

Effet de la modification du contexte azoté sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines de saison fraîche

Michel Guarinoni

► **To cite this version:**

Michel Guarinoni. Effet de la modification du contexte azoté sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines de saison fraîche . Agronomie. 2017. dumas-01635612

HAL Id: dumas-01635612

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01635612>

Submitted on 15 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS
OUEST

- CFR Angers
 CFR Rennes



Année universitaire : 2016 - 2017

Spécialité : Ingénieur Agronome

Spécialisation / option :

Sciences et Productions Végétales (SPV) /
Ingénierie des Agrosystèmes

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Effet de la modification du contexte azoté sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines de saison fraîche

Par : Michel GUARINONI

Soutenu à Rennes, le 13 septembre 2017

Devant le jury composé de :

Président : Matthieu CAROF

Autres membres du jury : Virginie PARNAUDEAU

Maître de stage : Michel Edmond GHANEM

Enseignant référent : Safya MENASSERI

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible ⁽¹⁾.

Date et signature du responsable de stage ⁽²⁾ : 14 septembre 2017 

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur ⁽³⁾ Nom Prénom Guarinoni Michel
autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-BY-NC-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur : 14 septembre 2017 

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Merci à toutes les personnes qui m'ont accompagné au cours de ce stage. Notamment à Michel et Hélène, mes encadrants, pour leurs conseils, leurs connaissances, leurs avis éclairés, et surtout leur gentillesse. J'ai sincèrement apprécié ce stage sous leur direction.

Je remercie mes parents, mes amis, et Pierre pour leur soutien et leurs visites au Maroc, qui m'ont permises de découvrir (encore plus !) ce beau pays. Chefchaouen, Merzouga, Aït Ben Haddou et le Djebel Toubkal n'auraient pas été les mêmes sans eux...

Merci à l'Agence Universitaire de la Francophonie pour son soutien financier.

Evidemment, un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de physiologie végétale de l'ICARDA de Rabat, notamment à Sara, Amal, et Alice, pour tous ces chebakias partagés et savourés !

شكرا جزيلاً

Table des matières

Remerciements	
Table des figures.....	
Table des tableaux	
Table des annexes	
Introduction	1
I) Etat de l'art.....	2
A) Méthode de culture et d'inoculation de légumineuses en hydroponie	2
B) La fixation symbiotique du diazote atmosphérique.....	2
1) Les nodules, organes de fixation du diazote atmosphérique	2
2) Fonctionnement cellulaire et coût énergétique de la symbiose pour la plante hôte	3
3) Les effets d'un apport transitoire de nitrate sur la fixation biologique de l'azote	3
C) Conclusions	5
II) Objectifs du stage.....	6
III) Matériel et Méthodes	6
A) Mise au point de protocoles.....	6
1) Matériel végétal et conditions de culture	6
2) Détermination d'une solution nutritive adaptée aux légumineuses	6
3) Protocole d'inoculation	7
B) Effet du changement de la source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines	7
1) Matériel végétal.....	7
2) Conditions de culture et plan expérimental.....	7
3) Protocole de modification de la source azotée.....	8
4) Variables mesurées	8
5) Analyse statistique	9
IV) Résultats	9
A) Mise au point de protocoles.....	9
1) Solution nutritive adaptée aux légumineuses	9
2) Protocoles d'inoculation.....	9
B) Effet du changement de la source d'azote	10
1) Suivi des plants au cours de la phase de facilitation de la nodulation	10
2) Suivi des plants au cours de la phase d'exposition au nitrate	10
3) Dynamique de croissance et de développement au cours de la phase de changement de la source d'azote.....	10
4) Teneur en azote total	12
V) Discussion.....	13
A) Mise au point de protocoles.....	13
1) Solution nutritive adaptée aux légumineuses	13
2) Protocoles d'inoculation.....	13

B) Effets du changement de la source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses.....	14
1) La fixation symbiotique aboutit-elle au même état final de croissance et de développement que l'absorption racinaire ?.....	14
2) Le changement de source d'azote induit-il des modifications de la dynamique de croissance et de développement ?.....	14
3) Le changement de source d'azote implique-t-il une carence azotée ?	15
C) Perspectives et limites	17
Conclusion.....	19
Bibliographie	20
Annexes.....	

Table des figures

NB : Lorsqu'aucune source n'est mentionnée, l'illustration est une réalisation personnelle

Figure 1 : Fixation du N₂ et transformation en formes réactives dans les nodules

Figure 2 : Métabolisme des produits photosynthétiques au sein des nodules

Figure 3 : Double effet répressif du nitrate sur les nodules

Figure 4 : Schéma du montage hydroponique employé

Figure 5 : Photographie du montage hydroponique employé

Figure 6 : Plan expérimental mis en place

Figure 7 : Photographie de l'expérience, en chambre de culture

Figure 8 : Schéma explicatif du déroulement de l'expérience de modification du contexte azoté

Figure 9 : Effet de la solution nutritive sur la production de biomasse et la teneur en azote total de légumineuses testées

Figure 10 : Suivi de la nodulation des légumineuses testées après application des protocoles d'inoculation

Figure 11 : Photographies de nodules obtenus avec les protocoles d'inoculation testés

Figure 12 : Suivi de la nodulation des plants de lentille inoculés ou non au cours de la phase de facilitation de la nodulation

Figure 13 : Suivi des paramètres de croissance et de développement au cours de la phase de modification de la source d'azote (variété Bakria)

Figure 14 : Suivi des paramètres de croissance et de développement au cours de la phase de modification de la source d'azote (variété Chakkouf)

Figure 15 : Suivi de la teneur en azote total des plants de lentille au cours de la phase de modification de la source d'azote

Table des tableaux

NB : Lorsqu'aucune source n'est mentionnée, l'illustration est une réalisation personnelle

Tableau 1 : Composition des solutions nutritives testées

Tableau 2 : Composition des solutions nutritives (azotée et carencée en azote) utilisées lors du test des protocoles d'inoculation et lors de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses (Ghanem et al. 2011)

Tableau 3 : Description des traitements appliqués lors de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses

Table des annexes

NB : Lorsqu'aucune source n'est mentionnée, l'illustration est une réalisation personnelle

ANNEXE I : Protocole de stérilisation des graines de légumineuses

ANNEXE II : Description de la solution de culture pour *Rhizobiums* utilisée lors des protocoles d'inoculation

Introduction

L'année 2016 a été déclarée année internationale des légumineuses à graines par la soixante-huitième Assemblée générale des Nations Unies (FAO, 2015). Ceci montre que les légumineuses suscitent un intérêt agricole et environnemental à échelle mondiale.

Les légumineuses regroupent des végétaux appartenant à la famille des Fabacées, dont l'une des caractéristiques anatomique est la fructification sous forme de gousses (Aykroyd, Doughty, 1964). Toutefois, dans ce rapport, nous nous limitons aux légumineuses de saison fraîche (lentille et pois chiche particulièrement) (Stoddard et al., 2006).

Les légumineuses ont la particularité de pouvoir fixer le diazote (N_2) atmosphérique. Cette particularité repose sur une possibilité d'association symbiotique entre une légumineuse et des bactéries fixatrices d'azote, naturellement présentes dans le sol, du genre *Rhizobium* principalement (Masson-Boivin et al., 2009 ; Murray et al., 2016). Toutefois, il est également reconnu que dans un contexte de fertilisation azotée, les légumineuses privilégient un prélèvement de l'azote du sol, plutôt que de l'azote atmosphérique (Streeter, Wong, 1988 ; Jeudy et al., 2010), rendant improbable la réalisation de ces deux phénomènes en parallèle. Certains scientifiques considèrent qu'il peut être bénéfique de réaliser un apport azoté précoce sur les cultures de légumineuses (Mahon, Child, 1979 ; Clayton et al., 2004), bien que l'on connaisse mal les effets d'une exposition au nitrate sur la reprise de la fixation du N_2 atmosphérique. Nous voulons notre démarche assez proche de ce qu'il se passerait naturellement dans ce contexte. Donc contrairement à ce qui a été fait dans la bibliographie, c'est-à-dire l'observation des effets d'un apport azoté à des plantes fixant le N_2 (Jensen, 1986 ; Fujikake et al., 2002 ; Voisin et al., 2003 ; Naudin et al., 2011), nous nous intéressons à l'effet de l'arrêt d'un apport de nitrate sur des plantes en mesure de fixer le diazote atmosphérique.

Ce mémoire de fin d'études tente d'apporter des éléments de réponse à la question des effets de la modification de la source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines, et éventuellement évoquer la question d'un possible stress azoté chez les légumineuses, principalement lors du passage d'une source d'azote à une autre.

Ce mémoire se divise en quatre parties. Une première partie est consacrée à une étude bibliographique, une seconde partie traite du matériel et méthodes. La troisième partie est consacrée à l'étude de nos résultats, qui seront discutés et confrontés à la bibliographie dans une quatrième partie.

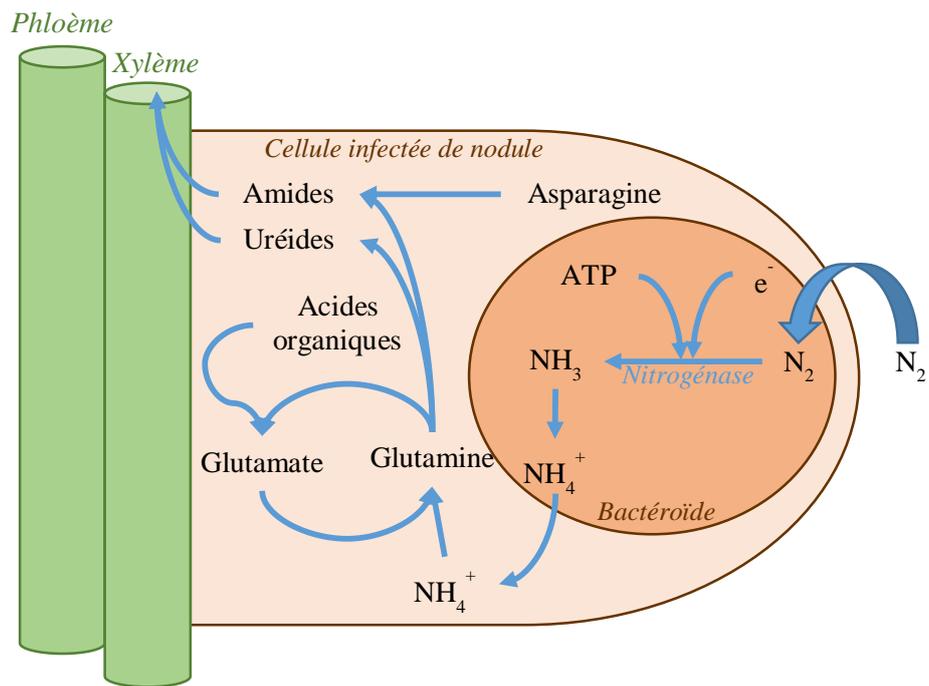


Figure 1 - Fixation du N_2 et transformation en formes réactives dans les nodules (adapté de Becana et Sprent, 1987)

I) Etat de l'art

A) Méthode de culture et d'inoculation de légumineuses en hydroponie

La culture expérimentale de légumineuses en hydroponie est assez courante, toutefois, peu de solutions nutritives spécifiques aux légumineuses ont été décrites. De nombreux travaux font appel à des solutions nutritives initialement destinées à d'autres cultures (Lauter, Munns, 1986 ; Tavori et al., 2004 ; Flowers et al., 2010) notamment la tomate (Tavori et al., 2004). Bien qu'il existe des références concernant la composition de solution nutritives, cette dernière peut varier en complexité, allant de 6 composés (Rigaud, Puppo, 1975) à 17 (Khan et al., 2015), et en teneurs en éléments ((Khan et al., 2015 ; Samineni et al., 2011). En outre, la vérification de l'équilibre des charges ioniques n'est jamais mentionnée. Dans la plupart des cas, la culture hydroponique n'est que transitoire (2 à 3 semaines), et ne s'étend pas sur toute la durée du cycle de culture des légumineuses (Ralston, Imsande, 1983).

Afin de favoriser la fixation symbiotique du N_2 atmosphérique et la survie à long terme des plants, la solution nutritive employée dans le dispositif hydroponique doit contenir tous les éléments impliqués dans la nutrition de la plante hôte et/ou du *Rhizobium* (O'hara et al., 1988). Sont considérés comme éléments essentiels à la symbiose légumineuse-*Rhizobium* : C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B (O'hara et al., 1988).

Les protocoles d'inoculation des légumineuses en phase liquide sont rares, peu répétés, et ne concernent que des inoculations pratiquées sur plants adultes. En général, les graines sont semées en terre (ou dans du sable), et inoculées par aspersion d'une solution contenant de l'inoculum bactérien puis transférées vers un dispositif hydroponique. Toutefois, un protocole d'inoculation de plants âgés cultivés en hydroponie, par trempage dans une solution de *Rhizobiums* en suspension a été décrit (Ralston, Imsande, 1983). Une autre méthode d'inoculation, consistant à verser une suspension de *Rhizobiums* directement dans une solution nutritive hydroponique dépourvue de nitrate, a également été décrite (Barker et al., 2006 ; Jeudy et al., 2010).

B) La fixation symbiotique du diazote atmosphérique

1) Les nodules, organes de fixation du diazote atmosphérique

La fixation biologique de l'azote est rendue possible par des bactéries du genre *Rhizobium*, des protéobactérie aérobies, diazotrophes, naturellement présentes dans la rhizosphère (Masson-Boivin et al., 2009). Les *Rhizobiums* induisent la formation de nodules racinaires où a lieu la symbiose, ainsi que la fixation et l'assimilation du diazote atmosphérique. Ces nodules renferment des *Rhizobiums* qui ont subi une forte différenciation en bactéroïdes. Les bactéroïdes sont des formes capables de fixer le diazote au sein des nodules (Geddes, Oresnik, 2016).

Dans les nodules, la fixation du N_2 atmosphérique est possible grâce à une enzyme nitrogénase bactérienne (Masson-Boivin et al., 2009) associée à une nitrogénase réductase. La nitrogénase catalyse la réduction du N_2 en ammoniac (NH_3) (Figure 1). Le NH_3 est ensuite transformé au sein du bactéroïde en ammonium (NH_4^+), qui est la forme de transfert entre le bactéroïde et le nodule (Udvardi, Poole, 2013). L'activité de la nitrogénase est fortement inhibée par la présence d' O_2 . Les cellules des nodules contiennent de la leghémoglobine, une protéine soluble, fixatrice de dioxygène. La leghémoglobine permet de contrôler le flux d' O_2 vers les bactéroïdes (Appleby, 1984).

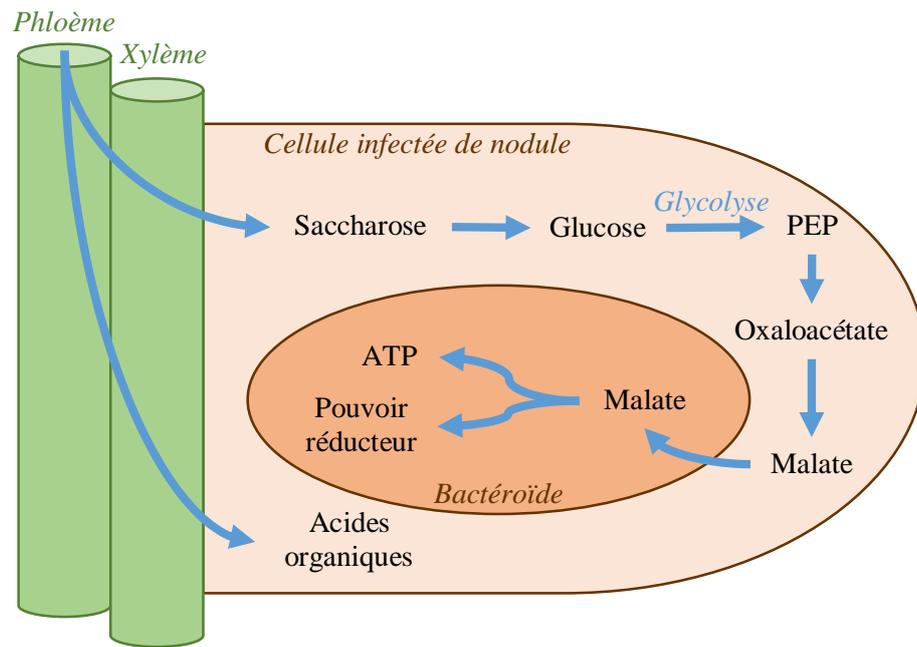


Figure 2 - Métabolisme des produits photosynthétiques au sein des nodules (adapté de Becana et Sprent, 1987)

2) Fonctionnement cellulaire et coût énergétique de la symbiose pour la plante hôte

Le métabolisme des bactéroïdes est dépendant de celui de la plante hôte, apportant le carbone organique nécessaire à la fixation du diazote. La fixation du N_2 , transformé en NH_3 est opérée lors de la réaction suivante, coûteuse en énergie : $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ATP + 16P_i$ (Geddes, Oresnik, 2016). Les molécules d'ATP et les électrons (pouvoir réducteur) sont fournis par l'oxydation des glucides (saccharose, glucose) et des acides organiques (malate, succinate et glutamate) issus de la photosynthèse (Figure 2). Le NH_3 est ensuite transformé en NH_4^+ , qui sert à la production d'uréides et d'amides (Figure 1). Ces derniers étant les formes de transfert, dites « réactives » (White et al., 2007), de l'azote depuis les nodules, à destination de la plante hôte (Becana, Sprent, 1987). La distribution des acides organiques aux nodules se fait par les vaisseaux conducteurs du phloème (Gordon et al., 1999), les produits azotés de la fixation symbiotique sont exportés vers la plante via le xylème (Becana, Sprent, 1987).

Une désactivation de l'activité des nodules, par une exposition de courte durée au NO_3^- , entraîne une réallocation immédiate du carbone vers la plante (Naudin et al., 2011). Ceci suggère que le développement des nodules est un processus nécessitant en carbone, et qui a lieu aux dépens de la croissance des organes aériens aux stades précoces (Voisin et al., 2002 ; Naudin et al., 2011). Ainsi, les nodules qui fixent activement le diazote atmosphérique constituent d'importants puits, détournant une grande portion des produits de la photosynthèse (plus de 25% de la production nette) (Minchin et al., 1981). Ce carbone récemment assimilé assurerait l'alimentation des nodules en composés carbonés, mais aussi l'entretien de ces derniers (Minchin et al., 1981 ; Witty et al., 1983). Notons que les nodules ne présentent aucun tissu de réserves, ce qui rend les bactéries qui y sont présentes constamment dépendantes de leur hôte (Kouchi et al., 1986).

3) Les effets d'un apport transitoire de nitrate sur la fixation biologique de l'azote

a) Effets du nitrate sur la nodulation

Du point de vue de la nodulation, la présence de NO_3^- en forte concentration (>10mM) dans le sol affecte l'association symbiotique entre la luzerne et les *Rhizobiums*, notamment en altérant le développement des nodules, ce qui entraîne une diminution de la fixation du N_2 (Zancarini et al., 2012). De manière plus générale, un apport de NO_3^- entraîne une réponse systémique réprimant la formation de nodules et leur activité. L'application précoce de fertilisants azotés sur des cultures de légumineuses inhibe le phénomène de nodulation, en affectant toutes les étapes de cette dernière : diminution de la probabilité de liaison des *Rhizobiums*, et diminution de la déformation des poils absorbants, et diminution du nombre de succès d'infections (Streeter, Wong, 1988). Selon le contexte azoté, les transporteurs de composés azotés sont en mesure d'initier une cascade de réponses, par l'intermédiaire de phytohormones (auxine, cytokinines, gibbérellines, acide abscissique), augmentant ou réprimant la nodulation et l'activité des nodules (Murray et al., 2016), et modulant ainsi le nombre de nodules et leurs masses (Streeter, Wong, 1988). L'effet de l'apport de nitrate sur la nodulation dépend du stade phénologique au cours duquel il est réalisé. Un apport de nitrate au cours de la phase végétative d'une légumineuse inoculée coïncide avec la période de croissance et d'initiation des nodules, et se traduit par une réduction de ces phénomènes. Alors qu'un apport de nitrate effectué au cours de la floraison ou du remplissage des grains coïncide avec une période au cours de laquelle le nombre et la taille des nodules n'augmentent plus, et se traduit donc par une diminution de la biomasse de nodules alors que le nombre de ces derniers reste

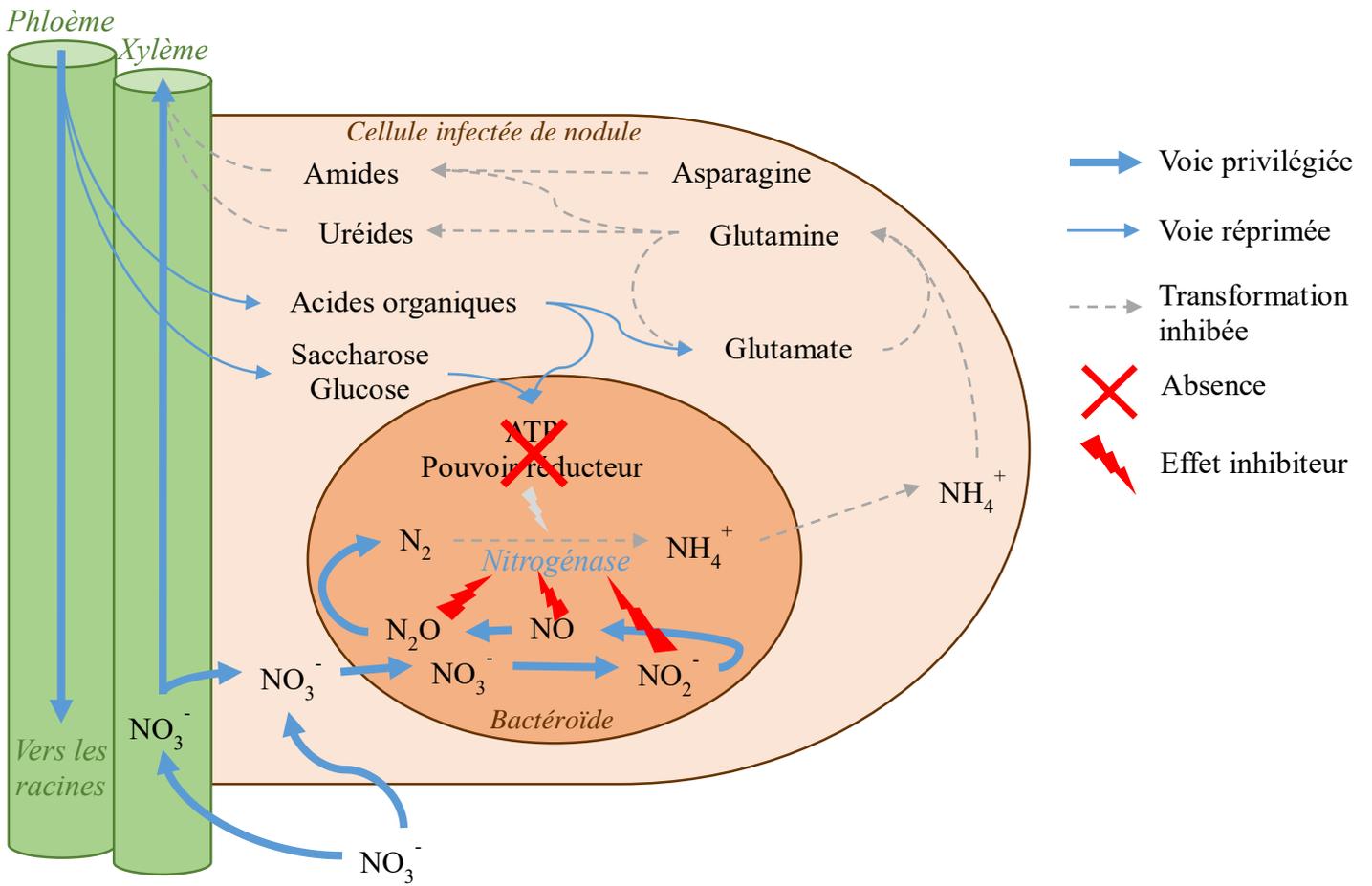


Figure 3 - Double effet répressif du nitrate sur les nodules

constant (Streeter, Wong, 1988).

Inversement, un arrêt de l'apport de nitrate induit une réponse racinaire et systémique influençant le développement des nodules en faveur d'un prélèvement du N₂ atmosphérique (pour des plantes inoculées) (Jeudy et al., 2010). Si la privation de nitrate est prolongée, la croissance des nodules existants est accrue, puis de nouveaux nodules sont générés. Avant le développement *de novo* de nodules, il y a une réallocation des produits photosynthétiques préférentiellement vers les racines, plutôt que vers les organes aériens (Jeudy et al., 2010).

b) Effets du nitrate sur l'activité des nodules

Une exposition au NO₃⁻ a également un effet sur l'activité des nodules. Cet effet varie selon la concentration en NO₃⁻, la durée de l'exposition, et le stade de développement au cours duquel elle survient (Naudin et al., 2011). Globalement, lors d'une exposition à du NO₃⁻, la fixation biologique du N₂ est diminuée (Norhayati et al., 1988 ; Voisin et al., 2002), voire supprimée, quelle que soit sa concentration, sa durée, et le stade phénologique (Oghoghorie, Pate, 1971 ; Streeter, Wong, 1988). Indépendamment du stade de développement, une exposition au nitrate induit aussi une diminution de l'activité enzymatique (nitrogénase principalement) des nodules (Streeter, Wong, 1988), ce qui perturbe le métabolisme de ces derniers (Neo, Layzell, 1997). Ceci a pour conséquences une diminution de la fixation du N₂ et une dégénérescence des nodules où les bactéroïdes ne sont plus actifs, car plus alimentés en composés photosynthétiques. Ces phénomènes sont dus à une réallocation des produits carbonés de la photosynthèse vers les racines plutôt que vers les nodules, ce qui favorise l'absorption racinaire du NO₃⁻ et désavantage la fixation symbiotique du N₂ (Francisco, Akao, 1993 ; Fujikake, 2003 ; Naudin et al., 2011).

L'effet négatif du NO₃⁻ sur les nodules est donc double (Figure 3). D'une part, les nodules ne sont plus alimentés en composés photosynthétiques, et d'autre part, l'activité enzymatique des nodules est inhibée. Cependant, (Fujikake, 2003) rapporte que dans des cas de stress nitraté précoce, de faible intensité et de courte durée, la fixation du N₂ serait accrue après la suppression du NO₃⁻.

c) Le rétablissement de la nodulation et de l'activité des nodules après une exposition au nitrate

Le rétablissement de l'activité spécifique des nodules après la suppression du NO₃⁻ varie selon le stade végétatif au cours duquel le stress nitraté est appliqué, ainsi que selon la durée et l'intensité de ce stress. Chez le Soja, une exposition modérée au NO₃⁻ (5mM), de courte durée, en début de cycle, entraîne une diminution de la croissance des nodules, qui reprend rapidement après la suppression du stress nitraté (Fujikake, 2003). Selon les cas, les nodules peuvent avoir été plus ou moins endommagés (amincissement des parois endodermiques) (Streeter, Wong, 1988). Par conséquent, le délai de regain de l'activité des nodules dépendra de la vitesse de reprise de l'activité enzymatique, de l'endommagement des nodules, et de la capacité de génération de nouveaux nodules fonctionnels (Voisin et al., 2003). A l'échelle de la plante entière, l'application de NO₃⁻ entraîne un changement de la composition de la sève élaborée, influençant l'activité des nodules. Toutefois, si un regain de l'activité enzymatique est régulièrement constaté, peu d'informations abordent la question du délai de regain d'une activité enzymatique optimale, n'impliquant pas de retard de croissance ou de développement, après une exposition au nitrate.

d) Conséquences agronomiques

De nombreuses études s'accordent sur le fait qu'un apport précoce de NO_3^- sur des légumineuses conduirait à de meilleurs rendements. Ceci est expliqué par le fait que cet apport de NO_3^- augmente significativement la production précoce de biomasse aérienne. Les légumineuses ont alors une surface photosynthétique plus importante, qui permet de produire davantage de produits carbonés utilisables par les nodules, une fois le nitrate du sol totalement consommé (Rigaud, 1981 ; Fujikake et al., 2002). Une autre étude avance que l'application précoce de fertilisant azoté ne serait que peu bénéfique (McKenzie et al., 2001). Pour certains, la fixation symbiotique du N_2 atmosphérique ne permet pas une production de biomasse et une accumulation d'azote aussi importantes qu'en contexte de fertilisation azotée (Oghoghorie, Pate, 1971 ; Mahon, Child, 1979 ; Jensen, 1986). Parmi eux, il est avancé qu'aux stades précoces de la nodulation, les plantes privées de NO_3^- accuseraient un retard de croissance par rapport aux plantes disposant de NO_3^- (Gibson, 1966). Ce retard de croissance serait dû au délai nécessaire à l'effectivité de la fixation symbiotique, alors qu'il n'y a pas de NO_3^- dans le sol, induisant un stress azoté (Mahon, Child, 1979), ou à un coût en carbohydrate plus important de la fixation du N_2 que de l'absorption de NO_3^- (Mahon, 1977), limitant la production de biomasse.

Il est important de noter que le recours à l'absorption du NO_3^- ou à la fixation symbiotique du N_2 dépend fortement des variétés, des souches bactériennes, du stade phénologique et des facteurs environnementaux (teneur en NO_3^- , disponibilité en carbone, disponibilité en eau, température) (Becana, Sprent, 1987).

C) Conclusions

En premier lieu, en ce qui concerne la culture et l'inoculation de légumineuses en hydroponie, la bibliographie n'est pas satisfaisante. Il n'existe pas de solution nutritive spécifique aux légumineuses, et les solutions évoquées sont extrêmement variables en composition, et l'équilibre des charges ioniques n'est jamais mentionné. De même, le protocole d'inoculation consistant à verser une solution de *Rhizobium* dans une solution hydroponique ne nous semble pas satisfaisant. Effectivement, la population de *Rhizobium* n'est pas contrôlable, et des modifications de la composition de la solution nutritive pourraient survenir, sans être exclusivement imputable au développement des plants. Le protocole nécessitant de travailler sur des plants semés en terre n'est pas envisageable, puisque la composition minérale de cette dernière ne serait pas contrôlable. Le protocole consistant à tremper les racines des plants dans une suspension de *Rhizobiums* nous paraît exploitable, en subissant quelques modifications pour pouvoir être appliquée sur des graines.

En second lieu, la bibliographie aborde l'effet du changement de mode de nutrition azotée sur la croissance et le développement racinaire des légumineuses, sur le développement des nodules, sur l'activité enzymatique et sur la composition des sèves de la plante hôte. En revanche, elle aborde peu ses conséquences sur la croissance et le développement des organes aériens, et la question du délai de réactivation des mécanismes relatifs à la fixation symbiotique du N_2 après une exposition au NO_3^- , alors que certains scientifiques avancent qu'une exposition précoce à du nitrate permettrait un meilleur développement et une meilleure production de biomasse par des plantes fixant le N_2 .

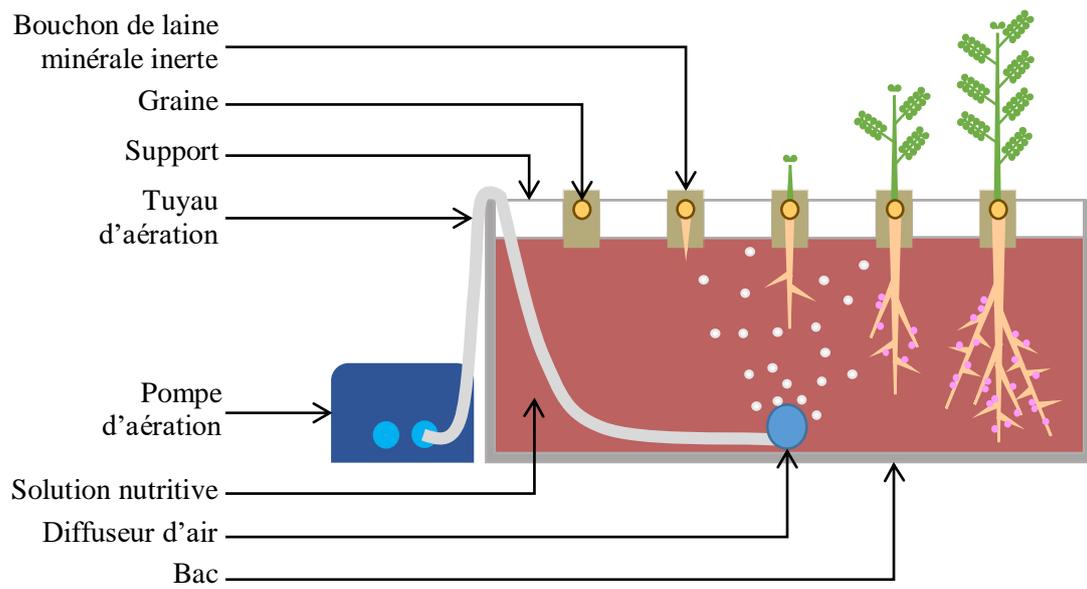


Figure 4 - Schéma du montage hydroponique employé



Figure 5 - Photographie du montage hydroponique employé

II) Objectifs du stage

Compte tenu de la bibliographie, nous nous fixons comme objectifs de répondre aux questions suivantes :

- 1) Quelle solution nutritive utiliser pour cultiver des légumineuses en hydroponie, et comment réaliser une inoculation effective en phase liquide ?
- 2) Quels sont les effets d'un changement de source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines ?
 - a. Pour des plantes ayant le même niveau de développement, la fixation symbiotique du N₂ atmosphérique permet-elle d'atteindre le même niveau de croissance et de développement que l'absorption du NO₃⁻ ?
 - b. Est-ce que le changement de source d'azote induit un retard de croissance ?
 - c. Est-ce que cet éventuel retard est dû à une carence azotée ?

III) Matériel et Méthodes

A) Mise au point de protocoles

1) Matériel végétal et conditions de culture

Les essais de protocoles sont conduits sur la lentille (*Lens culinaris*) et le pois chiche (*Cicer arietinum*). Pour la lentille, nous travaillons avec la variété Bakria (inscrite au catalogue d'homologation officiel marocain en 1989 et la variété la plus cultivée au Maroc), pour le pois chiche, nous travaillons avec la variété Farihane (homologuée en 1994 et la variété la plus cultivée au Maroc).

Le montage hydroponique que nous utilisons consiste en des bacs en plastiques de 20L remplis de solution nutritive aérée par une pompe (Air pump 400, EHEIM GmbH, Deizisau, Allemagne), sur lesquels reposent des plaques métalliques en inox percées. Les trous permettent l'insertion d'une graine ou d'une plante (soutenues par un bouchon de laine minérale inerte) dans le montage (Figures 4 et 5).

Les expériences sont conduites en chambre de culture, dont les paramètres environnementaux sont fixés pour correspondre à des conditions optimales de croissance: l'humidité relative de l'atmosphère de la chambre de culture est fixée à 65% (Imtiaz et al., 2017), la température à 23°C (Singh et al., 2015), la photopériode à 14h (Rasool et al., 2013). Dans les zones exploitées de la chambre de culture, la densité de flux de photons photosynthétiques est comprise en 300 et 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les solutions nutritives sont aérées en permanence, remises à niveau tous les 2 jours, et leur pH est ajusté à 6,5 (Khan et al., 2016). Une fois par semaine, les solutions nutritives sont complètement renouvelées.

2) Détermination d'une solution nutritive adaptée aux légumineuses

Nous testons deux solutions nutritives hydroponiques, respectant les conditions décrites dans la littérature (O'hara et al., 1988) sur pois chiche et lentille. Toutes deux sont adaptées de solutions d'Hoagland et Arnon (Hoagland, Arnon, 1950), l'une décrite par (Huang et al., 1994) (Tableau 1) et l'autre par (Ghanem et al., 2011) (Tableau 1). Nous disposons de 4 bacs hydroponiques, chaque bac contenant 10 graines de l'une des deux espèces étudiées (lentille ou pois chiche), et l'une des deux solutions nutritives testées. Les solutions nutritives sont aérées et renouvelées chaque semaine, pendant 4 semaines, en chambre de culture.

Au terme de ces 4 semaines, nous évaluons la production de biomasse permise par chaque solution en mesurant la masse sèche des plants après séchage pendant 48h à 60°C, ainsi que la

Tableau 1 - Description des solutions nutritives testées sur lentille et pois chiche

Eléments	Solution décrite par (Ghanem et al. 2011)	Solution décrite par (Huang et al. 1994)
	Concentration (g/L)	Concentration (g/L)
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	82,6	118,08
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,015	0,05
FeCl ₃	0	2,4
Fe-EDDHA 6%	1,87	0
H ₃ BO ₃	0,14	0,284
KH ₂ PO ₄	27,4	0
KNO ₃	40,7	82,15
MgSO ₄ , 7H ₂ O	24,6	61,62
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0	0,099
MnSO ₄ , 5H ₂ O	0,053	0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0	1,44
NH ₄ NO ₃	8	0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,008	0,124
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,06	0,055

Tableau 2 - Description des solutions nutritives (azotée et carencée en azote) utilisées (Ghanem et al. 2011) lors du test des protocoles d'inoculation et lors de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses

Eléments	Solution N ⁺	Solution N ⁻
	Concentration (g/L)	Concentration (g/L)
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	82,6	17,9474
CaSO ₄ , H ₂ O	0	43,0425
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,015	0,015
Fe-EDDHA 6%	1,87	1,87
H ₃ BO ₃	0,14	0,14
KCl	0	26,0925
KH ₂ PO ₄	27,4	27,4
KNO ₃	40,7	5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	24,6	24,6
MnSO ₄ , 5H ₂ O	0,053	0,053
NH ₄ Cl	0	5,349
NH ₄ NO ₃	8	0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,008	0,008
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,06	0,06

teneur en azote total dans leur partie aérienne.

3) Protocole d'inoculation

Nous utilisons un protocole destiné à l'inoculation de racines de soja cultivé en hydroponie (Ralston, Imsande, 1983), que nous avons modifié de façon à pouvoir réaliser une inoculation de graines, dite inoculation « précoce », ainsi qu'une inoculation de racines sur plants âgés de 3 semaines, dite « tardive ».

Une solution de culture de *Rhizobiums* est préparée (Annexe 1). Elle contient un mélange de souche de *Rhizobium leguminosarium* spécifique à la lentille et de 3 souches de *Rhizobiums*, non spécifiques mais récupérées dans le sol d'une parcelle de pois chiche non fertilisée.

Pour l'inoculation précoce, les graines sont stérilisées (Annexe 2), après avoir été hydratées à l'eau distillée pendant 24h, puis sont inoculées par immersion dans la solution de culture de *Rhizobiums* en phase logarithmique tardive (environ 10^8 cellules/mL) pendant 24h, à 28°C, avec agitation. Pour l'inoculation tardive, des plants âgés de 3 semaines cultivés en hydroponie dans la solution nutritive adaptée (cf. Résultats III.A.1.) sont sortis du montage hydroponique, leurs racines sont rincées par 3 bains d'eau distillées successifs de 3 minutes chacun, avant d'être plongées dans la solution de culture de *Rhizobiums* avec agitation pendant 1h à 28°C. Des graines et plants témoins sont trempés dans le milieu de culture destinés aux *Rhizobiums*, non inoculé, et stérilisé.

Ainsi, dans un premier temps, 10 graines de pois chiches et 10 graines de lentilles sont disposés dans deux montages hydroponiques (1 pour chaque espèce) avec une solution nutritive dépourvue d'azote (Tableau 2). Après 3 semaines, les plantes subissent le protocole d'inoculation tardive décrit précédemment, et 10 nouvelles graines de chaque espèce subissent le protocole d'inoculation précoce, et sont placées dans 2 autres montages hydroponiques (1 pour chaque espèce) où la solution nutritive est dépourvue d'azote. Le taux de nodulation par bac hydroponique est suivi quotidiennement, une plante étant considérée comme présentant des nodules dès l'apparition d'un premier nodule visible à l'œil sur cette dernière.

B) Effet du changement de la source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines

1) Matériel végétal

L'expérience est menée sur les mêmes espèces et variétés de légumineuses que précédemment. En ce qui concerne la lentille, une variété plus récente a été ajoutée Chakkouf (homologuée en 2009) à la variété Bakria, plus ancienne. En ce qui concerne le Pois chiche, une variété plus récente a été ajoutée Arifi (homologuée en 2009) à la variété Fariahne, plus ancienne.

2) Conditions de culture et plan expérimental

Cette expérience est menée dans les mêmes conditions que précédemment. Les bacs hydroponiques (Figure 4) sont remplis avec la solution nutritive adéquate (cf. Résultats, III.A.1) carencée en azote ou non (Tableau 2), selon la modalité de chaque bac. Les plantes seront soumises à 4 traitements différents (Tableau 3).

Seize bacs hydroponiques sont disposés aléatoirement dans la chambre de culture (Figures 6 et 7). Chaque bac correspond à une combinaison des modalités de chaque traitement. Il y a 2 traitements se déclinant en 2 modalités chacun : le traitement azoté (carencé ou non-carencé en nitrate), l'inoculation des plants (inoculés ou non-inoculés). Les bacs contiennent 20 individus de la même espèce et de la même variété.

Tableau 3 - Description des traitements appliqués lors de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses

Traitement	Inoculation	Apport de nitrate	Mode de nutrition azotée associé
1	oui	oui	Absorption racinaire de nitrate
2	oui	non	Fixation symbiotique de N ₂
3	non	oui	Absorption racinaire de nitrate
4	non	non	Aucun - témoin négatif

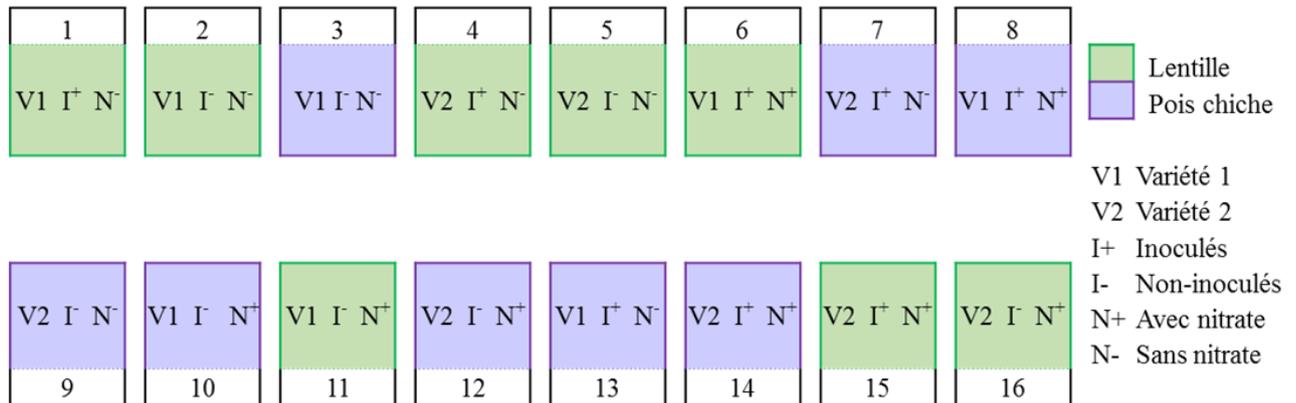


Figure 6 - Plan expérimental mis en place



Figure 7 - Photographie de l'initiation de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses

3) Protocole de modification de la source azotée

Dans un premier temps, tous les bacs hydroponiques contiennent de la solution nutritive carencée en NO_3^- (Figure 8, phase de facilitation de la nodulation). Dans un second temps, une fois que tous les individus ayant subi l'inoculation précoce présentent au moins un nodule visible à œil nu, la solution nutritive de tous les bacs est remplacée par de la solution nutritive contenant du NO_3^- (Figure 8, phase d'exposition au nitrate). Dans un troisième temps, lorsque l'exposition a effacé tout éventuel retard de croissance, les solutions nutritives sont de nouveau changées (Figure 8, phase de contexte azoté différencié). Les bacs correspondant à la modalité carencée du traitement azoté sont remplis avec de la solution nutritive carencée en NO_3^- . Ceux correspondant à la modalité non-carencée du traitement azoté sont remplis avec la solution contenant du NO_3^- . Lors de ce changement de solution nutritive, les plantes qui ont subi une inoculation précoce subissent une inoculation tardive, répétée chaque semaine lors du renouvellement des solutions nutritives.

Lors de l'initiation de la phase de différenciation du contexte azoté, quatre individus exposés à chaque combinaison de modalités sont prélevés et mesurés, de même une fois par semaine, pendant 4 semaines.

4) Variables mesurées

a) Paramètres de croissance et de développement

La croissance et le développement des plants sont suivis par méthodes non destructives au cours de la phase d'exposition au nitrate. Ainsi, la hauteur de la tige principale et le nombre de feuilles émises par cette dernière sont relevés chaque semaine jusqu'à ce que les plants, inoculés ou non, ne constituent plus qu'une seule population homogène.

La réponse de la croissance des plantes à la modification du contexte azoté est évaluée par l'étude de paramètres mesurés : la hauteur de la tige principale (Namvar, Sharifi, 2011), la production de biomasse (masses aériennes fraîche et sèche), la surface foliaire (somme de l'indice de surface foliaire de chaque feuille d'un plant, par LI-3000C Portable area meter ; LICOR Biosciences - Lincoln NE, Etats-Unis) (Singh, 1991). La matière sèche est obtenue après séchage à 60°C dans une étuve pendant 48h (Zancarini et al., 2012).

En parallèle, le développement des plants est suivi par comptage du nombre de feuilles émises par la tige principale. Lors du premier et du dernier relevé, le stade de développement est déterminé grâce à l'échelle BBCH (Bayer, BASF, Ciba-Geigy, Hoechst) destinée au pois (Lancashire et al., 1991). Pour ce faire, nous évaluons la maturité des fleurs et gousses présents sur les plants lors de ces relevés. Un stade de développement moyen est estimé en arrondissant la moyenne des échelons BBCH atteints par les plants à l'entier inférieur.

b) Azote total

Afin d'apprécier la nutrition azotée des plantes, nous déterminons, lors de chaque prélèvement, la teneur en azote total dans les organes aériens par la méthode Kjeldahl (Baethgen, Alley, 1989), permettant d'obtenir la teneur en azote total dans un échantillon de 1g de manière efficace. La phase de digestion du matériel végétal a été adaptée d'autres protocoles de dosages d'azote total (Houba et al., 2004 ; Novozamsky et al., 1983), moins toxiques selon le matériel disponible au laboratoire. Nous calculons ensuite la teneur en azote total dans les plantes entières sèches en mg d'azote/plante (par le produit entre la teneur en azote total obtenue précédemment (en mg/g) et la biomasse aérienne sèche).

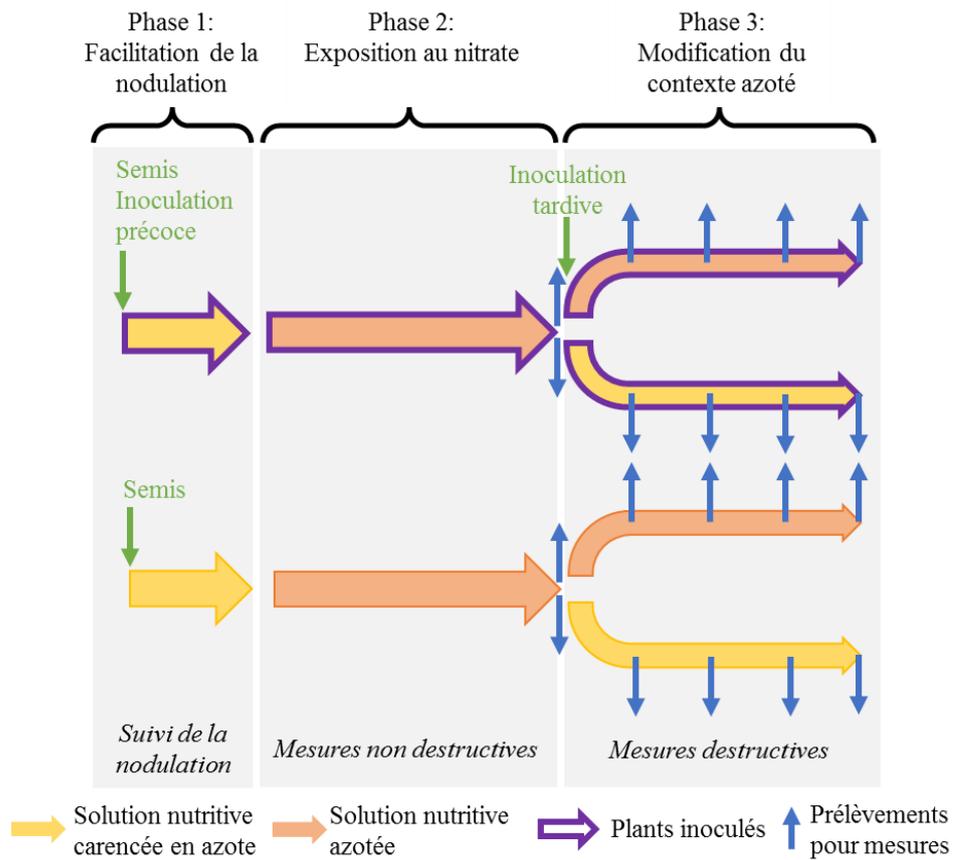


Figure 8 - Schéma explicatif du déroulement de l'expérience de modification de la source d'azote disponible aux légumineuses testées

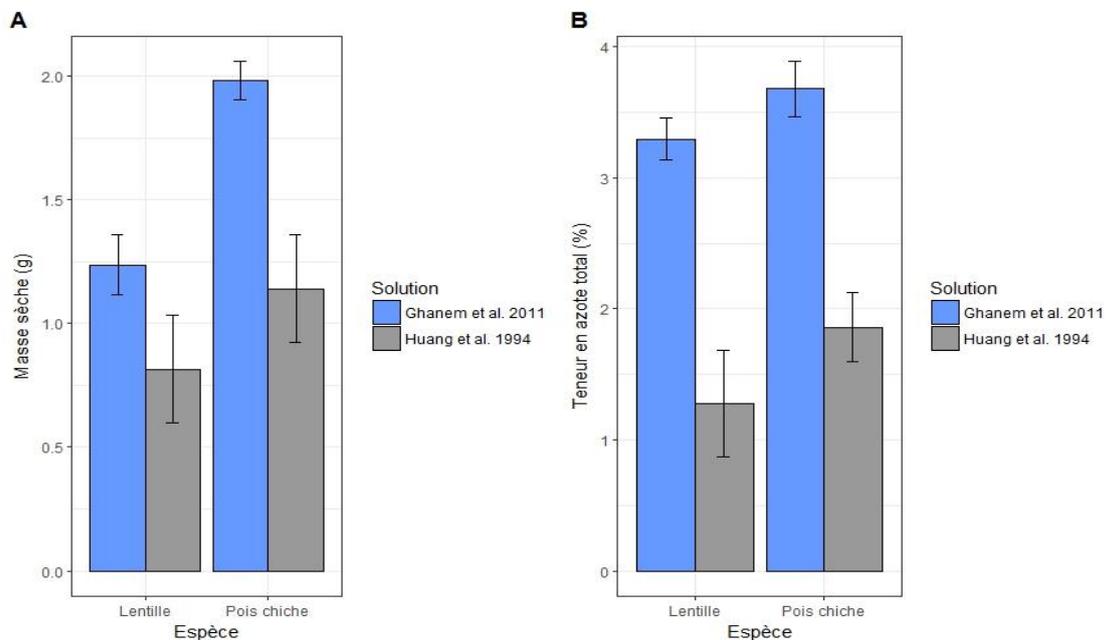


Figure 9 - Effet de la solution nutritive sur la production de biomasse et la teneur en azote total des légumineuses testées. (A) Production de biomasse aérienne sèche selon la solution testée (B) Teneur en azote total dans la partie aérienne des plants selon la solution testée

5) Analyse statistique

L'ensemble des tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2017).

Un test T de Student est appliqué aux matières sèches aériennes et aux teneurs en azote total des plantes cultivés dans les deux solutions nutritives testées, après vérification de la normalité de la distribution et de l'homogénéité des variances des variables comparées.

Afin de déterminer la date d'initiation de la phase de changement de source d'azote, il est nécessaire de montrer que l'ensemble des plants constitue une population homogène, ainsi, deux tests statistiques sont réalisés. Un test T de Student est réalisé sur la hauteur de la tige principale selon les deux modalités d'inoculation, après vérification de la normalité de la distribution de cette variable, et de l'homogénéité de sa variance. Ainsi qu'un test de χ^2 sur le nombre de feuilles émis par la tige principale selon les deux modalités d'inoculation.

Par la suite, des ANOVA, dont le seuil de significativité est fixé à 5% sont réalisées afin d'expliquer chaque variable par les combinaisons de modalités de traitement azoté et de traitement d'inoculation, avec vérification de la normalité de distribution des résidus (test de Shapiro-Wilk sur les résidus), et de l'homogénéité des variances (test de Bartlett), afin de déterminer si les combinaisons de traitements ont un effet sur les variables de croissances mesurées. Enfin, des tests de Tukey sont réalisés grâce au package "agricolae" sur R (Mendiburu, 2017), afin de déterminer si des sous populations (correspondant à certaines modalités) sont distinguables dans la population échantillonnée.

Pour le nombre de feuilles sur la tige principale (variable discrète), l'effet discriminant des modalités est étudié grâce à un modèle linéaire généralisé. S'agissant de comptages, nous leur appliquerons la fonction de lien logarithme (erreurs de type Poisson). En ce qui concerne l'étude des teneurs en azote total, s'agissant de proportion, nous leur appliquerons la fonction de lien logit (erreurs de type binomiales). Un test de Tukey est ensuite appliqué grâce au package "multcomp" sur R (Hothorn et al., 2016), permettant d'appliquer un test de Tukey après la réalisation d'un modèle linéaire généralisé.

IV) Résultats

A) Mise au point de protocoles

1) Solution nutritive adaptée aux légumineuses

La masse de matière sèche aérienne produite est significativement plus importante chez les lentilles et pois chiches cultivés dans la solution décrite par Ghanem *et al.* (2011) que dans celle décrite par Huang *et al.* (1994) (Figure 9A), observation confirmée par le test T de Student (p -value = $9,89e-5$ et $1,52e-7$ pour la lentille et le pois chiche respectivement). De même, la teneur en azote total est significativement plus importante chez les individus cultivés dans la solution décrite par Ghanem *et al.* (2011) que pour ceux cultivés dans la solution décrite par Huang *et al.* (1994) (Figure 9B), observation confirmée par le test T de Student (p -value = $6,63e-5$ et $3,49e-12$ pour la lentille et le pois chiche respectivement).

2) Protocoles d'inoculation

En ce qui concerne l'inoculation précoce (Figure 10A et 10C), les premières nodulations (Figure 11) surviennent 13 jours après l'inoculation pour la lentille, et après 20 jours pour le pois chiche. La nodulation est totale (taux de nodulation = 1) 16 jours après inoculation pour la lentille, et 27 jours après inoculation pour le pois chiche.

En ce qui concerne l'inoculation tardive (Figure 10B et 10D), les premières nodulations

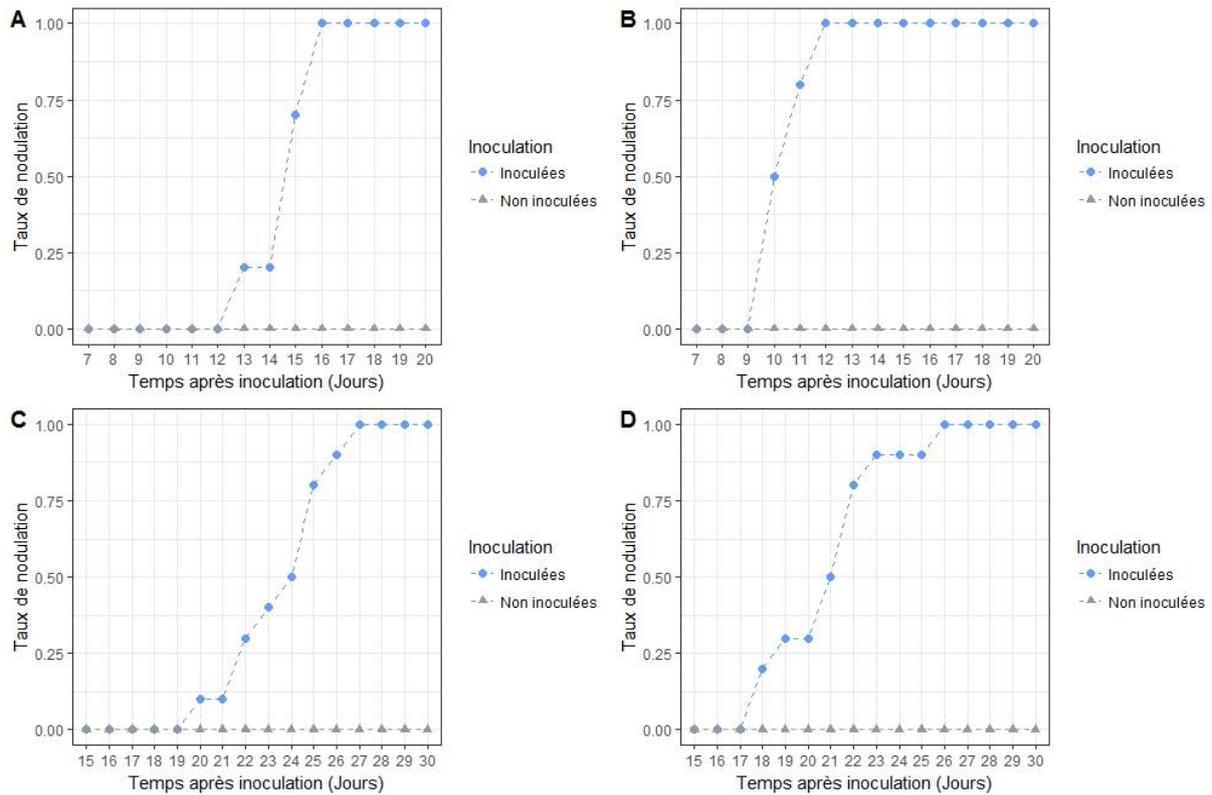


Figure 10 - Suivi de la nodulation des légumineuses testées après application des protocoles d'inoculation. (A) Suivi du taux de nodulation de lentilles ayant subi le protocole d'inoculation précoce (B) Suivi du taux de nodulation de lentilles ayant subi le protocole d'inoculation tardive (C) Suivi du taux de nodulation de pois chiches ayant subi le protocole d'inoculation précoce (D) Suivi du taux de nodulation de pois chiches ayant subi le protocole d'inoculation tardive



Figure 11 - Photographies de nodules obtenus avec les protocoles d'inoculation testés (observation à la loupe binoculaire), après 30 jours d'expérience. (A) Nodules obtenus sur lentille avec le protocole d'inoculation précoce (B) Nodules obtenus sur lentilles avec le protocole d'inoculation tardive (C) Nodules obtenus sur pois chiche avec le protocole d'inoculation précoce

surviennent 10 jours après l'inoculation des racines de lentilles, et 18 jours après l'inoculation des racines de pois chiche. La nodulation est totale 12 jours après inoculation pour la lentille, et 26 jours après inoculation pour le pois chiche.

B) Effet du changement de la source d'azote

1) Suivi des plants au cours de la phase de facilitation de la nodulation

Malgré la réussite du protocole d'inoculation lors de sa mise au point, les plants de pois chiche n'ont montré aucun signe de nodulation au cours de cette expérience. Dans la suite de ce rapport, les résultats et discussions seront présentés uniquement pour la lentille.

Pour les deux variétés de lentille, les premières nodulations surviennent 13 jours après le semis et l'inoculation précoce et la nodulation est totale (taux de nodulation = 1) dès 18 jours (Figure 12).

A la fin de cette phase, la hauteur des plants est significativement différente selon la modalité du traitement d'inoculation (T-test de Student, p -value = $3,05e-10$), les plantes inoculées étant globalement plus hautes. De même pour le nombre de feuilles émises par la tige principale (Khi^2 , p -value = 0,001), les plantes inoculées émettant globalement plus de feuilles.

2) Suivi des plants au cours de la phase d'exposition au nitrate

Après 14 jours d'exposition au nitrate, (34 jours après semis et inoculation), la hauteur des plants est significativement différente selon la modalité du traitement d'inoculation (T-test de Student : p -value < 0,001), les plants inoculés étant toujours globalement les plus hauts. En revanche, le nombre de feuilles émises par la tige principale n'est pas différent selon la modalité du traitement d'inoculation (Khi^2 : p -value = 0,02).

Après 28 jours d'exposition au nitrate (soit 48 jours après le semis), la hauteur des plants est identique qu'il y ait eu inoculation ou non (T-test de Student : p -value=0,36). Il en est de même pour le nombre de feuilles émis (Khi^2 : p -value = 0,28).

3) Dynamique de croissance et de développement au cours de la phase de changement de la source d'azote

a) Surface foliaire

En ce qui concerne la variété Bakria (Figure 13A), au cours des 8 premiers jours de traitements, la surface foliaire des plants reste constante, et l'ANOVA ne montre aucune différence significative entre les traitements. Au 15^{ème} jour de traitements, l'ANOVA montre des différences significatives entre les surfaces foliaires selon les traitements subis. Le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO_3^- , dont la surface foliaire a fortement augmenté (+1000 $cm^2.plante^{-1}$) et les autres, dont la surface foliaire est restée stable. Au-delà, le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO_3^- (dont la surface foliaire est importante et stable), les plants susceptibles de fixer le N_2 (dont la surface foliaire augmente, sans égaler celle des plants disposant de NO_3^-), et les plants dépourvus de toutes sources d'azote (dont la surface foliaire est restée constante).

Pour la variété Chakkouf (Figure 14A), l'ANOVA montre une différence significative entre les traitements dès le 8^{ème} jour de traitement et le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO_3^- (dont la surface foliaire augmente) et les plants qui en sont privés (dont la surface foliaire reste stable). Ensuite, le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO_3^- et inoculés (dont la surface foliaire est plus importante), les plants privés de toutes sources d'azote (dont la surface foliaire est stable et faible), et les plants disposant de NO_3^- non inoculés et ceux susceptibles de fixer le N_2 (dont

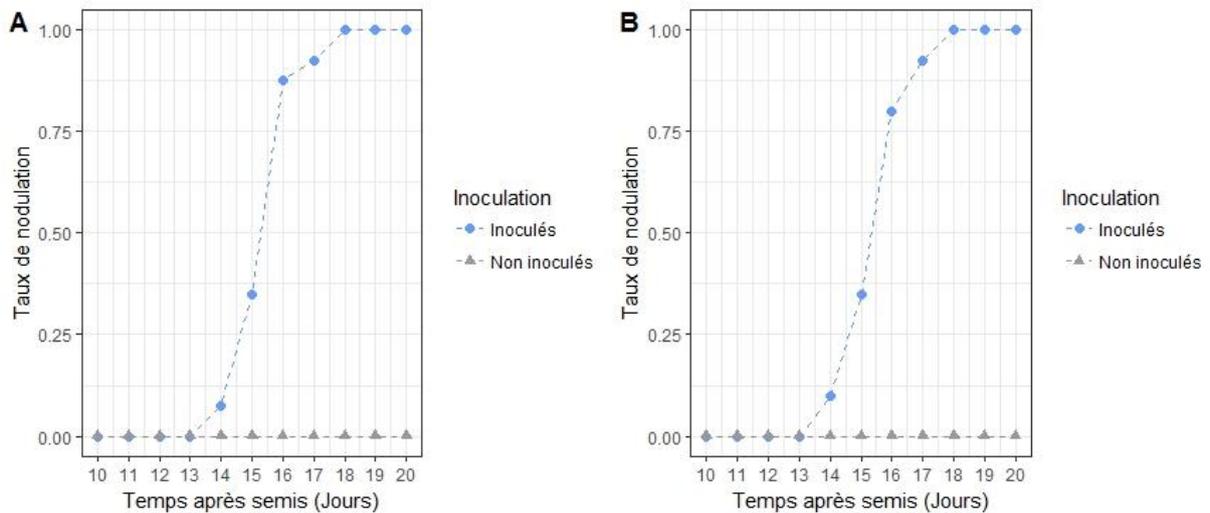


Figure 12 - Suivi de la nodulation des plants de lentille inoculés ou non au cours de la phase de facilitation de la nodulation. (A) Plants de la variété Bakria (B) Plants de la variété Chakkouf

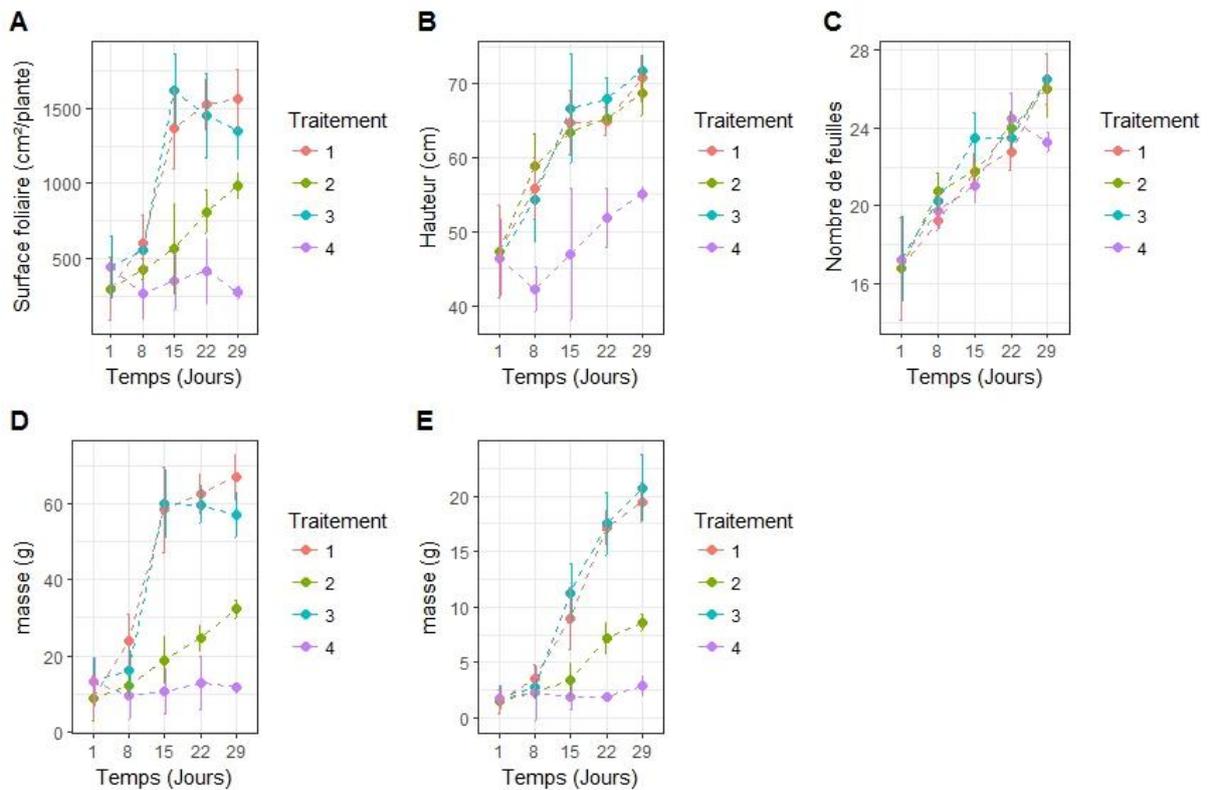


Figure 13 – Suivi des paramètres de croissance et de développement au cours de la phase de modification de la source d'azote (variété Bakria). (A) Suivi de la surface foliaire (B) Suivi de la hauteur de la tige principale (C) Suivi du nombre de feuilles émises par la tige principale (D) Suivi de la production de biomasse aérienne fraîche (E) Suivi de la production de biomasse aérienne sèche

la surface foliaire est intermédiaire aux deux autres). En fin d'expérience, le test de Tukey montre que la surface foliaire des plants disposant de NO_3^- et de ceux susceptibles de fixer le N_2 est identique (environ $1100 \text{ cm}^2 \cdot \text{plante}^{-1}$), alors que celle des plants privés de toutes sources d'azote est restée stable et faible (environ $250 \text{ cm}^2 \cdot \text{plante}^{-1}$).

b) Hauteur de la tige principale

La hauteur de la tige principale des plants de la variété Bakria (Figure 13B) est significativement différente selon le traitement subi (ANOVA) à partir du 8^{ème} jour de traitements. Le test de Tukey montre que les plants disposant de NO_3^- et ceux susceptibles de fixer le N_2 évoluent de la même manière. Leur tige principale croît fortement jusqu'au 15^{ème} jour de traitement (+20cm), puis plus faiblement ensuite (+5cm). La hauteur de la tige principale des plants privés de toutes sources d'azote augmente peu tout au long du traitement (+5cm).

En ce qui concerne la variété Chakkouf (Figure 14B), l'ANOVA indique un effet significatif du traitement subi sur la hauteur de la tige principale dès le 8^{ème} jour de traitement. A cette date, le test de Tukey montre une différence entre les plants disposant de NO_3^- (dont la hauteur de la tige augmente) et plants qui en sont privés (dont la hauteur reste stable). A partir du 15^{ème} jour, le test de Tukey montre que les plants disposants de NO_3^- et ceux susceptibles de fixer le N_2 évoluent de la même façon d'une part (tige plus grande : plus de 70cm) et que les plants privés de toutes sources d'azote évoluent de manière différente d'autre part (hauteur de tige stable, et faible: 50cm).

c) Production de biomasse aérienne

La biomasse aérienne fraîche produite par les plants de la variété Bakria (Figure 13D) est significativement différente selon le traitement subi à partir du 8^{ème} jour de traitements (ANOVA). Le test de Tukey montre que les plants disposant de NO_3^- et ayant été inoculés ont produit plus de biomasse aérienne que les autres, dont la biomasse aérienne fraîche est restée constante. Au 15^{ème} jour de traitements, le test de Tukey montre que la biomasse aérienne fraîche des plants disposant de NO_3^- (60g) est significativement différente de celle des plants privés de NO_3^- , qui est restée plutôt stable et faible. Au-delà du 22^{ème} jour de traitements, le test de Tukey montre des différences entre la biomasse aérienne fraîche des plants disposant de NO_3^- (stable autour de 60g), la biomasse aérienne fraîche des plants privés de toutes sources d'azote (restée stable autour de 10g), et la biomasse aérienne fraîche des plants susceptibles de fixer le N_2 (environ 30g), qui a augmenté, sans égaler celle des plants disposant de NO_3^- .

Pour la biomasse aérienne sèche des plants de cette variété (Figure 13E), l'ANOVA ne montre aucune différence significative entre les traitements jusqu'au 8^{ème} jour de traitements. Au 15^{ème} jour de traitements, l'ANOVA est significative, et le test de Tukey montre des différences significatives entre les plants disposant de NO_3^- (dont la masse sèche augmente : +7g), et les plants qui en sont privés (dont la masse sèche reste constante : environ 2,5g). Au-delà de cette date, le test de Tukey indique une différence significative entre la biomasse aérienne sèche des plants disposant de NO_3^- (qui augmente et atteint 20g en fin d'expérience), la biomasse des plants privés de toutes sources d'azote (constante, faible: 2,5g), et les plants susceptibles de fixer le N_2 dont la production de biomasse aérienne sèche est intermédiaire: environ 8g).

La biomasse aérienne fraîche des plants de la variété Chakkouf (Figure 14D) est significativement différente selon le traitement subi à partir du 8^{ème} jour de traitements (ANOVA). A cette date, le test de Tukey montre une différence significative entre les plants

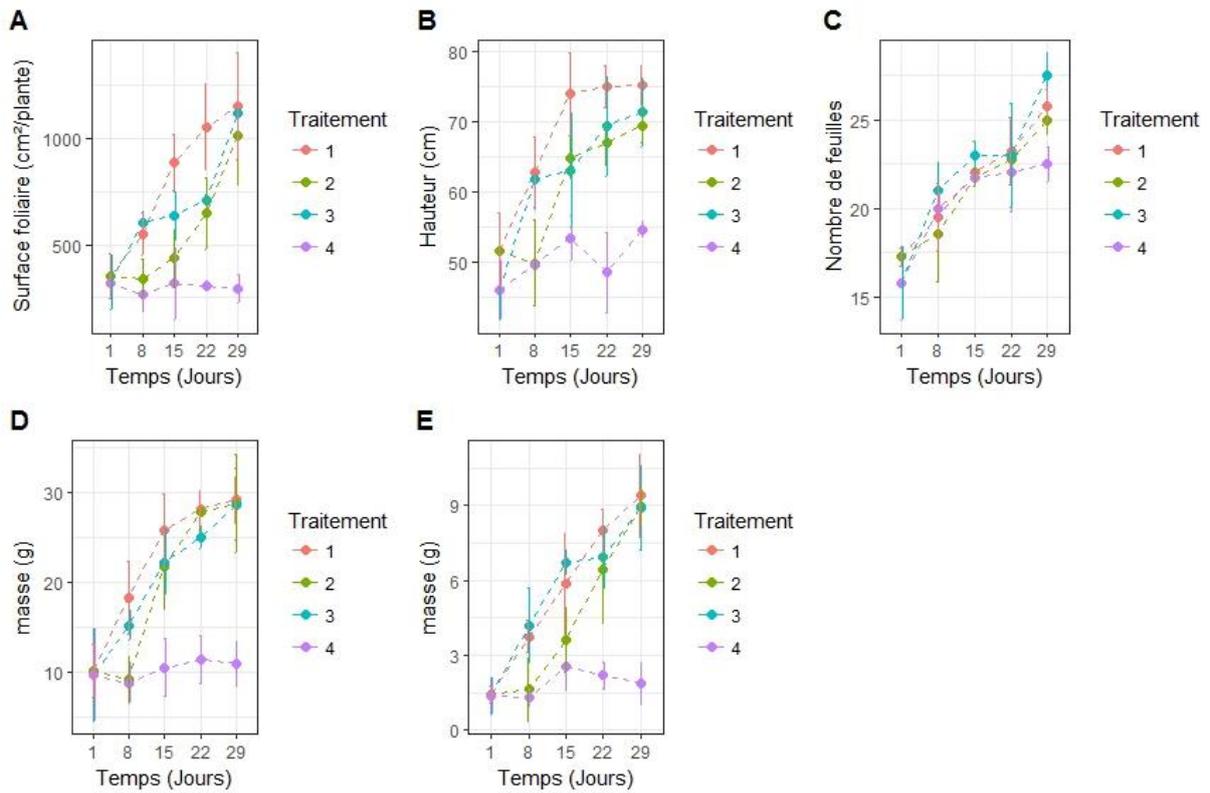


Figure 14 – Suivi des paramètres de croissance et de développement au cours de la phase de modification de la source d'azote (variété Chakkouf). (A) Suivi de la surface foliaire (B) Suivi de la hauteur de la tige principale (C) Suivi du nombre de feuilles émises par la tige principale (D) Suivi de la production de biomasse aérienne fraîche (E) Suivi de la production de biomasse aérienne sèche

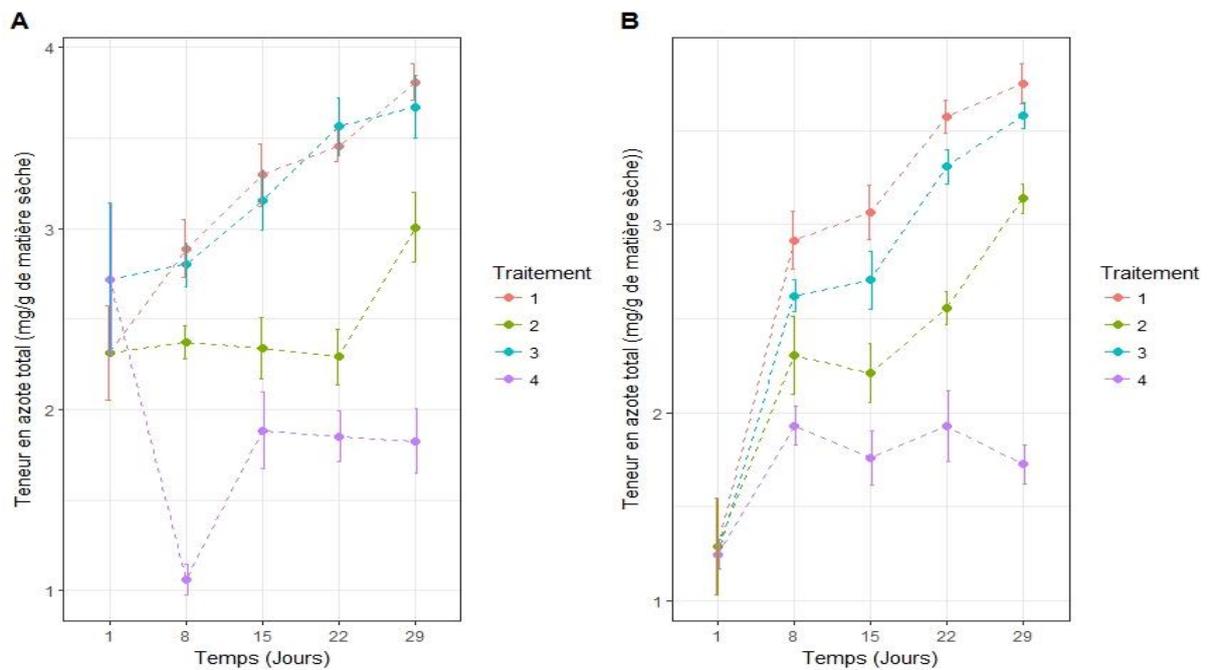


Figure 15 – Suivi de la teneur en azote total des plants de lentille au cours de la phase de modification de la source d'azote. (A) Pour la variété Bakria (B) Pour la variété Chakkouf

disposant de NO_3^- (dont la biomasse aérienne fraîche augmente atteint 16g) et ceux qui en sont privés (dont la biomasse aérienne fraîche n'augmente pas). A partir du 15^{ème} jour de traitements, le test de Tukey indique que les biomasses aériennes fraîches des plants disposant de NO_3^- et de ceux susceptibles de fixer le N_2 ne sont pas significativement différentes entre elles (masses élevées, supérieures à 20g, puis proches de 30g en fin d'expérience), mais sont significativement différentes de la biomasse aérienne fraîche des plants privés de toutes sources d'azote (restée constante tout au long du traitement, autour de 10g).

Pour la biomasse aérienne sèche des plants de cette variété (Figure 11E), l'ANOVA montre un effet significatif du traitement dès le 8^{ème} jour d'expérience. A cette date, le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO_3^- (dont la biomasse aérienne sèche augmente : +3g), et les plants qui en sont privés (dont la biomasse aérienne reste stable : 1,5g). A partir du 22^{ème} jour de traitements, le test de Tukey montre que les biomasses aériennes sèches des plants disposant de NO_3^- et de ceux susceptibles de fixer le N_2 ne sont pas significativement différentes entre elles (masses élevées, supérieures à 6g, puis d'environ 9g en fin d'expérience), mais sont significativement différentes de la biomasse aérienne sèche des plants privés de toutes sources d'azote (restée constante et faible).

d) Nombre de feuilles et stade de développement

Quelle que soit la variété, le nombre de feuilles émises par la tige principale des plants (Figures 13C et 14C), augmente de manière constante et similaire quel que soit le traitement subi (modèle linéaire généralisé non significatif), passant d'environ 17 feuilles en moyenne au début des traitements à environ 26 en fin d'expérience pour la variété Bakria, et à environ 26 feuilles pour la variété Chakkouf. En fin d'expérience, le modèle linéaire généralisé montre une différence significative entre les traitements, et le test de Tukey indique que les plants privés de toutes sources d'azote enregistrent un plus faible nombre de feuilles émises (23 pour Bakria et 22 pour Chakkouf).

En ce qui concerne le stade de développement atteint en fin d'expérience (Tableau 4), quelle que soit la variété, l'échelon BBCH atteint par les plants disposant de nitrate et par ceux susceptibles de fixer l'azote atmosphérique est le même (échelon 75, soit : 50% des gousses ont atteint leur longueur finale et les grains sont gonflés). En revanche, les plants privés de toutes sources d'azote présentent un retard, atteignant l'échelon 73 (soit : 30% des gousses ont atteint leur longueur finale et les grains sont gonflés) pour la variété Bakria, et l'échelon 65 (soit : 50% de fleurs ouvertes et peu de gousses formées) pour la variété Chakkouf.

4) Teneur en azote total

Au début de la phase de traitements, quelle que soit la variété, le modèle linéaire généralisé ne montre pas de différences significatives entre les teneurs en azote total des plants subissant les différents traitements (Figure 15). En ce qui concerne la variété Bakria (Figure 15A), le modèle linéaire généralisé expliquant la teneur en azote total des plants par les traitements subis est significatif à partir du 8^{ème} jour de traitements. Le test de Tukey montre des différences significatives entre les plants disposant de NO_3^- (traitements 1 et 3) (dont la teneur en azote total est d'environ 2,75 mg.g^{-1} de matière sèche), les plants susceptibles de fixer le N_2 atmosphérique (traitement 2) (dont la teneur en azote total est constante, à environ 2,3 mg.g^{-1} de matière sèche), et les plants privés de toutes sources d'azote (traitement 4) (dont la teneur en azote total a fortement baissé à près de 1 mg.g^{-1}). Entre le 8^{ème} et le 22^{ème} jour de traitements, la teneur en azote total des plants disposant de NO_3^- continue d'augmenter fortement, et de

manière constante, passant de 2,75 à 3,5 mg.g⁻¹ de matière sèche. La teneur en azote total des plants susceptibles de fixer le N₂ est restée constante, autour de 2,75 mg.g⁻¹ de matière sèche. La teneur en azote total des plants privés de toutes sources d'azote a augmenté, atteignant environ 1,8 mg.g⁻¹ de matière sèche. Le test de Tukey montre une différence significative entre les plants disposant de NO₃⁻, ceux susceptibles de fixer le N₂ et ceux privés de toutes sources d'azote. Au terme de l'expérience, le test de Tukey montre des différences entre : les plants disposant de NO₃⁻, dont la teneur en azote total a encore augmenté (atteignant environ 2,75 mg.g⁻¹), ceux susceptibles de fixer le N₂, dont la teneur en azote total a fortement augmenté (+0,75 mg.g⁻¹, atteignant 3 mg.g⁻¹ de matière sèche), et ceux privés de toutes sources d'azote, dont la teneur en azote total est restée constante.

Pour la variété Chakkouf, initialement, la teneur en azote total (Figure 15B) est d'environ 1,25 mg.g⁻¹, puis augmente fortement à près de 3 mg.g⁻¹ au cours des 8 premiers jours de la phase au sein des plants disposant de NO₃⁻ et ayant été inoculés (traitement 1). Les plants disposant de NO₃⁻ mais n'ayant pas été inoculés (traitement 3) présentent une teneur en azote total qui augmente, légèrement moins, atteignant un peu plus 2,5 mg.g⁻¹. Les plants privés de NO₃⁻ mais ayant été inoculés (traitement 2) voient leur teneur en azote augmenter pour atteindre 2,25 mg.g⁻¹ environ. Enfin, les plants privés de toutes sources d'azote (traitement 4) ont une teneur en azote total qui augmente également pour atteindre 2 mg.g⁻¹. Quel que soit le traitement subi, la teneur en azote total reste constante entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour de traitements, avant de augmenter, passant à 3,5 mg.g⁻¹ dans les plants disposant de NO₃⁻ et inoculés (traitement 1), à 3,4 mg.g⁻¹ pour les plants susceptibles de fixer le N₂ (traitement 2), à 2,5 mg.g⁻¹ pour les plants dépourvus de NO₃⁻ mais ayant été inoculés, et un peu plus de 2 mg.g⁻¹ pour les plants privés de toute source d'azote. Au terme de l'expérience, les plants disposant de NO₃⁻ (traitement 1 et 3) atteignent une teneur en azote total d'environ 3,6%, ceux qui sont susceptibles de fixer le N₂ ont une teneur en azote total d'environ 3 mg.g⁻¹, enfin, les plants privés de toutes formes d'azote ont une teneur en azote total moindre, d'environ 2,5 mg.g⁻¹. Quelle que soit la date, les modèles linéaires généralisés montrent que le traitement a un effet sur cette teneur en azote total. Le test de Tukey montre que pour les deux variétés, la teneur en azote total des plants disposant de NO₃⁻ et ayant été inoculés est significativement supérieure à celle des plants disposant de NO₃⁻ non inoculés, elle-même significativement supérieure à celle des plants susceptibles de fixer le N₂, elle-même significativement supérieure à celle des plants privés de toutes sources d'azote.

V) Discussion

A) Mise au point de protocoles

1) Solution nutritive adaptée aux légumineuses

La solution nutritive décrite par Ghanem *et al.* (2011) permet une meilleure production de biomasse aérienne, et une meilleure accumulation d'azote dans les organes aériens. Le changement de contexte azoté devant être le seul facteur de stress, et les autres conditions environnementales devant être optimales, nous privilégierons cette solution nutritive dans la suite de nos expériences. De plus, nous disposons également de cette même solution ajustée à une teneur en azote minimale (tout en respectant les impératifs d'égalité des charges ioniques) (Tableau 2).

2) Protocoles d'inoculation

La nodulation parvient à être totale (taux de nodulation = 1) quelle que soit l'espèce, et

quel que soit le type d'inoculation (précoce ou tardive) (Figure 10). Les protocoles d'inoculation que nous avons testés sont donc efficaces.

Notons toutefois que l'inoculation tardive aboutit à une nodulation totale (taux de nodulation=1) plus rapidement que l'inoculation précoce (4 jours de moins pour la lentille, 1 jour de moins pour le pois chiche) (Figure 10), que la lentille commence à présenter des nodules avant le pois chiche (7 à 8 jours avant) et atteint une nodulation totale avant ce dernier (11 à 17 jours avant). Les changements de solutions nutritives n'auront donc pas lieu en même temps pour la lentille et le pois chiche dans la suite des expériences.

B) Effets du changement de la source d'azote sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses

1) La fixation symbiotique aboutit-elle au même état final de croissance et de développement que l'absorption racinaire ?

Les plants cultivés en condition permettant la fixation symbiotique du N_2 présentent donc une croissance considérable, voire identique à celle des plants disposant de NO_3^- , en fin d'expérience, toujours significativement différente de celle des plants privés de toutes sources d'azote. Ceci suggère que la fixation symbiotique du diazote a bien été réactivée après la suppression du NO_3^- .

Après l'arrêt des apports de NO_3^- , la fixation symbiotique du N_2 atmosphérique permet d'atteindre le même stade de développement que l'absorption racinaire de NO_3^- (selon l'échelle BBCH utilisée) en fin d'expérience (Tableau 4). De même, le recours à l'un ou à l'autre des phénomènes n'influence pas la phénologie des plants (Figures 13C et 14C).

En revanche, l'état final de croissance atteint par les plants susceptibles de fixer le N_2 varie selon la variété. Dans le cas de la variété Chakkouf, le mode de nutrition azotée est sans effet sur l'état de croissance final des plants (Figure 14), donc après l'arrêt de l'apport de NO_3^- , la fixation symbiotique du N_2 permet d'atteindre le même état de croissance que l'absorption racinaire de NO_3^- . Ce n'est pas le cas pour la variété Bakria (Figure 13). Hormis pour la hauteur (Figure 13B), la fixation symbiotique du N_2 ne permet pas d'atteindre le même état de croissance que l'absorption racinaire de NO_3^- . En revanche, les états de croissance atteints pour chaque variable mesurée est significativement différent de ceux atteints par les plants privés de toutes sources d'azote. Donc dans le cas de la variété Bakria, la fixation symbiotique du N_2 , permet une croissance significative, mais qui n'atteint pas le niveau de celle de l'absorption racinaire de NO_3^- .

Ainsi, après une fertilisation azotée précoce, la fixation symbiotique du N_2 reprend et peut aboutir à des états de croissance et de développement similaires à ceux atteints avec une fertilisation continue. Contrairement à ce qui a été avancé par (McKenzie et al., 2001), l'application précoce de fertilisant azoté est bénéfique. Effectivement, alors que la fixation symbiotique, en l'absence de fertilisation azotée précoce, ne permet pas d'atteindre une même croissance que la fertilisation azotée (Mahon, Child, 1979 ; Jensen, 1986), elle le permet (d'après nos résultats) en cas de fertilisation azotée précoce. Ceci est en accord avec ce qui est proposé par (Rigaud, 1981 ; Fujikake et al., 2002).

2) Le changement de source d'azote induit-il des modifications de la dynamique de croissance et de développement ?

Au début de la phase de modification de la source d'azote, les plants ne présentent statistiquement aucune différence de croissance ou de développement et constituent une population homogène, quelle que soit la variable de croissance ou de développement étudiée

(Figures 13 et 14). Les seuls paramètres variables sont donc la présence ou l'absence de NO_3^- dans les solutions nutritives, ainsi que la réalisation ou non de l'inoculation tardive, constituant ou non des conditions permettant aux plantes de fixer le N_2 atmosphérique. Ainsi, le mode de nutrition azotée est le seul paramètre potentiellement discriminant intervenant au cours de cette phase.

Quelle que soit la variété, et quelle que soit la variable de croissance étudiée, les plants susceptibles de fixer le N_2 atmosphérique (traitement 2, Figures 13 et 14) commencent par présenter un retard de croissance par rapport aux plants ayant recours à l'absorption racinaire de NO_3^- (traitement 1 et 3, Figures 13 et 14). Effectivement, les variables de croissance de ces plants présentent un retard, et ont, dans un premier temps, un comportement semblable aux plants privés de toute source d'azote (traitement 4, Figures 13 et 14). Ceci suggère qu'ils ne disposent pas de source azotée leur permettant un développement similaire à celui des plants disposant de NO_3^- comme source d'azote. Nous en déduisons que la fixation symbiotique du N_2 a été inhibée par l'exposition au NO_3^- , et qu'après la suppression de ce dernier, le passage d'une source d'azote (NO_3^-) à l'autre (N_2 atmosphérique) n'a pas été instantané. Ceci est en accord avec les observations faites à l'échelle de la nodulation et de l'activité des nodules (Fujikake, 2003 ; Voisin et al., 2003), selon lesquelles il existe un délai avant la reprise ces phénomènes après un stress nitraté.

Toutefois, dans un second temps, les plants susceptibles de fixer le N_2 réagissent différemment à l'absence de nitrate selon leur variété. Dans le cas de la variété Chakkouf, le délai de reprise de la croissance est de l'ordre de 15 jours (Figure 14), alors qu'il est de l'ordre de 22 jours pour la variété Bakria (Figure 13). Comme le suggèrent (Voisin et al., 2003), nous constatons que le délai de reprise de la croissance après le changement de la source d'azote dépend de la variété.

En plus du délai de reprise de la fixation symbiotique, nous remarquons que la variété influence aussi l'efficacité de ce phénomène. Dans le cas de la variété Bakria, bien que la fixation symbiotique permette une reprise de la croissance après un certain délai (Figure 13 A, D, E), elle ne permet pas d'atteindre un même état de croissance, même en fin d'expérience. En revanche, dans le cas de la variété Chakkouf (Figure 14 A, B, D, E), lorsque la croissance reprend, le retard accumulé lors du délai de reprise de la fixation symbiotique est rattrapé en 7 jours et la croissance des plants fixant le N_2 n'est pas significativement différente de celle des plants absorbant le NO_3^- jusqu'à la fin de l'expérience. La variété, en plus d'influencer le délai de reprise de la fixation symbiotique, influence également l'efficacité de cette dernière.

La reprise de la croissance ayant eu lieu, nous en déduisons que la reprise de la fixation symbiotique du N_2 a également eu lieu (seule source d'azote disponible pour les plants cultivés en conditions favorisant la fixation symbiotique : absence de NO_3^- , et inoculation). Le délai de reprise de la croissance est imputable au mode de nutrition azotée (absorption ou fixation), mais est-il corrélé à un déficit azoté consécutif à une absence de source d'azote ?

3) Le changement de source d'azote implique-t-il une carence azotée ?

La teneur en azote totale permise par la fixation symbiotique est supérieure à celle présentée par les plants privés de toutes sources d'azote (Figure 15). Ce qui montre que la fixation symbiotique a permis l'assimilation d'azote. Le phénomène de fixation symbiotique a donc bien été réactivé. Toutefois, la teneur en azote total des plants réalisant la fixation symbiotique du N_2 est, tout au long de la phase, inférieure à celle des plants réalisant l'absorption racinaire du NO_3^- . Ceci montre donc que tout au long de l'expérience, la fixation

symbiotique du N₂ ne permet pas une assimilation de l'azote aussi importante que l'absorption racinaire (Figure 15).

En ce qui concerne l'évolution de la teneur en azote dans les plants au cours de l'expérience, alors que la teneur en azote total au sein de plants absorbant le NO₃⁻ par voie racinaire augment continuellement, celle des plants susceptibles de fixer le N₂ commence par rester constante (Figure 15). Comme pour les variables de croissance, nous observons un délai de reprise du phénomène, au cours duquel l'évolution de la teneur en azote total des plants susceptibles de fixer le N₂ est la même que celle des plants privés de toutes sources d'azote. Il y a donc bien un délai au cours duquel la source d'azote atmosphérique n'est pas exploitable par les plants, alors que les conditions pour ce faire sont réunies (absence de nitrate et inoculation). Il y a donc bien un délai nécessaire à la réactivation du phénomène de fixation symbiotique du N₂.

Concernant l'évolution de la teneur en azote au cours de la phase de modification de la source azotée, nous pouvons également faire les mêmes constats qu'on pour les variables de croissance. Premièrement, il y a un délai consécutif à la suppression du nitrate au cours duquel la teneur en azote total stagne pour les plants susceptibles de fixer le N₂, alors qu'elle augmente chez les plants disposant de NO₃⁻. La teneur en azote total des plants susceptibles de fixer le N₂ étant similaire à celle des plants privés de toutes sources d'azote, nous en déduisons, qu'au cours de ce délai, ces plants n'ont accès à aucune source d'azote. La fixation symbiotique n'est pas effective, la teneur en azote dans les plants n'augmente pas, et la croissance est arrêtée. Deuxièmement, nous remarquons que la durée du délai observé dépend également de la variété, variant de 15 jours pour la variété Chakkouf à 22 jours pour la variété Bakria. Troisièmement, nous constatons également que l'augmentation de la teneur en azote total dépend de la variété. Pour la variété Bakria, la teneur en azote total des plants susceptibles de fixer le N₂ augmente de 0,75 mg.g⁻¹ de matière sèche en 7 jours, alors qu'elle augmente également de 0,75 mg.g⁻¹ de matière sèche, mais en 14 jours pour la variété Chakkouf. Le passage de l'absorption du NO₃⁻ à la fixation symbiotique du N₂ implique donc un déficit d'azote, par rapport à des plants continuant de réaliser l'absorption racinaire du NO₃⁻. Comme précédemment, nos résultats sont en accord avec ceux de (Voisin et al., 2003) selon lesquels la variété influence la fixation symbiotique, mais pas avec ceux de (Rigaud, 1981 ; Fujikake et al., 2002) selon lesquels la fixation symbiotique, après une fertilisation précoce, peut aboutir à une teneur en azote total similaire à celle atteinte par une fertilisation azotée continue.

Comme nous observons les mêmes phénomènes pour les variables de croissance et la teneur en azote total par plante. Nous en déduisons que la reprise de la croissance des plants après la suppression du NO₃⁻ est corrélée à l'augmentation de la teneur en azote total des plants. Nous avançons également que le retard de croissance enregistré dans les premiers jours de la phase de différenciation de la source azotée serait dû à un retard d'accumulation d'azote, dû au délai de remise en marche du processus de fixation symbiotique, en accord avec les conclusions de (Mahon, Child, 1979 ; Fujikake, 2003). Les conséquences de ce délai sont variables selon la variété et la capacité de fixation relative à chaque variété.

En outre, il nous est impossible de dire si le retard d'assimilation de l'azote, conséquence de l'ineffectivité de la fixation symbiotique lors du changement de source azotée, est également la cause de la réactivation du phénomène, ou si la simple absence de nitrate suffit à réactiver la fixation symbiotique du N₂, si les plantes sont en présence de *Rhizobiums* adaptés.

C) Perspectives et limites

Tout d'abord, compte tenu du succès de la nodulation du pois chiche lors de la mise au point du protocole d'inoculation précoce, nous pensons que l'absence de nodules après l'inoculation précoce réalisée au cours de la phase de facilitation de la nodulation (de l'expérience de modification de la source d'azote), serait due à une erreur lors de la réalisation de la culture de *Rhizobiums*.

Nos résultats sont à interpréter avec précaution, sachant que l'expérience a été menée en conditions de culture contrôlées. Premièrement, les conditions dans la chambre de culture étaient optimales pour la lentille (permettant d'aboutir à une croissance optimale, et ne présentant pas d'hétérogénéité) et donc meilleures que des conditions naturelles au champ. Deuxièmement, les effets observés ont pu être modulés favorablement par les conditions de culture, et défavorablement par la culture hydroponique.

Un autre biais à mettre en évidence est le forçage de la nodulation en première partie d'expérience. Avant de passer à la phase d'exposition au nitrate, nous avons attendu que tous les plants présentent des nodules, afin de disposer de plants ayant tous déjà eu recours à la fixation symbiotique, devant réactiver un mécanisme déjà activé initialement. Ceci ne serait peut-être pas le cas au champ. La population de plants inoculés serait potentiellement hétérogène, certains plants devant alors développer des nodules *de novo*, plutôt de réactiver des nodules préexistants. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'importance de l'inoculation précoce sur la réactivité du mécanisme de réactivation de la fixation symbiotique.

A la fin de l'expérience, la teneur en azote total au sein des plants réalisant la fixation symbiotique du N_2 est en cours de forte augmentation. Il pourrait être intéressant de prolonger l'expérience, afin de voir si, au terme du cycle de développement de la lentille (et donc à plus long terme), la reprise de la fixation symbiotique après une fertilisation précoce permet d'atteindre une même teneur en azote total qu'un recours continu à l'absorption racinaire du NO_3^- .

En outre, le terme de notre expérience ne nous permet pas d'arriver jusqu'au stade de récolte, permettant d'appréhender l'effet de notre traitement sur le rendement. Comme évoqué en discussion : bien que l'état de croissance et de développement des plants fixant de diazote et des plants absorbant le nitrate soient parfois le même, ce n'est pas le cas des états de croissance intermédiaires. Or, ces retards pourraient intervenir lors de phases décisives pour l'élaboration du rendement, et avoir un effet crucial sur ce dernier.

De même, les modes de nutrition azotée ne sont testés qu'à partir du stade floraison. Il s'agit d'un stade assez tardif, où l'effet de du recours à la fixation symbiotique du N_2 est moins évident que pour des stades plus précoces, puisque à ce stade, le nombre de nodules et leur masse n'augmente plus (Streeter, Wong, 1988). La durée des phases n'est pourtant pas modulable. La lentille étant une espèce thermosensible et photosensible (Summerfield et al., 1985), une solution pour observer l'effet du changement de mode de nutrition azotée à des stades de développement moins avancés pourrait être de réduire la température de la chambre de culture ainsi que la photopériode en début d'expérience afin de retarder le développement et de permettre une nodulation totale à un stade moins avancé.

Notons également qu'il est difficile de parler de carence azotée dans notre cas. Nous considérons une plante comme carencée en azote lorsque sa teneur en azote (en mg d'N/g de matière sèche) est semblable à celle d'une plante privée de toute source d'azote et différente de

celle d'une plante disposant de nitrate en abondance. Cette considération présente ses limites. Utiliser l'indice de nutrition azotée (INN) serait utile, mais est difficile dans notre cas, puisqu'aucune formule permettant de déterminer la teneur en azote critique (nécessaire pour calculer l'INN) chez la lentille n'est évoquée dans la bibliographie.

Les résultats que nous avons obtenus varient selon la variété, donc il nous paraît difficile, à ce stade, de généraliser nos observations à toute l'espèce, ou à l'ensemble des légumineuses de saison froide. Il serait utile de réitérer l'expérience sur d'autres espèces, meilleures ou moins bonnes fixatrices d'azote, afin de peut-être généraliser nos observations. Les résultats variant selon la variété, il en serait de même avec d'autres souches bactériennes (Becana, Sprent, 1987). Il pourrait donc être intéressant de déterminer des couples de variétés et souches de *Rhizobium* maximisant l'efficacité de la fixation symbiotique.

Il a été montré que la régénération, le développement et le délai de réactivation des nodules dépendent de la durée de l'apport azoté et son intensité (Voisin et al., 2003). Il pourrait donc être intéressant de renouveler l'expérience avec différentes doses de nitrate apportées, et déterminer une dose optimale, assurant un bon développement du couvert végétal en début de cycle, et endommageant le moins possible les nodules, afin de ne pas compromettre ou retarder la réactivation des mécanismes de la fixation symbiotique du N₂.

La comparaison de la teneur en azote total des plants de la variété Chakkouf inoculés disposant de NO₃⁻ avec celle des plants non inoculés disposant de NO₃⁻ (Figure 15B) montre que les plants inoculés et disposant de nitrate assimilent plus d'azote que les plants non inoculés disposant de nitrate. La réalisation de l'inoculation étant le seul paramètre variant entre ces plants, ceci suggère que l'absorption racinaire de NO₃⁻ n'impliquerait pas nécessairement un arrêt du phénomène de fixation symbiotique du N₂, comme suggéré par (Streeter, Wong, 1988 ; Jeudy et al., 2010). Cette observation dépend également de la variété, et mériterait d'être étudiée lors de répétitions de l'expérience.

Conclusion

Au terme de cette étude, nous sommes en mesure d'indiquer avec conviction quelle solution nutritive utiliser pour cultiver des légumineuses en hydroponie. Nous sommes également en mesure de fournir un protocole d'inoculation des légumineuses en phase liquide, compatible avec l'hydroponie.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de répondre à un cas particulier de notre problématique, puisque nous n'avons obtenu de résultats que pour la lentille. Selon la variété étudiée et avec les souches de *Rhizobium*s que nous avons utilisées, après une exposition assez longue et intense à du nitrate, la fixation symbiotique du N_2 atmosphérique peut permettre d'atteindre le même niveau de croissance et de développement que l'absorption du NO_3^- , mais pas la même teneur en azote total (au terme de notre expérience).

Dans tous les cas, le changement de source d'azote induit un retard de croissance se traduisant par une stagnation des variables de croissance pendant 8 à 15 jours selon la variété. Au-delà de ce délai, selon la variété, la croissance peut reprendre très vite et rattraper son retard en moins de 7 jours (Chakkouf), ou reprendre de manière plus modérée sans jamais rattraper son retard (Bakria).

Ce retard de croissance est quant à lui corrélé à un déficit d'azote. Il nous paraît assez difficile de parler de carence, mais du point de vue de la teneur en azote total par plante les plantes susceptibles de fixer le N_2 atmosphérique ont un comportement semblable à des plantes dépourvues de toutes sources d'azote, se traduisant plus une stagnation de cette teneur en azote total pendant 8 à 15 jours selon la variété. Au-delà de ce délai, la teneur en azote total peut augmenter fortement sur un court délai, sans égaler celle permise par une absorption racinaire de NO_3^- continue. Nous avançons donc que le retard de croissance est lié à ce retard d'assimilation de l'azote.

Par conséquent, au terme de ce travail, il nous semble que le recours à une fertilisation précoce de légumineuses amenées à fixer l'azote atmosphérique serait sans effet particulier sur l'état de croissance et de développement des plants, par rapport à une fertilisation continue, à condition d'utiliser une variété adaptée. Cette conclusion ne concerne que la croissance et le développement et ne considère pas le rendement, qui pourrait être influencé par la survenue d'un déficit d'azote au cours du cycle de développement. D'autant plus que le déficit d'azote observé intervient sur un intervalle de temps assez long, puisque malgré une reprise de l'assimilation de l'azote par les plants susceptibles de fixer le N_2 , la teneur en azote total de ces derniers reste inférieure à celle des plants disposant de NO_3^- jusqu'au terme de l'expérience.

Bibliographie

APPLEBY, C A, 1984. Leghemoglobin and Rhizobium Respiration. In : *Annual Review of Plant Physiology*. juin 1984. Vol. 35, n° 1, p. 443-478. DOI 10.1146/annurev.pp.35.060184.002303.

AYKROYD, W. R. et DOUGHTY, J., 1964. Legumes in human nutrition. In : *FAO nutritional studies*. 1964. Vol. 19, p. 1-138.

BAETHGEN, W. E. et ALLEY, M. M., 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. In : *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. mai 1989. Vol. 20, n° 9-10, p. 961-969. DOI 10.1080/00103628909368129.

BARKER, Davide G., PFAFF, Theo, MOREAU, Delphine, GROVES, Emma, RUFFEL, Sandrine, LEPETIT, Marc, WHITEHAND, Stephanie, MAILLET, Fabienne, RAMAKRISHNAN, Nair M. et JOURNET, Etienne-Pascal, 2006. Growing *M. truncatula*: Choice of substrates and growing conditions. In : *The Medicago truncatula handbook*. novembre 2006. p. 1-26.

BECANA, Manuel et SPRENT, Janet I., 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. In : *Physiologia Plantarum*. août 1987. Vol. 70, n° 4, p. 757-765. DOI 10.1111/j.1399-3054.1987.tb04335.x.

CHONGO, G. et BERNIER, C.C., 1999. Field and growth chamber evaluation of components of partial resistance to *Colletotrichum truncatum* in lentil. In : *Canadian Journal of Plant Pathology*. mars 1999. Vol. 21, n° 1, p. 58-63. DOI 10.1080/07060661.1999.10599969.

CLAYTON, G. W., RICE, W. A., LUPWAYI, N. Z., JOHNSTON, A. M., LAFOND, G. P., GRANT, C. A. et WALLEY, F., 2004. Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: Nodulation, N₂ fixation and nitrogen partitioning. In : *Canadian Journal of Plant Science*. janvier 2004. Vol. 84, n° 1, p. 79-88. DOI 10.4141/P02-089.

FAO, 2015. A propos | 2016 International Year of Pulses. In : [en ligne]. décembre 2015. [Consulté le 29 mars 2017]. Disponible à l'adresse : <http://www.fao.org/pulses-2016/about/fr/>.

FLOWERS, Timothy J., GAUR, Pooran M., GOWDA, C. L. Laxmipathi, KRISHNAMURTHY, L., SAMINENI, Srinivasan, SIDDIQUE, Kadambot H. M., TURNER, Neil C., VADEZ, Vincent, VARSHNEY, Rajeev K. et COLMER, Timothy D., 2010. Salt sensitivity in chickpea. In : *Plant, Cell & Environment*. 1 avril 2010. Vol. 33, n° 4, p. 490-509. DOI 10.1111/j.1365-3040.2009.02051.x.

FRANCISCO, Perigio B. et AKAO, Shoichiro, 1993. Autoregulation and Nitrate Inhibition of Nodule Formation in Soybean cv. Enrei and its Nodulation Mutants. In : *Journal of Experimental Botany*. 1993. Vol. 44, n° 3, p. 547-553. DOI 10.1093/jxb/44.3.547.

FUJIKAKE, H., 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. In : *Journal of Experimental Botany*. 1 mai 2003. Vol. 54, n° 386, p. 1379-1388. DOI 10.1093/jxb/erg147.

FUJIKAKE, Hiroyuki, YASHIMA, Hiroyuki, SATO, Takashi, OHTAKE, Norikuni, SUEYOSHI, Kuni et OHYAMA, Takuji, 2002. Rapid and reversible nitrate inhibition of nodule growth and N₂ fixation activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). In : *Soil Science and Plant Nutrition*. avril 2002. Vol. 48, n° 2, p. 211-217.

DOI 10.1080/00380768.2002.10409193.

GEDDES, Barney A. et ORESNIK, Ivan J., 2016. The Mechanism of Symbiotic Nitrogen Fixation. In : HURST, Christon J. (éd.), *The Mechanistic Benefits of Microbial Symbionts* [en ligne]. Cham : Springer International Publishing. p. 69-97. [Consulté le 13 mars 2017]. ISBN 978-3-319-28066-0. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-28068-4_4.

GHANEM, Michel Edmond, MARTÍNEZ-ANDÚJAR, Cristina, ALBACETE, Alfonso, POSPÍŠILOVÁ, Hana, DODD, Ian C., PÉREZ-ALFOCEA, Francisco et LUTTS, Stanley, 2011. Nitrogen Form Alters Hormonal Balance in Salt-treated Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In : *Journal of Plant Growth Regulation*. juin 2011. Vol. 30, n° 2, p. 144-157. DOI 10.1007/s00344-010-9178-4.

GIBSON, Ah, 1966. The Carbohydrate Requirements for Symbiotic Nitrogen Fixation: A « Whole-Plant » Growth Analysis Approach. In : *Australian Journal of Biological Sciences*. 1966. Vol. 19, n° 4, p. 499. DOI 10.1071/BI9660499.

GORDON, Anthony J., MINCHIN, Franck R., JAMES, Caron L. et KOMINA, Olga, 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. In : *Plant Physiology*. 1 juillet 1999. Vol. 120, n° 3, p. 867-878.

HOAGLAND, D. R. et ARNON, D. I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. In : *California Agricultural Experiment Station*. 1950. n° 2ème édition.

HOTHORN, Torsten, BRETZ, Frank, WESTFALL, Peter, HEIBERGER, Richard M., SCHUETZENMEISTER, Andre et SCHEIBE, Susan, 2016. *multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 31 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://cran.r-project.org/web/packages/multcomp/index.html>.

HOUBA, V., VAN WARK, W., WALINGA, I. et VAN DER LEE, J. J., 2004. Part 7, Chapter 2.2. In : *Plant Analysis Procedures* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. [Consulté le 16 août 2017]. ISBN 978-1-4020-2769-7. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-2976-9>.

HUANG, Bingru, JOHNSON, Jerry W., NESMITH, Scott et BRIDGES, David C., 1994. Growth, physiological and anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging and nutrient supply. In : *Journal of Experimental Botany*. 1994. Vol. 45, n° 2, p. 193-202. DOI 10.1093/jxb/45.2.193.

IMTIAZ, Muhammad, RIZWAN, Muhammad Shahid, MUSHTAQ, Muhammad Adnan, YOUSAF, Balal, ASHRAF, Muhammad, ALI, Muhammad, YOUSUF, Adnan, RIZWAN, Muhammad, DIN, Mairaj, DAI, Zhihua, XIONG, Shuanglian, MEHMOOD, Sajid et TU, Shuxin, 2017. Interactive effects of vanadium and phosphorus on their uptake, growth and heat shock proteins in chickpea genotypes under hydroponic conditions. In : *Environmental and Experimental Botany*. février 2017. Vol. 134, p. 72-81. DOI 10.1016/j.envexpbot.2016.11.003.

JENSEN, Es, 1986. The influence of rate and time of nitrate supply on nitrogen fixation and yield in pea (*Pisum sativum* L.). In : *Fertilizer Research*. 1986. Vol. 10, n° 3, p. 193-202. DOI 10.1007/BF01049349.

JEUDY, Christian, RUFFEL, Sandrine, FREIXES, Sandra, TILLARD, Pascal, SANTONI,

- Anne Lise, MOREL, Sylvain, JOURNET, Etienne-Pascal, DUC, Gérard, GOJON, Alain, LEPETIT, Marc et SALON, Christophe, 2010. Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. In : *New Phytologist*. février 2010. Vol. 185, n° 3, p. 817-828. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.03103.x.
- KHAN, Hammad A., SIDDIQUE, Kadambot H. M. et COLMER, Timothy D., 2016. Salt sensitivity in chickpea is determined by sodium toxicity. In : *Planta*. septembre 2016. Vol. 244, n° 3, p. 623-637. DOI 10.1007/s00425-016-2533-3.
- KHAN, Hammad Aziz, SIDDIQUE, Kadambot H.M., MUNIR, Rushna et COLMER, Timothy David, 2015. Salt sensitivity in chickpea: Growth, photosynthesis, seed yield components and tissue ion regulation in contrasting genotypes. In : *Journal of Plant Physiology*. juin 2015. Vol. 182, p. 1-12. DOI 10.1016/j.jplph.2015.05.002.
- KOUCHI, Hiroshi, AKAO, Shoichiro et YONEYAMA, Tadakatsu, 1986. Respiratory Utilization of ¹³C-Labelled Photosynthate in Nodulated Root Systems of Soybean Plants. In : *Journal of Experimental Botany*. 1986. Vol. 37, n° 7, p. 985-993. DOI 10.1093/jxb/37.7.985.
- LANCASHIRE, Peter D., BLEIHOLDER, H., BOOM, T. Van Den, LANGELÜDDEKE, P., STAUSS, R., WEBER, Elfriede et WITZENBERGER, A., 1991. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. In : *Annals of Applied Biology*. décembre 1991. Vol. 119, n° 3, p. 561-601. DOI 10.1111/j.1744-7348.1991.tb04895.x.
- LAUTER, D. J. et MUNNS, D. N., 1986. Salt resistance of chickpea genotypes in solutions salinized with NaCl or Na₂SO₄. In : *Plant and Soil*. juin 1986. Vol. 95, n° 2, p. 271-279. DOI 10.1007/BF02375078.
- MAHON, J. D., 1977. Respiration and the Energy Requirement for Nitrogen Fixation in Nodulated Pea Roots. In : *PLANT PHYSIOLOGY*. 1 décembre 1977. Vol. 60, n° 6, p. 817-821. DOI 10.1104/pp.60.6.817.
- MAHON, John D. et CHILD, Jeffrey J., 1979. Growth response of inoculated peas (*Pisum sativum*) to combined nitrogen. In : *Canadian Journal of Botany*. 15 août 1979. Vol. 57, n° 16, p. 1687-1693. DOI 10.1139/b79-206.
- MASSON-BOIVIN, Catherine, GIRAUD, Eric, PERRET, Xavier et BATUT, Jacques, 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? In : *Trends in Microbiology*. octobre 2009. Vol. 17, n° 10, p. 458-466. DOI 10.1016/j.tim.2009.07.004.
- MCKENZIE, R. H., MIDDLETON, A. B., SOLBERG, E. D., DEMULDER, J., FLORE, N., CLAYTON, G. W. et BREMER, E., 2001. Response of pea to rhizobia inoculation and starter nitrogen in Alberta. In : *Canadian Journal of Plant Science*. octobre 2001. Vol. 81, n° 4, p. 637-643. DOI 10.4141/P01-006.
- MENDIBURU, Felipe de, 2017. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 31 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>.
- MINCHIN, F. R., SUMMERFIELD, R. J., HADLEY, P., ROBERTS, E. H. et RAWSTHORNE, S., 1981. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. In : *Plant, Cell and Environment*. février 1981. Vol. 4, n° 1, p. 5-26. DOI 10.1111/j.1365-3040.1981.tb00831.x.

MURRAY, Jeremy D., LIU, Cheng-Wu, CHEN, Yi et MILLER, Anthony J., 2016. Nitrogen sensing in legumes. In : *Journal of Experimental Botany*. 7 décembre 2016. p. erw405. DOI 10.1093/jxb/erw405.

NAMVAR, Ali et SHARIFI, Raouf Seyed, 2011. Phenological and morphological response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to symbiotic and mineral nitrogen fertilization. In : *Zemdirbyste - Agriculture*. 2011. Vol. 98, n° 2, p. 121-130.

NAUDIN, Christophe, CORRE-HELLOU, Guénaëlle, VOISIN, Anne-Sophie, OURY, Vincent, SALON, Christophe, CROZAT, Yves et JEUFFROY, Marie-Hélène, 2011. Inhibition and recovery of symbiotic N₂ fixation by peas (*Pisum sativum* L.) in response to short-term nitrate exposure. In : *Plant and Soil*. septembre 2011. Vol. 346, n° 1-2, p. 275-287. DOI 10.1007/s11104-011-0817-8.

NEO, Hwee Hwee et LAYZELL, David B., 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. In : *Plant Physiology*. 1997. Vol. 113, p. 259-267.

NORHAYATI, M., NOOR, S. Mohd, CHONG, K., FAIZAH, A. W., HERRIDGE, D. F., PEOPLES, M. B. et BERGERSEN, F. J., 1988. Adaptation of methods for evaluating N₂ fixation in food legumes and legume cover crops. In : *Plant and Soil*. mai 1988. Vol. 108, n° 1, p. 143-150. DOI 10.1007/BF02370109.

NOVOZAMSKY, I., HOUBA, V.J.G., VAN ECK, R. et VAN VARK, W., 1983. A novel digestion technique for multi-element plant analysis. In : *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. juin 1983. Vol. 14, n° 3, p. 239-248. DOI 10.1080/00103628309367359.

OGHOGHORIE, C. G. O. et PATE, J. S., 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.) Techniques for measurement and evaluation in physiological terms. In : *Plant and Soil*. décembre 1971. Vol. 35, n° 1, p. 185-202. DOI 10.1007/BF02661850.

O'HARA, Graham W., BOONKERD, Nantakorn et DILWORTH, Michael J., 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. In : *Plant and Soil*. mai 1988. Vol. 108, n° 1, p. 93-110. DOI 10.1007/BF02370104.

R CORE TEAM, 2017. R: The R Project for Statistical Computing. In : [en ligne]. 2017. [Consulté le 31 août 2017]. Disponible à l'adresse : <https://www.r-project.org/>.

RALSTON, Edward J. et IMSANDE, John, 1983. Nodulation of Hydroponically Grown Soybean Plants and Inhibition of Nodule Development by Nitrate. In : *Journal of Experimental Botany*. 1983. Vol. 34, n° 10, p. 1371-1378. DOI 10.1093/jxb/34.10.1371.

RASOOL, Saiema, AHMAD, Altaf, SIDDIQI, T. O. et AHMAD, Parvaiz, 2013. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. In : *Acta Physiologiae Plantarum*. avril 2013. Vol. 35, n° 4, p. 1039-1050. DOI 10.1007/s11738-012-1142-4.

RIGAUD, J., 1981. Comparison of the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. In : *Nitrogen and carbon metabolism*. Springer Netherlands. S.l. : s.n. p. 17-48.

RIGAUD, J. et PUPPO, A., 1975. Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. In :

Journal of General Microbiology. 1 juin 1975. Vol. 88, n° 2, p. 223-228. DOI 10.1099/00221287-88-2-223.

SAMINENI, Srinivasan, SIDDIQUE, Kadambot H.M., GAUR, Pooran M. et COLMER, Timothy David, 2011. Salt sensitivity of the vegetative and reproductive stages in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Podding is a particularly sensitive stage. In : *Environmental and Experimental Botany*. juin 2011. Vol. 71, n° 2, p. 260-268. DOI 10.1016/j.envexpbot.2010.12.014.

SINGH, Dharmendra, DIKSHIT, Harsh K. et SINGH, Rajendra, 2013. A new phenotyping technique for screening for drought tolerance in lentil (*Lens culinaris*). In : HAVEY, M. (éd.), *Plant Breeding*. avril 2013. Vol. 132, n° 2, p. 185-190. DOI 10.1111/pbr.12033.

SINGH, Dharmendra, DIKSHIT, Harsh Kumar et KUMAR, Arun, 2015. Aluminium tolerance in lentil (*Lens culinaris*) with monogenic inheritance pattern. In : ABBO, S. (éd.), *Plant Breeding*. février 2015. Vol. 134, n° 1, p. 105-110. DOI 10.1111/pbr.12227.

SINGH, Piara, 1991. Influence of water-deficits on phenology, growth and dry-matter allocation in chickpea (*Cicer arietinum*). In : *Field Crops Research*. décembre 1991. Vol. 28, n° 1-2, p. 1-15. DOI 10.1016/0378-4290(91)90070-C.

STODDARD, F. L., BALKO, C., ERSKINE, W., KHAN, H. R., LINK, W. et SARKER, A., 2006. Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. In : *Euphytica*. janvier 2006. Vol. 147, n° 1-2, p. 167-186. DOI 10.1007/s10681-006-4723-8.

STREETER, John et WONG, Peter P., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. In : *Critical Reviews in Plant Sciences*. janvier 1988. Vol. 7, n° 1, p. 1-23. DOI 10.1080/07352688809382257.

SUMMERFIELD, R. J., ROBERTS, E. H., ERSKINE, W. et ELLIS, R. H., 1985. Effects of Temperature and Photoperiod on Flowering in Lentils (*Lens culinaris* Medic.). In : *Annals of Botany*. novembre 1985. Vol. 56, n° 5, p. 659-671. DOI 10.1093/oxfordjournals.aob.a087055.

TAVORI, G., ABBO, S., KAFKAFI, U. et SCHUNG, E., 2004. Influence of nitrate ad sodium chloride on concentration and internal distribution of mineral elements in broad bean (*Vicia faba* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). In : *Landbauforschung Volkenrode*. 2004. Vol. 54, p. 189-197.

UDVARDI, Michael et POOLE, Philip S., 2013. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. In : *Annual Review of Plant Biology*. 29 avril 2013. Vol. 64, n° 1, p. 781-805. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.

VOISIN, A. S., SALON, C., JEUDY, C. et WAREMBOURG, F. R., 2003. Seasonal patterns of ¹³C partitioning between bhoots and nodulated roots of N₂- or nitrate-fed *Pisum sativum* L. In : *Annals of Botany*. 1 avril 2003. Vol. 91, n° 5, p. 539-546. DOI 10.1093/aob/mcg055.

VOISIN, Anne-Sophie, SALON, Christophe, MUNIER-JOLAIN, Nathalie et NEY, Bertrand, 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). In : *Plant and Soil*. juin 2002. Vol. 243, p. 31-42. DOI 10.1023/A:1019966207970.

WHITE, J., PRELL, J., JAMES, E. K. et POOLE, P., 2007. Nutrient Sharing between Symbionts. In : *PLANT PHYSIOLOGY*. 27 avril 2007. Vol. 144, n° 2, p. 604-614. DOI 10.1104/pp.107.097741.

WITTY, J. F., MINCHIN, F. R. et SHEEHY, J. E., 1983. Carbon Costs of Nitrogenase Activity in Legume Root Nodules determined using Acetylene and Oxygen. In : *Journal of Experimental Botany*. 1983. Vol. 34, n° 8, p. 951-963. DOI 10.1093/jxb/34.8.951.

ZANCARINI, Anouk, MOUGEL, Christophe, VOISIN, Anne-Sophie, PRUDENT, Marion, SALON, Christophe et MUNIER-JOLAIN, Nathalie, 2012. Soil Nitrogen Availability and Plant Genotype Modify the Nutrition Strategies of *M. truncatula* and the Associated Rhizosphere Microbial Communities. In : FULLER, Dorian Q. (éd.), *PLoS ONE*. 15 octobre 2012. Vol. 7, n° 10, p. e47096. DOI 10.1371/journal.pone.0047096.

Annexes

ANNEXE I : Protocole de stérilisation des graines de légumineuses

- Matériel :
 - 2L d'eau distillée
 - Erlenmeyer 250mL – Alcool 70%
 - Erlenmeyer 250mL – Hypochlorite 5% + 1 goutte de Twin 80/100mL
 - 4 Erlenmeyer 250mL stérilisés
 - 4 pinces stérilisées
 - Papier whatman stérilisé
 - Boîtes de pétri stérilisées
 - 1 tamis/passoire stérile

- Protocole :
 - Laver les graines à l'eau du robinet.
 - Laver les graines à l'alcool (30 – 60s.).
 - Rincer 5 fois les graines à l'eau distillée.
 - Tremper les graines dans l'hypochlorite (2 – 3min.).
 - Rincer 10 fois à l'eau distillée.
 - Tremper dans l'eau distillée (30 à 60min.).
 - Sécher les graines à l'air libre.

ANNEXE II : Description de la solution de culture pour *Rhizobiums* (à ajuster à pH=7)

Composés	Masses (pour 1L de préparation)
Mannitol	10g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,2g
Extrait de levure	1g
NaCl	0,1g

	Diplôme : Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, horticoles et du Paysage Spécialité : Agronomie Spécialisation : Sciences des Productions Végétales Option : Ingénierie des agrosystèmes Responsable d'option : M. CAROF	
Auteur(s) : Michel GUARINONI Date de naissance : 7 janvier 1994	Organisme d'accueil : ICARDA Adresse : Station Exp. INRA-Quich	
Nb pages : Annexe(s) :	Rue Hafiane Cherkaoui	
Année de soutenance : 2017	Rabat, Maroc Maître de stage : Michel Edmond GHANEM	
Effet de la modification de la source azotée sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses à graines de saison fraîche.		
Effect of the modification of the nitrogen source on the dynamics of growth and development of cool-season legumes.		
<p>Les légumineuses peuvent prélever l'azote du sol par absorption racinaire, mais ont également la particularité de réaliser la fixation symbiotique du diazote atmosphérique en symbiose avec des <i>Rhizobiums</i>. Certains scientifiques avancent qu'une fertilisation précoce des légumineuses permettrait un développement suffisant pour améliorer le potentiel de fixation symbiotique. L'effet du passage d'une source d'azote à une autre sur la dynamique de croissance et de développement des légumineuses reste inconnu. Afin de répondre à cette question, nous cultivons la lentille et le pois chiche en hydroponie en chambre de culture. Il s'agira donc de déterminer une solution nutritive adaptée à la culture des légumineuses en hydroponie, ainsi qu'un protocole d'inoculation en phase liquide. Nous nous intéressons ensuite à l'évolution de différentes variables de croissance et de développement de plants inoculés ou non, exposés à du nitrate puis éventuellement privés de nitrate. Les résultats montrent que la fixation symbiotique peut conduire à un même état de croissance et de développement que l'absorption racinaire. Nous ne remarquons pas de retard de développement, toutefois, la dynamique de croissance est perturbée par la modification de la source d'azote. Le retard de croissance observé est corrélé à un déficit d'azote au sein des plantes. Passé le délai de réactivation de la fixation symbiotique, ce retard peut être rattrapé. Ceci nous montre donc qu'un arrêt d'apport de nitrate (au stade floraison), après une fertilisation précoce, peut être sans effet sur le développement et la croissance (au stade fructification avancé) de plants inoculés. Toutefois, le déficit d'azote consécutif au délai nécessaire à la réactivation de la fixation symbiotique pourrait survenir à un stade clef de l'élaboration du rendement, et pourrait l'influencer.</p>		
<p>In addition to their capacity to realize symbiotic nitrogen fixation thanks to Rhizobia, legumes can also absorb nitrogen from soil by root absorption. Some scientists put forward, that an early fertilization of legumes could allow a sufficient development to increase the potential of symbiotic fixation. It is yet unknown, if the transition from on nitrogen source to the other has consequences on the dynamics of growth and development of legumes. In order to answer this question, we grow two cool-season legumes (lentil and chickpea) hydroponically in growth chamber. We will first set up an adapted nutrient solution for legumes, and a protocol of legume inoculation in liquid phase. Then, we will follow the evolution of different growth and development parameters of inoculated plants first fertilized with nitrate and then deprived of nitrate. Our results show, that symbiotic fixation can lead to the same growth and development status than direct nitrogen root absorption. We do not notice any developmental delay, although the modification of the nitrogen source interferes with the growth dynamics. The observed growth delay is correlated to a nitrogen deficit in plants. After the delay due to the reactivation of the symbiotic fixation mechanism, the growth delay can be caught up. Thus, the removal of nitrate after early fertilization may have no effect on the development and growth of inoculated plants that are able to fix nitrogen. However, the nitrogen deficit consecutive to the delay required for the symbiotic fixation to be reactivated might occur during a key stage of yield formation, and might negatively affect it.</p>		
Mots-clés : Fixation symbiotique – légumineuses – azote - croissance – développement Key Words: symbiotic nitrogen fixation – legumes – nitrogen – growth		