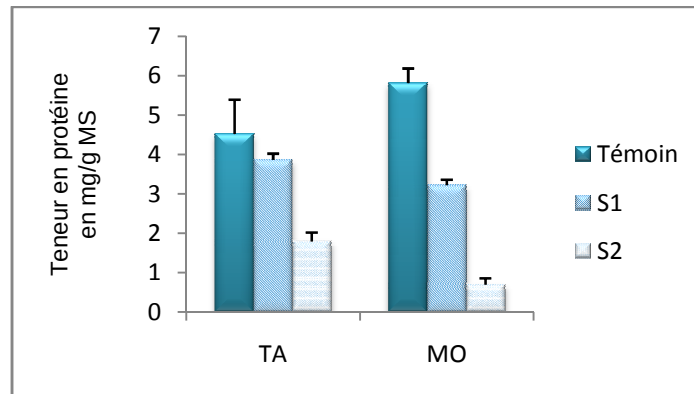


Figure 28: Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la protéine chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO). Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d’azote sous forme de nitrate. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La teneur en protéines solubles des plantes témoins des deux variétés est supérieure chez la variété MO que TA avec une différence de 22.18%.

Au sein de la variété TA le stress a diminué la teneur en protéine de 14.63% et 60.31% respectivement chez les plantes non déficientes (**S1**) et déficientes en azote (**S2**) par rapport aux plantes TA témoins. De même une diminution de 44.59% et 87.92% a été enregistré chez la variété MO respectivement chez les plantes (**S1**) et (**S2**) par rapport aux plantes MO témoins.

4.6. Teneur en proline des feuilles

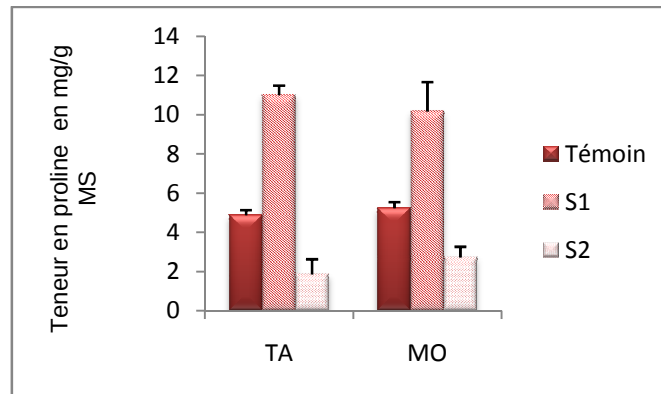


Figure 29 : Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 5 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la proline chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d’azote sous forme de nitrate d’ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

L’application de stress chez la variété TA a augmenté la teneur en proline de 55.59% de plus chez les plantes stressés non déficients en azote (**S1**), en revanche la teneur en proline des plantes stressés déficientes en azote (**S2**) à diminuer de 61.79% par rapport aux plantes témoins.

On remarque la même chose chez les plantes MO ou le stress a provoqué également une augmentation de 48.38% chez les plantes non déficientes en azote (**S1**) par rapport aux plantes MO témoins, et une diminution de 48.03% chez les plantes déficientes en azote (**S2**).

Cette augmentation de la proline chez les plantes non déficientes en azote a été également observé par Savouré et *al* (1995) Kemple et Mac Pherson (1954), Barnett et Naylor (1966) ainsi que Hubac et Chouard (1973), in Nemmar, (1983) soulignant une élévation de la teneur en proline chez des plantes privées d’azote, par contre sa diminution chez les plantes non déficientes en azotes été signaler par Dib et *al* (1991) chez le blé dure où la teneur en proline a augmenter pour diminuer après 12 jours de contrainte hydrique. cette tolérance des plantes au sel, dépend de leur maintien d’une absorption suffisante de nutriments essentiels, tel que K^+ , notamment en présence d’un excès de Na^+ (Shabala et *al.*, 2005).

4.7. Teneur malondialdéhyde (MDA) des feuilles

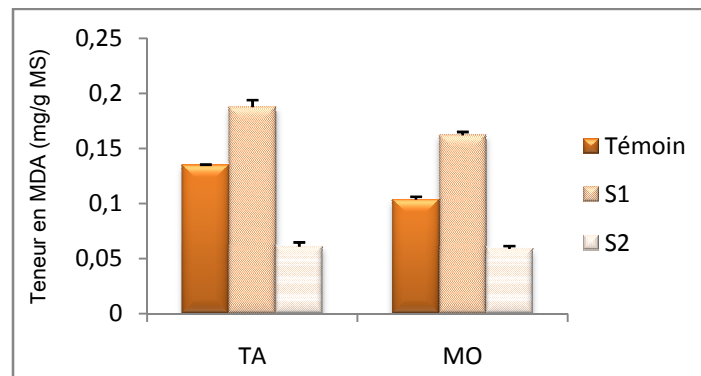


Figure 30 : Effet de la présence de NaCl dans le milieu pendant 11 jours à une concentration de (200mM) sur la teneur de la MDA chez les deux variétés de luzerne : Tafilalet (TA) et Moapa (MO).Témoin : Plantes non stressées et préalablement cultivées en présence d'azote sous forme de nitrate d'ammonium. S1 : Plantes stressées non déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 2mM). S2 : Plantes stressées déficientes en azote endogène (préalablement cultivées sur 0.2mM), Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ SE pour n=3.

La teneur de la MDA des plantes de la variété TA est supérieur que celle des plantes de la variété MO de l'ordre de 23.22%.

Au niveau de traitement le stress (**S1**) a augmenté ta teneur de la MDA de 27.95% de plus par rapport aux plantes témoins de la variété TA,Par contre les plantes stressées déficientes en azote (**S2**) ont subi une forte diminution de l'ordre de54.88%.

Le même comportement a été enregistré chez MO où le stress a augmenté la teneur en MDA de 35.99% chez les plantes non déficientes en azote (**S1**) par rapport aux plantes témoins, et une diminution de 43.18% chez les plantes déficientes en azote (**S2**).

La réponse des plantes azotées au stress a été également observée chez Mohamed et al (2014) dans son travail sur deux variétés de colza sous l'effet du déficit hydrique sévère, chez Irigoyen et al. (1992) dans son travail sur la luzerne, Zhang & Kirkham (1994) dans leur travail sur le blé et chez Jiang (2001) dans son travail sur quelques graminées

Conclusions Et Perspectives

Au terme de notre travail réalisé sur deux génotypes de luzerne (*Medicago sativa L*) nous avons noté que :

- Dans les conditions optimales de culture c'est la variété Tafilalet qui présente une croissance (Biomasse sèche, Surface foliaire, ANR) plus importante par rapport à la variété Moapa.
- La déficience en azote a un effet négatif sur la croissance des plantes chez les deux variétés Tafilalet et Moapa.
- Le stress salin modéré (200Mm/5 jours) a provoqué une meilleure résistance des plantes Moapa déficientes en azote par rapport aux témoins.
- Le stress salin sévère (200mM/11 jours) a provoqué un arrêt de résistance des plantes déficientes en azote, en revanche une meilleure adaptation des plantes stressées des deux variétés a été réalisée.
- Les deux génotypes de luzerne Tafilalet et Moapa résistent au stress par la synthèse de la proline.

Des futures investigations sont nécessaires afin de mettre l'accent sur la contribution potentielle des molécules azotées à la tolérance au stress abiotique. Ceci en adoptant un dispositif expérimental permettant d'obtenir des plantes contrastées en terme de teneur en azote endogène sans pour autant avoir des différences des teneurs en sucres solubles. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier et de mettre en évidence une modification de la répartition des molécules azotées (acides aminés et protéine solubles,...) entre les différents organes suite à l'application d'un stress salin. Le retour de la distribution des molécules azotées au sein de la plante à son état initial suite au retour aux conditions optimales du milieu de culture renforcerait l'hypothèse d'une implication de la teneur des tissus en azote à la tolérance au stress salin.

Références bibliographiques

Ahmed H, Arafet M, Zid E., 2008: Tolérance à la salinité d'une Poaceae à cycle court : la séttaire (*Setaria verticillata* L.). C.R. Biologies, 331:164- 170.

Amini F, Ehsanpour AA., 2005: Soluble Proteins, Proline, Carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. *Am.J. Biochem Biotech.*, 1(4): 212-216.

Anderson, J.M., Ingram, J.S.I. (Eds.), 1993: Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods. CAB International, Wallingford, UK.

Andre Dias, D.A.N., Jose T.P, Joaquim E.F., de Lacerda C.F., Silva J.V., Alves da Costa P.H. and Gomes Filho E., 2004: Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. Brazil. *J. Plant Physiol.*, 16: 31-38.annuelle" thèse Ing Agr, INA, El Harrach, 90 p.

Antipolis, S., 2003: Les menaces sur les sols dans les pays méditerranéens. Plan bleu. 80 pages.

Ashraf M., McNeilly T., 1988: Variability in salt tolerance of nine spring wheat cultivars. *J. Agron. Crop Sci.*, 160: 14-21.

Barnes D., Heichel G., Vance C. and Peaden R., 1990: Registration of Ineffective Agate and Ineffective Saranac' non-N 2-fixing alfalfa germplasms. *Crop Science*, 30 : 752-753.

Barnett, N. M., A. W. Naylor, 1966: Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Pl. Physiol.*, 41, 1222-1230.

Bates L, Waldren RP, Teare ID., 1973: Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207

Beaudoin N., Denys D., Muller J.C., Monbrun M.D. et Ledain C., 1992 : Influence d'une culture de luzerne sur le lessivage du nitrate dans les sols de Champagne-Crayeuse. *Fourrages*, 129 : 45-57.

Ben Khaled L., Gomez A., Honrubia M., Oihabi A., 2003: Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*. Agronomie, EDP Sciences.

Ben Naceur M., Rahmone C., Sdiri H., Meddahi M.L., Selmi M., 2001 : Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en de quelques variétés maghrébines de blé. *Sécheresse*. Vol. 3 : 167-174.

Benabderrahim M.A., Haddad M. et Ferchichi A., 2008 : Essai d'adaptation de 16 cultivars de luzerne perenne (*Medicago sativa* L) dans un système oasien du sud tunisien : Gabes (local) et 15 cultivars étrangers. Option méditerranéennes. Série A, № 79. CIHEAM, 419- 422.

Berkat, O., and Tazi, M., 2004, Country Pasture/ Forage Resources Profiles: Morocco; www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/counprof/morocco/Morocco.htm, accessed August 14 2007.

Birouk, A., A. Bouizgaren and B.Baya., 1997: Luzerne (*Medicago sativa* L.). In: Jaritz, G. et Bounejmate, M. (éd.), *Production et Utilisation des Cultures Fourragères au Maroc*, pp 126-137. INRA, Rabat, Maroc.

Bouchelaghem S., 2012: Contribution à l'étude de l'impact d'un engrais couramment utilisé en algérie (NPK) sur la croissance le métabolisme et le développement racinaire d'un modèle végétale blé dur. Thèse de doctorat. Univ. Constantine.

Boulbaba L, Bouaziz S, Mainassara Z, Mokhtar H & Mokhtar L., 2008: Effets de la fertilisation azotée, de l'inoculation par *Rhizobium* sp. et du régime des pluies sur la production de la biomasse et la teneur en azote du pois chiche

Brown, P.W and Tanner, C.B; 1983 "Alfalfa stem and leaf growth during water stress" *Agro*, 75, pp.779-804

Camille M., 1980: Fourrage Ed, La maison rustique Paris 302p.

Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, and Youngs VL., 1975: Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant-Tissue by Nitration of Salicylic-Acid. *Commun. Soil*

Cengiz Kaya, Muhammed Ashraf, Osman Sonmez, Salih Aydemir, Atilla Levent Tuna, Mehmet Ali Cullu., 2009: The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae* 121, 1–6.

Chaabena A Abdelguerfi A et Baameur M., 2004 : Comportement et caractérisation de quelques variétés de luzerne (*Medicago sativa* L) dans la région de ougla *Revue Agriculture*, vol 13 n° 3 271-276.

Chaabena A., 2001: Situation des cultures fourragères dans le sud septentrional du Sahara algérien et caractérisation de quelques variétés introduites et populations sahariennes de luzerne cultivée, thèse Magister en sciences agronomiques, Institut. National Agronomique, EL-HARACH, p 124

Chatelier D., 2010: La luzerne alliée naturelle de la biodiversité. COOP de France déshydratation, Réseau Biodiversité pour les Abeilles, Fotolia.

Cheikh M'hamed H, Abdellaoui R, Kadri KM, Ben Naceur, Bel hadj S., 2008: Evaluation de la tolérance au stress salin de quelques accessions d'orge (*Hordium vulgare* L.) cultivées en Tunisie: Approche physiologique. *Sci. Tech.*, 28:30 -37.

Childers W. R., 2008: Encyclopédie Canadienne. (<http://www.Thecanadianencyclopedia.com>).

Claussen M, Luthen H, Blatt M, Bottger M., 1997: Auxin induced growth and its linkage to potassium channels. *Planta*, 201: 227-234

Claussen W., 2005: Proline as a measure of stress in tomato plant. *Plant Sci.*, 168: 241-248.

Darera, N.F; Marchall, D.R, Balaam, L.N., 1969: "Genetic variability in root

Debnath M., 2008: Responses of *Bacopa monnieri* to salinity and drought stress *in vitro*. *J. Med. Plant. Res.*, 2(11): 347-351.

Demir, Y., 2000: Growth and proline content of germinating wheat genotypes under ultraviolet light *Turk. J. Bot*, 24, pp. 67-70. development in relation to drought tolerance in spring wheat expt." *Agric*, 5, pp.327-

Dib, A; Monneveux.P., 1991: Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I- Caractères morphologiques d'enracinement", *NRA Agro*, 12, pp.371- 379.

FAO (Food and Agricultural Organization). 2008. Land and plant nutrition management service. Available online at: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>

FAO et IPTRID- 2006 Conférence électronique sur la salinisation

Fussel, L.K; Biokirg, F.R et Bielev, P; 1991 "Crop physiology and breeding "

Gadallah, M. A. A., Effects of proline and glycine betaine on vicia fabae responses to salt stress. Biol

Gall A., 1993: Les grandes légumineuses : situation actuelle, atouts et perspectives dans le paysage fourrager français. *Fourages* 134: 121-144.

Griess, P. Ber. Deutsch Chem. Ges., 1879: 12, 426.

growth under field stress conditions" Crop. Sci., vol 21; pp.11-14

Gunter J Boundemat M., 1997 : Production et utilisation des cultures fourragères au Maroc, INRA Maroc, 389p

Hasegawa, PM., Bressan RA., Zhu JK, Bohnert HJ., 2000: Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* **51:** 463–499p.

Heath RL, Packer L., 1968: Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125, 189–198

Hernandez JA, Ferrer MA, Jimènez A, Barcelo AR, Sevilla F., 2001: Antioxydant systems and O₂-H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. It's relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.*, 127: 817-831.

Hireche YA., 2006 : Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L.) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Mémoire de Magister, Université Al Hady Lakhdar-Batna (Algérie), 83 p.

Hireche, Y., 2006: Réponse de la luzerne cultivée au stress hydrique et à la profondeur de semis. Mémoire de magister en sciences agronomiques. Université de Batna, pp : 19.

Hiscox JD, Israelstam, GF., 1979: a method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *canadian journal of botany* 57: 1332-1334

Ibriz. M, Thami Alanù I, Zenasnit L, Alfaiz C et. Benbella't M., 2005: Effet de la salinité sur le rendement en biomasse et la composition en éléments minéraux d'écotype marocains de luzerne (*Medicago Sativa* L.) *AL AWAMIA* **115** Vol. 2 N°3. Ing. onpellier, P.108

D.W. & Sanchez-Diaz M., 1992: Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologia Plantarum*, **84:** 67-72.

Jia W, Wang H, Zhang CH, Zhang J., 2002: Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot.* **53:** 2201-2206

Jiang Y. & Huang B. 2001: Drought and heat injury to two coolseason turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, 41, 436-442.

Jiang Y. & Huang B., 2001: Drought and heat injury to two cool season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science*, **41:** 436-442.

Julier B. and Huyghe C., 2010 : Quelles légumineuses fourragères (espèces et variétés) et quelles conduites pour améliorer l'autonomie protéique des élevages herbivores ? *Innovations Agronomiques*, **11 :** 101-114.

Katsuhara M., Otsuka T. & Ezaki B. 2005: Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 169, 369-373.

Keim, D.L et Kroustard, W.E, 1981: "Drought response of winter wheat cultivars

- Kemble, A. R., H. T. McPherson, 1954:** Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *Bioch. J.*, 58, 46-50.
- Khedr AH, Abbas MA, Amal AW, Quick P, Gaber MA., 2003:** Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. *J. Exp. Bot.*, 54(392): 2553-2562.
- Khosravinejad F, Heydary R, Farboodnia T., 2009:** Effect of salinity on organic solutes contents in barley. *Pak. J. Biol.Sci.*, 12(2): 158-162.
- Kinet JM, Benrebiha F, Bouzid S, Lailhacar S et Dutuit P., 1998:** Le réseau Atriplex. Allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions arides et semi arides. *Cahiers agricultures*, 7 : 505-509.
- Laaziza B, Asun_cion G, Mario H, AbdallahO., 2003:** Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le Rhizobium
- Larcher W., 2001:** Physiologie plant ecologie. 4the edition .Ed. Based on the translation of the third edition. P 350.
- Le françois P. et Ruby F., 2003:** Prévision et santé. Une approche intégrée. Réseau proteus.
- Lowry O.H, Rosenbroug N.j Fares A.L, Randoll R.J., 1951:** Prtein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol Chem* 193, PP. 256-257.
- Marble.V.L., 1993:** Les fourrages pour le proche orient: la luzerne, étude FAO production végétale et protection des plantes 97/1, FAO, Rom, 237 p.
- MAURIES M, 2003:** Luzerne culture récolte conservation utilisation, Ed, France Agricole, p 23.
- Mauriès M., 1994:** La luzerne aujourd'hui. Editions France Agricole, Paris, 254 p.
- Mauries M., 2003:** Luzerne culture récolte conservation utilisation, Ed, France Agricole ,p 23. Cultures fourragères irriguées au Maroc, INRAA, Rabat, 28 p.
- Mohamed T*, Selma B & Fatiha AID3., 2014:** Effets des stress hydrique et osmotique sur l'accumulation de proline et de malondialdehyde (MDA) chez deux variétés de colza (*Brassica napus* L.)
- Munns R, Schachtmann DP, Condon AG., 1995:** The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:561-569
- Munns R., 1993:** "Physiological processes limiting plant growth in saline soils : some dogmas and hypotheses", *Plant Cell and Environment*, 16: 15-24.
- Munns R., Termaata, 1986:** "Whole-plant responses to salinity", *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 143-160.
- Nadjai M 1973** Nutrition et alimentation des ruminants : Cas concerts Ed institut technique d'élevage, p20.
- Nadjai M., 1973:** Nutrition et alimentation des ruminants: Cas concerts. Ed. Institut Technique d'élevage, p 20.
- Nemmar, M., 1983:** "Contribution à l'étude de la résistance à la sècheresse chez les

Nouri L., 2002: Ajustement osmotique et maintien de l'activité photosynthétique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) en condition de déficit hydrique. Thèse de Magistère en Biologie végétale Univ Mentouri. Constantine. 77 p.

Ober ES, Sharp RE., 1994: Proline accumulation in maize (*Zae Mays* L.) primary roots at low water potentials.I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol***105**: 981-987

Pilot G, Gaymard F, Mouline K, Cherel I, Sentenac H., 2003: Regulated expression of Arabidopsis shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant. *Plant Mol Biol* 51: 773-787

Prasad KVS, Sharmila P, Kumar PA, Saradhi PP., 2000: transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial cod A gene enhances its tolerance to salt stress. *MolecularBreed* 6: 489-499

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

Quezel P. et Santa S., 1962: Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, Ed. centre national de la recherche scientifique (CNRS), Paris 7e. 566p.

R'him et al J. Appl. Biosci., 2013: Effet du stress salin sur le comportement physiologique et métabolique de piment

R'him et al J. Appl. Biosci., 2013: Effet du stress salin sur le comportement physiologique et métabolique de piment 23 (7), pp.553-560.

Renault J-C., 2003: La luzerne : culture- utilisation. Co édité par le GNIS, Aravalis-Institut du végétal et l'élevage.

Rengasamy P., 2010: Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Aust. J.Soil Res.* 37: 613-620 p.

Reynolds MP., A. Mujeeb-Kazi, M. Sawkins., 2005: Prospects for utilizing plantadaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity prone environments. *Ann. Appl. Biol.*, 146: 239-259.

Robert P., Thiébeau P., Coulmier D. et Larbre D., 2010: Luzerne et eau: mieux vaut prévenir que guérir. COOP de France Déshydratation.

Rochat O., 2005: Culture et utilisation de la luzerne. Association pour le développement de la culture fourragère (ADCF). Domaine de changins, 1260 Nyon.

Rupesh Ram k., 2007: Alternate methods for cultivar synthesis in Alfalfa (*Medicago sativa* L). Thèse master. Univ Kerala Agricultural University. India, p 96.),

salinisation et stratégies de prévention et réhabilitation.<http://www.ciseau.org>.

Salsac L. & Chaillou S., 1984: Nutrition azotée des végétaux : importance physiologique et écologique de la fourniture d'azote sous forme nitrique ou ammoniacal. *Bull. Soc. Ecophysiol.*, **9**, 111-128.

Savouré A., Jaoua S., Hua Xue Jun. et al., 1995: Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 372, 13-19.

Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ., 1997: Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 113: 1177- 1183

Shirokova Y, Forkutsa I, Sharafutdinova N., 2000: Use of electrical conductivity instead of soluble salts for soil salinity monitoring in Central Asia. *Irrigation and Drainage*

Siakhène, N., 1984: Effet du stress hydrique sur quelques espèces de luzerne annuelle" thèse Ing Agr, INA, El Harrach, 90 p.

Siakhène, N; 1984: « effet du stress hydrique sur quelques espèces de luzerne »

Sibole JV, Cabot C, Poschenrieder C, Barcelo J., 2003: Efficient leaf ion partitioning, an overriding condition for abscisic acid-controlled stomatal and leaf growth responses to NaCl salinization in two legumes. *Journal of Experimental Botany* 54: 2111-2119

Singh A, Prasad R., 2009: Salt stress growth and cell bound enzymes in *Archishypogea* L. seedling. *I.J.I.B.*, 7(2): 107-123.

Slatyer, R.O; 1974: "The effect of internal water status on plant growth development

Soltner D 1988 : les grandes productions végétales céréales plantes sarclées prairies E science et techniques agricole Paris 464p.

Soltner, D., 1999: Les grandes productions végétales " 19ème édition, Sciences et techniques agricoles, p.464

Spollen WG, LeNoble ME, T.D. S, Bernstein N, Sharp RE., 2000: Absciscic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* 122: 967-976

Spollen WG, LeNoble ME, T.D. S, Bernstein N, Sharp RE., 2000: Absciscic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol* 122: 967-976

Termaat A., Passora J.B., Munns., 1985: R., Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl affected wheat and barley, *Plant Physiol.* 77 869–872.

Thiebeau P., Justes E. et Vanloot P., 2001: Filière luzerne en France. Des atouts en faveur de l'environnement. *Perspectives Agricoles* - n°266 - mars 2001. 32-36.

Thiebeau P., Pamaudeau V. et Guy P., 2003: Quel avenir pour la luzerne en France et en Europe. *Le courrier de l'environnement de l'INRA* n°49, juin 2003. 29-46.

Turan MA, Turkmen N, Taban N., 2007: Effect of NaCl on stomatal resistance and proline, chlorophyll, Na, Cl and K concentrations of lentil plants. *J.Agron.*, 6(2): 378-381.

Waligora C., 2010: Introduire la luzerne. De l'azote en quantités industrielles. *Technique. Cultivar-mars.* 42-45.

Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, crosby W, Fowke LC., 1993: ICK1, a cyclin dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid *plant J*15: 501-510

Winicov II, Bastola DR., 1999: Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol*120: 473-80

Wu Y, Spollen WG, Sharp RE, Hetherington PR, Fry SC., 1994: Root growth maintenance at low water potentials increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol*106: 607-615

Yeo AR, Flowers TJ., 1986: Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol***13**: 163-173

Zahrn HH., 1997: Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline

Zhang HX, Blumwald E., 2001: Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech* 19: 765-768

Zhang J, & Kirkham M.B., 1994: Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. *Plant and Cell Physiology*, 35, 785-791.

Zhu B, Su J, Chang MC, Verma DPS, Fan YL, Wu R., 1998: Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Sci* 139: 41-48

Zhu JK., 2002: Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol***53**: 247-273

Zhu JK., 2003: Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in plant biology* 6: 441-445