

# L'effet de la culture intercalaire vigne-luzerne sur les paramètres biochimiques de la vigne sur un sol cadmique

## The effect of grapevine-alfalfa intercropping on the biochemical parameters of the grapevine on cadmic soil

S. JEDER<sup>1,2</sup>, F. MELKI<sup>1,2</sup>, F. LOUATI<sup>1</sup>, I. NOUAIRI<sup>1</sup>, B. BOUAMAMA-GZARA<sup>3</sup>, H. MHADHBI<sup>1</sup>, K. ZRIBI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Légumineuses et Agrosystèmes Durables, Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, BP 901, 2050 Hammam Lif, Tunisie

<sup>2</sup>Faculté des Sciences de Gabès, Université de Gabès, cité Erriadh 6072 Zrig, Gabès, Tunisie

<sup>3</sup>Laboratoire de physiologie moléculaire végétale, Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, BP 901, 2050 Hammam Lif, Tunisie

\*Corresponding author: zribi\_k@yahoo.fr

**Abstract** - Viticulture is constantly confronted with abiotic stresses. Due to human activities such as industrial waste, chemical fertilizer applications, smelting and sewage disposal. As a result, several heavy metals, such as cadmium, have accumulated more and more in the soils. These heavy metals cause acute and chronic toxic effects on plants grown on these soils. Intercropping is a powerful way to promote a more diverse plant community on the ground, allowing for complementary and facilitating relationships to alleviate the stress implied by heavy metals on plants and soil. In these systems, pulses are a key functional group and are highly valued for the agroecological services they provide. In this study, the application of a cadmium concentration of 1mM to a soil, containing *Vitis vinifera* in co-culture with *Medicago sativa*, increased the stress markers MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and proline and decreased the production of soluble proteins. and total sugars. Co-culture and inoculation with RCR2011, a reference strain of *Sinorhizobium meliloti*, alleviated the stress induced by cadmium.

**Key words:** *Medicago sativa*, vine, cadmium, co-culture, biochemical parameters

**Resumé** - La viticulture est constamment confrontée à des stress abiotiques. A cause des activités anthropiques telles que les déchets industriels, les applications d'engrais chimiques, la fusion et l'évacuation des eaux usées. De ce fait plusieurs métaux lourds, comme le cadmium, se sont accumulés de plus en plus dans les sols. Ces métaux lourds causent des effets toxiques aigus et chroniques sur les plantes cultivées sur ces sols. La culture intercalaire est un moyen puissant de promouvoir une communauté végétale plus diversifiée sur le terrain, permettant ainsi des relations complémentaires et facilitantes, à fin d'atténuer le stress impliqué par les métaux lourds sur les plantes et le sol. Dans ces systèmes, les légumineuses constituent un groupe fonctionnel clé et sont très appréciées pour les services agroécologiques qu'elles fournissent. Dans cette étude, l'application d'une concentration de cadmium de 1mM sur un sol, contenant *Vitis vinifera* en co-culture avec *Medicago sativa*, a fait augmenter les marqueurs de stress MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la proline et diminuer la production des protéines solubles et des sucres totaux. La co-culture et l'inoculation par la RCR2011, souche de référence de *Sinorhizobium meliloti* a atténué le stress induit par le cadmium.

**Mots clés :** *Medicago sativa*, vigne, cadmium, co-culture, paramètres biochimiques

### 1. Introduction

Le développement rapide des infrastructures urbaines et industrielles a entraîné une pénurie de ressources foncières. Les sols des sites agricoles à proximité des industries sont souvent contaminés par des métaux lourds. Ce type d'activités humaines augmente la concentration de métaux lourds dans les sols à des niveaux de risque, qui demeure un problème grave dans le monde entier menaçant l'environnement du sol et la santé humaine (Jiang et al. 2019). Dans les zones aux alentours des sites de contamination, l'agriculture est confrontée à un problème majeur lié au transfert des métaux lourds dans

la chaîne alimentaire. Le principal problème est que les métaux lourds ne sont pas biodégradables et que leur accumulation excessive dans les sols agricoles pourrait présenter un risque pour la santé publique. Ce type d'activités humaines augmente la contamination par le cadmium (Cd), un métal lourd toxique qui s'accumule dans les systèmes vivants. L'exposition peut se produire sur le plan professionnel ou environnemental (Zhang et Reynolds. 2019). Bien que le Cd ne soit pas essentiel et qu'aucun mécanisme d'absorption spécifique n'ait été identifié chez les plantes, il est absorbé dans les cellules racinaires par des transporteurs pour les cations bivalents essentiels comme le calcium, le fer et le zinc (Huybrechts et al. 2019). L'accumulation de Cd engendre un stress oxydatif qui provoque la destruction et la sénescence végétale. Cette accumulation cadmique induit la surproduction et l'accumulation rapide d'espèces réactives de l'oxygène responsables de l'inactivation des enzymes, de l'altération des membranes cellulaires (Ahmad et al. 2008), et de nombreux dommages de l'ADN, y compris la suppression de bases, la pyrimidine, dimérisation, réticulation, cassures de brins et modification de base.

La dégradation des sols par les métaux lourds comme le Cd, les pesticides et l'usage massif des engrais chimiques conduit à la fragilisation de la structure du sol, qui devient ainsi vulnérable à l'érosion, la qualité des plantes cultivées et la santé des organismes vivants (Bali et al. 2020). Ainsi, le secteur agricole remet de plus en plus en cause cette manière agressive de produire en agriculture. Ceci met en valeur la nécessité de changer de comportement, innover en proposant une autre façon de produire, de nouveaux systèmes de culture fondés plus sur les processus naturels, pour répondre à la fois au besoin de sécurité alimentaire, une gestion plus équilibrée des ressources naturelles et garantir un système de production durable (Jalleli 2018). Dans ce contexte, 'l'intercropping' ou la culture en association demeure une alternative agronomique pour confronter le risque induit par les métaux lourds. C'est une approche agronomique impliquant deux ou plusieurs espèces de cultures, ou génotypes, poussant ensemble et coexistant pendant un certain temps. En marge de l'agriculture intensive moderne, les cultures associées sont importantes dans de nombreux systèmes agricoles de subsistance ou à intrants / ressources limitées. Le système de cultures associées pourrait assurer un développement durable des cultures avec des rendements stables sans utilisation massives des engrais chimiques (Brooker et al. 2015).

Dans ces systèmes, les légumineuses constituent un groupe fonctionnel clé et sont très appréciées pour les services agro-écologiques qu'elles fournissent. En outre, les légumineuses ont une caractéristique spéciale qui les diffère de la plupart d'autres plantes, c'est la fixation symbiotique. Ce processus dépend de l'interaction compatible entre la plante et les bactéries du sol du groupe rhizobium (Gourion et al. 2015). Leur utilisation dans les systèmes de culture intercalaire s'explique en grande partie par leur capacité de fixation de l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>). Elles sont très précieuses comme engrais vert, en particulier dans les systèmes de culture à carence chronique en azote, à savoir l'agriculture biologique (Duchene et al. 2017). Les légumineuses intercalaires se sont avérées capables de fournir un large éventail de services supplémentaires comme produire des rendements nettement supérieurs à ceux d'une seule culture, la dynamique du nitrogène, meilleure efficacité d'utilisation des ressources, contrôle amélioré des mauvaises herbes, réduction des attaques et des dommages causés par les ravageurs, augmentation de la stabilité, l'agrégation et la perméabilité du sol, et l'activité et de la diversité des organismes du sol (Brooker et al. 2015). De plus, le rôle des légumineuses est bien prouvé dans la phytoremédiation, étant donné qu'elle améliore les écosystèmes des sols pollués par les métaux lourds dans la culture intercalaire (Zhu et al. 2016). Récemment, la symbiose Rhizobium-légumineuses a attiré l'attention par sa capacité biochimique et écologique à dégrader et à éliminer les polluants organiques. Elle est également connue par sa résistance aux métaux lourds ce qui fait d'elle l'une des outils efficaces pour la réhabilitation des sols modérément contaminés (Lebrazi et Fikri-Benbrahim, 2018).

Parmi les fabacées, *Medicago sativa* est un fourrage traditionnel des oasis. Cette plante herbacée et vivace, est résistante à la sécheresse, et pousse bien dans les sols bien drainés où les précipitations sont supérieures à 450 mm; elle pousse aussi très bien dans les zones irriguées (Mielmann 2013). En Tunisie, la luzerne cultivée *Medicago sativa* est l'espèce la plus cultivée dans les oasis. Sa culture en sec est une pratique récente depuis une vingtaine d'années.

Plusieurs études ont été faites sur la co-culture des légumineuses et la viticulture montrant l'efficacité de ce système et le rôle des légumineuses dans l'augmentation des rendements de la vigne en association, l'amélioration de l'absorption des nutriments et la réduction du stress oxydatif contre le stress métallique (Wu et al. 2019).

Dans ce contexte, et vu la demande mondiale pour la consommation de vigne, la viticulture demeure un centre d'intérêt pour 'l'intercropping' avec les légumineuses pour améliorer le rendement et les propriétés nutritives du raisin. Avec une production annuelle de plus de 77 millions de tonnes, la vigne est l'une des cultures fruitières les plus importantes dans le monde, avec une superficie cultivée supérieure à 75 millions Ha (Bouamama-Gzara et al. 2017). Actuellement, selon les données de Groupement Interprofessionnel de Fruits en Tunisie (Gifruit) pour l'année 2016, le vignoble tunisien occupe 22000 ha de superficie dont 12000 ha sont plantés de cultivars de raisins de table. Les plantations de vigne sont concentrées au nord, au centre et au sud, où les superficies plantées se propagent rapidement d'une année à l'autre (Arfaoui et al. 2019). Selon le ministère de l'Agriculture, des Ressources hydrauliques et de la Pêche en Tunisie, le cap-bon est la partie la plus productive de vigne. En 2018, elle a déclaré que la récolte des raisins destinés à la transformation, pour la saison 2017-2018, a enregistré une évolution, dans le gouvernorat de Nabeul, atteignant 22 000 tonnes (sur une superficie de 7400 hectares) contre 21 200 tonnes la saison écoulée.

Dans cette étude, et vu son importance économique, on s'intéresse à étudier le comportement de la viticulture en co-culture avec *M. sativa* sur un sol de jardinage, sous un stress métallique par le Cd, sur la variation de la teneur en malonyldialdéhyde (MDA), la teneur en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la teneur en protéines solubles, le taux des sucres totaux et la teneur en proline.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

La vigne sauvage (*Vitis vinefera*) est cultivée en association avec la luzerne (*Medicago sativa*) inoculée ou non avec son rhizobium spécifique. La vigne utilisée est appelée aussi lambrusque, récoltée principalement de la frontière Tuniso-Algérienne de nord-ouest. La luzerne utilisée est un cultivar local de la région de Gabès. La culture est conduite sur un sol de jardinage. Cette culture est soumise à une concentration 1 mM de Cd.

### **2.2. La culture**

Les graines de la luzerne ont été désinfectées et stérilisées avec de l'éthanol (70%) pendant 1 min, rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérilisée et laissées à l'obscurité à 4 °C durant une nuit. Après 24 heures, les graines sont germées dans les pots (100 graines/pot). La vigne est cultivée en association (intercropping) avec la luzerne inoculée ou non avec le rhizobium spécifique *Sinorhizobium meliloti* (RCR2011). La mise en place de la luzerne précède celle de la vigne par 15 jours, dans des pots en plastique de 20 cm de diamètre. Une plante de vigne entourée par environ 100 plantules de luzerne ont été utilisées dans chaque pot. L'inoculation de la luzerne par le rhizobium se fait avec l'apparition des premières feuilles, suivie par un rappel après 15 jours (10 ml inoculum / pot avec une concentration de 10<sup>10</sup> CFU/ml).

La culture a été réalisée pendant trois mois, dans une serre bien contrôlée où les températures comprises entre 25°C et 19°C (jour / nuit), l'humidité relative de 60% et la photopériode de 16 h de lumière/ 8 h d'obscurité. Trois traitements ont été considérés : la vigne toute seule (VC), la vigne avec La luzerne (VLC) et la vigne avec la luzerne et son rhizobium spécifique (VLRC).

### **2.3. Analyse des lipoperoxydes membranaires**

#### **2.3.1. Extraction**

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en malonyldialdéhyde (MDA) déterminée selon la méthode décrite par Alia et al. (1995). Le tissu végétal frais (1 g des feuilles fraîches) est broyé dans 10 ml d'acide trichloroacétique (TCA, 5%). Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 rpm pendant 15 min.

### 2.3.2. Dosage

Après centrifugation, un volume égal d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,5% préparé dans une solution d'acide trichloroacétique 20% est ajouté au surnageant. Le mélange est incubé à 100°C pendant 25 min. Durant cette incubation, un complexe se forme entre le TBA et les composés aldéhydiques, principalement le malondialdéhyde (MDA). Après refroidissement immédiat dans la glace (afin de stopper la réaction), le mélange est centrifugé à 10000 rpm pendant 5 min. Ensuite, le surnageant est collecté pour la détermination colorimétrique des lipoperoxydes. L'absorbance est déterminée à 532 nm. La densité optique est corrigée ensuite par la soustraction de l'absorbance non spécifique à 600 nm. La concentration du MDA est alors calculée à l'aide de son coefficient d'extinction ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$\text{MDA (nmol g}^{-1}\text{MF)} = [(A_{532} - A_{600}) * V] / (155 * \text{MF}) * 1000$$

Avec: A = absorbance

V = volume de l'extrait végétal (ml)

MF = matière végétale fraîche (g)

### 2.4. Détermination de la teneur en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

La teneur en  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été mesurée après une réaction avec l'iodure de potassium (KI). Le tissu végétal frais (feuilles fraîches) est broyé dans un mortier à 4°C à l'aide d'une solution de 0,1% d'acide thiobarbiturique (TCA) à raison de 3 ml pour 0,3 g de matière fraîche. Le broyat est ensuite centrifugé à 12.000 rpm pendant 15 min à 4°C. Pour le dosage, 0,75 ml de surnageant sont mélangés avec 0,75 ml de tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM, pH 7) et 1,5 ml d'iodure de potassium (KI) (1M). Les mesures de la densité optique sont faites à 390 nm.

Le taux de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été estimé en utilisant une gamme étalon réalisée à partir des solutions mères dans les mêmes conditions (Chakrabarty et al. 2009).

### 2.5. Extraction des protéines solubles totales

Le tissu frais (500 mg de feuilles fraîches) est broyé à l'aide d'un mortier dans l'azote liquide en présence d'une pincée de 2% de PVP (polyvinylpyrrolidone), puis homogénéisé dans 1 ml de tampon k-phosphate (50 mM; pH 7,8) dont la composition est la suivante: 0,1 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). L'extrait ainsi obtenu est centrifugé à 4°C pendant 20 min à 12000 rpm. Le surnageant résultant de cette centrifugation représentant la fraction des protéines solubles est récupéré puis on les aliquote dans des tubes eppendorfs en fractions de 150µl. Les tubes sont conservés au -80°C jusqu'à dosage des protéines totales selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin).

Le dosage des protéines se base principalement sur la liaison des protéines au bleu de Coomassie G250 (Bradford (1976)). Une fois lié à la protéine, ce réactif de couleur rouge va virer à la couleur bleue avec une absorption maximale à 595 nm. La teneur en protéines des échantillons est déterminée en utilisant une gamme étalon de BSA de concentration connue (1 mg/ml).

### 2.6. Extraction et dosage des sucres totaux

Les sucres sont extraits grâce à deux extractions successives de 30 min à chaud (70°C) (Yemm and Willis 1954). Le matériel végétal (25 mg) préalablement séché pendant 4 jours à 60°C est broyé en poudre. L'échantillon est ensuite mixé et homogénéisé en présence de 2,5 ml d'éthanol 80%. Après incubation 30 min dans un bain marie à 70%, l'homogénat ainsi obtenu est immédiatement refroidi puis centrifugé à 3000 rpm à 30 min et à 4°C. Le surnageant de chaque échantillon est ensuite prélevé et stocké à -20°C. Les culots retenus sont resuspendus dans 2,5 ml d'éthanol pour une deuxième extraction. Après centrifugation, le second surnageant récupéré est ajouté au premier pour constituer l'extrait final puis, il est conservé à -20°C jusqu'au dosage.

Le dosage des sucres totaux se fait par colorimétrie en présence de l'anthrome sulfurique. La solution d'anthrome sulfurique a été préparée comme suit: 0,1 g d'anthrome est mélangé avec 50 ml d'acide sulfurique concentré 95% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). A 1 ml d'anthrome sulfurique, sont ajoutés 0,5 ml d'éthanol 80% et 50 µl d'extrait, l'ensemble est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis incubé dans un bain marie pendant

10 min à 100°C dont on obtient une coloration verte. Après incubation, la réaction est arrêtée dans la glace et les teneurs en sucres sont déterminées par spectrophotométrie à 640 nm en se référant à une courbe standard de glucose.

## 2.7. Dosage de la proline

La teneur en proline a été déterminée selon la méthode décrite par Bates et al. (1973). Pour cela, 0,5 g des échantillons ont été extraits avec de l'acide sulfosalicylique à 3%. Deux ml des extraits végétaux ont été mélangés avec une quantité égale d'acide acétique glacial et du réactif à la ninhydrine, et maintenus pendant 1 h dans de l'eau bouillante. Après refroidissement du mélange réactionnel, 2 ml de toluène a été ajouté. Le chromophore a été aspiré à partir de la phase aqueuse, et l'absorbance a été mesurée à 520 nm et calculée en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS à partir d'une gamme étalon de proline pure.

## 2.8. Analyses statistiques

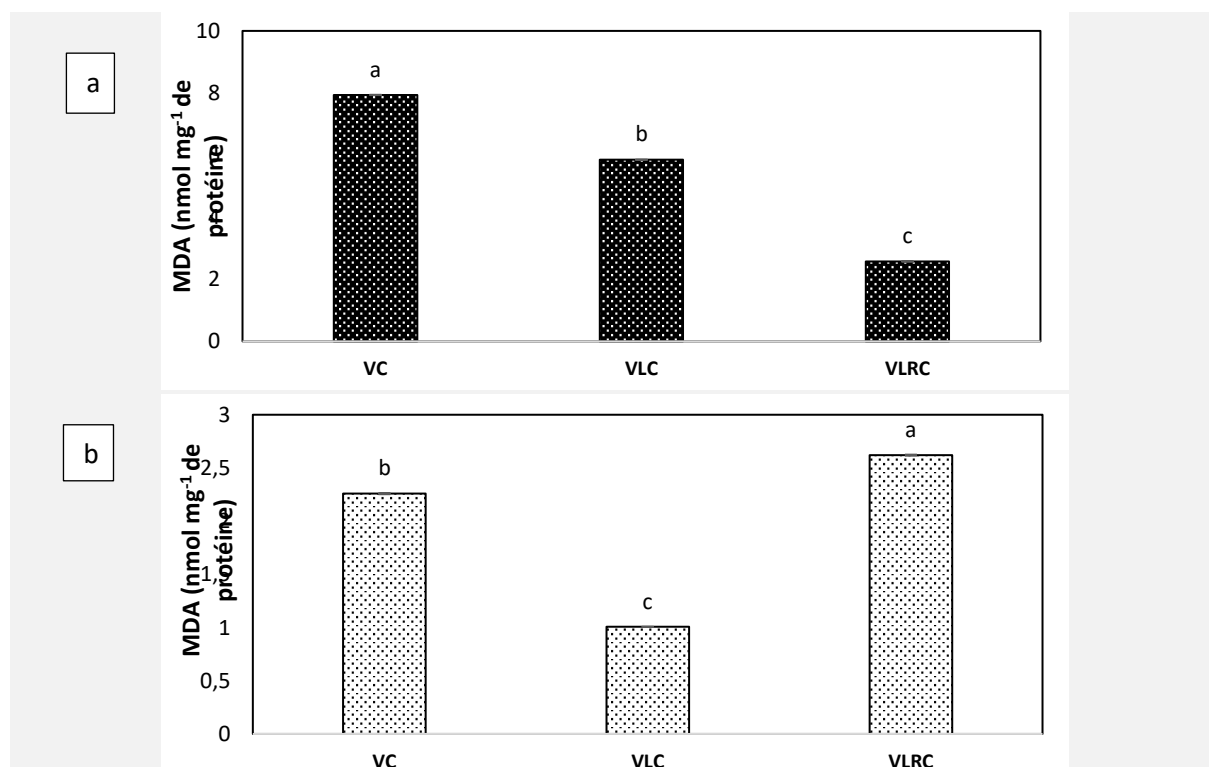
Toutes les données présentées sont les valeurs moyennes de trois répétitions. L'analyse de la variance (ANOVA I) pour toutes les variables mesurées a été réalisée par SPSS Ver. 20, Inc., Chicago, États-Unis. Les moyens de traitement ont été séparés en utilisant le test à plages multiples de TUKEY en prenant  $P \leq 0,05$  comme significatif.

## 3. Résultats

### 3.1. Analyse des lipoperoxydes membranaires

Le malondialdéhyde est considéré comme un marqueur de stress. Son augmentation montre qu'il s'agit d'une accumulation des radicaux libres dans les cellules de la plante. Dans notre étude, en présence de 1 mM de Cd, on a enregistré une diminution significative de la teneur en MDA dans les feuilles de la vigne en co-culture avec la luzerne. Cette diminution est plus prononcée chez la vigne du traitement (VLRC) où la présence du couple *M. sativa*-rhizobium (figure 1).

Au niveau racinaire, on remarque une diminution considérable de la teneur en MDA chez la vigne du traitement (VLC), par contre, cette teneur augmente en présence du couple *M. sativa*-rhizobium (figure 1).

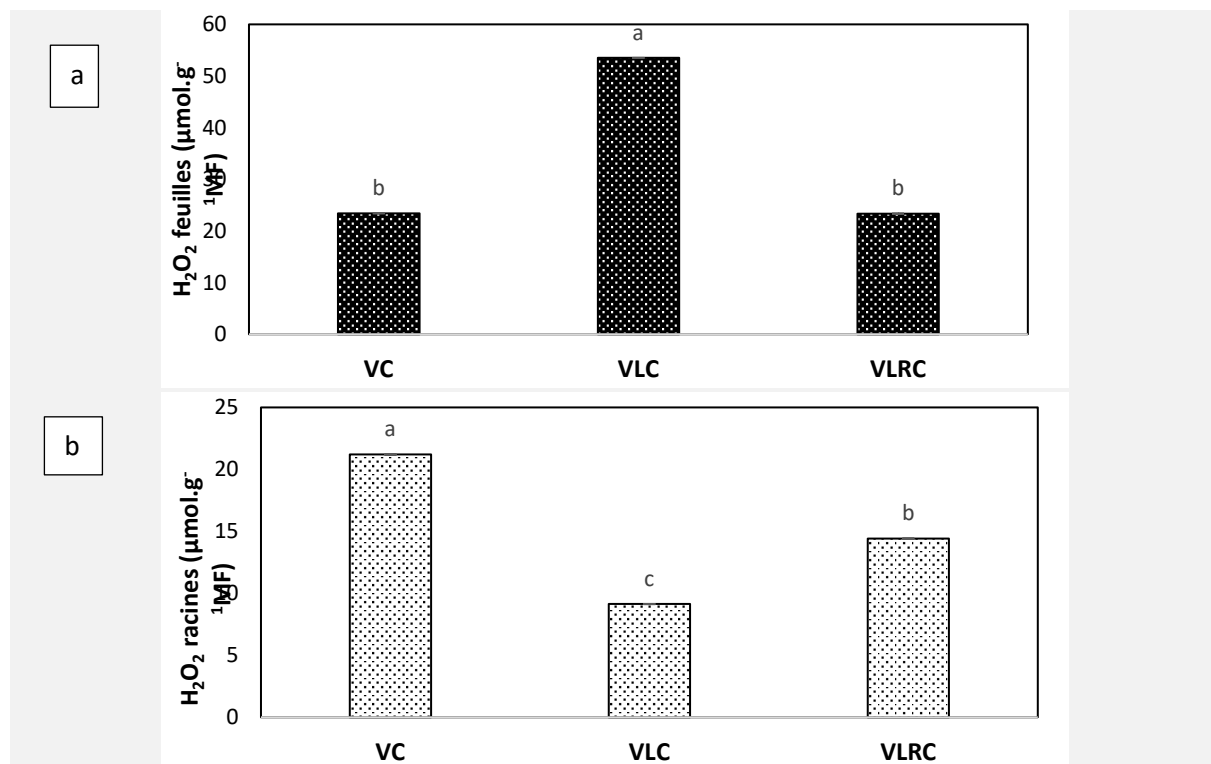


**Figure 1:** Variation du taux de MDA ( $\text{nmol mg}^{-1}$  de protéine) chez les feuilles (a) et les racines (b) de la vigne cultivé co-culture avec *M. sativa* sous un stress métallique par le Cd. VC: la vigne seule, VLC: la vigne avec la luzerne, VLRC: la vigne avec la luzerne et le rhizobium. Les données suivies de différentes lettres sont significativement différentes selon le test TUKEY,  $p < 0,05$

### 3.2. L'accumulation du peroxyde d'hydrogène

En présence de Cd dans le milieu de culture, l'analyse des résultats permet de constater une différence significative entre la vigne en monoculture et celles en culture intercalaire au niveau de la teneur en peroxyde d'hydrogène (figure 2). En effet, au niveau des feuilles de vigne, on remarque que la teneur en peroxyde d'hydrogène est fortement stimulée avec la culture de la luzerne (traitement VLC). Cependant, la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue considérablement dans les feuilles de vigne du traitement (VLRC) par rapport à celle du traitement (VLC), et se trouve similaire à celle du traitement monoculture (VC) (figure 2).

Au niveau des racines de vigne, on note une diminution significative de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les traitements en présence du couple *M. sativa*-rhizobium. Cette diminution (de l'ordre de 57%) est plus spectaculaire chez les racines de la vigne du traitement (VLC) par rapport au traitement monoculture. Avec le traitement (VLRC), le taux du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminue de 32% par comparaison avec le traitement monoculture (figure 2).

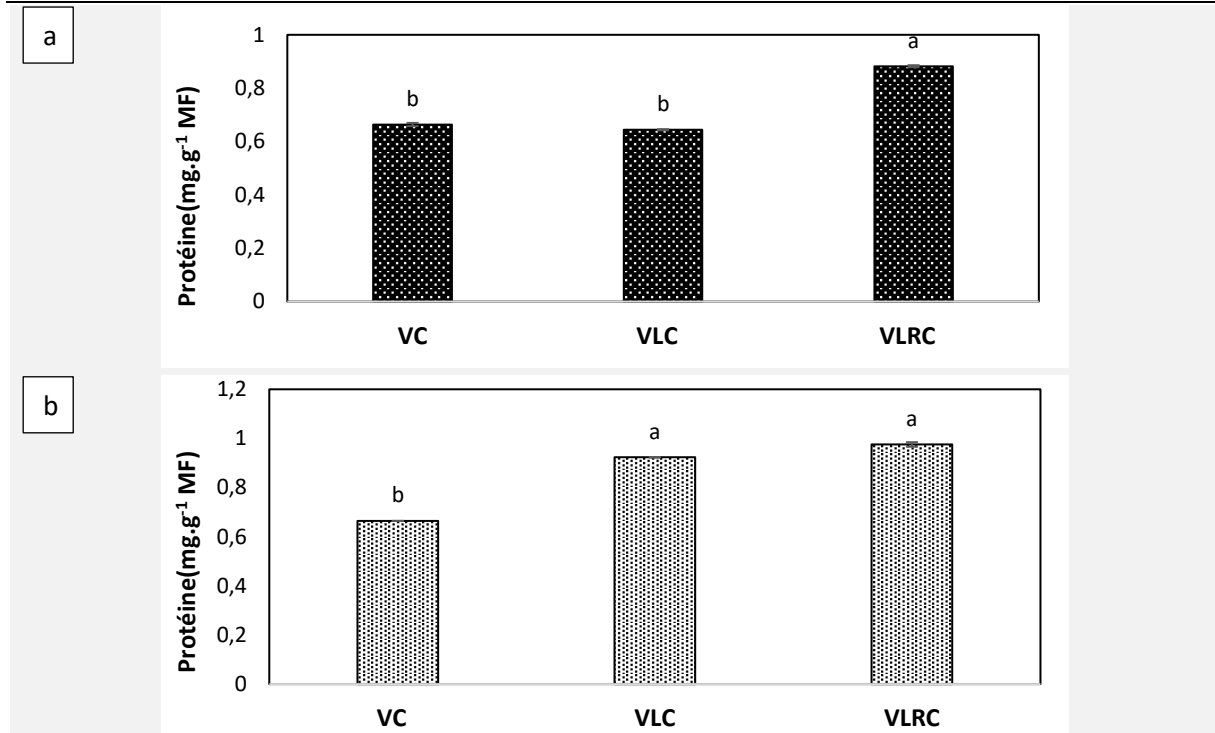


**Figure 2:** Variation de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (µmol. g<sup>-1</sup> MF) dans les feuilles (a) et les racines (b) de la vigne cultivé co-culture avec *M. sativa* et soumise à un stress métallique par le Cd. VC: la vigne seule, VLC: la vigne avec la luzerne, VLRC: la vigne avec la luzerne et le rhizobium. Les données suivies de différentes lettres sont significativement différentes selon le test TUKEY, p <0,05

### 3.3. Teneur en protéines solubles totales

L'ajout de 1 mM de Cd a induit l'évolution significative de taux des protéines solubles foliaires et racinaires chez *Vitis vinifera* cultivée en co-culture avec *Medicago sativa*. Au niveau foliaire, l'analyse statistique montre une augmentation significative de la teneur en protéine solubles chez la vigne de 'l'intercropping' (VLRC) par rapport aux traitements (VLC) et (VC). Cette augmentation est 33% plus élevée que la monoculture (figure 3).

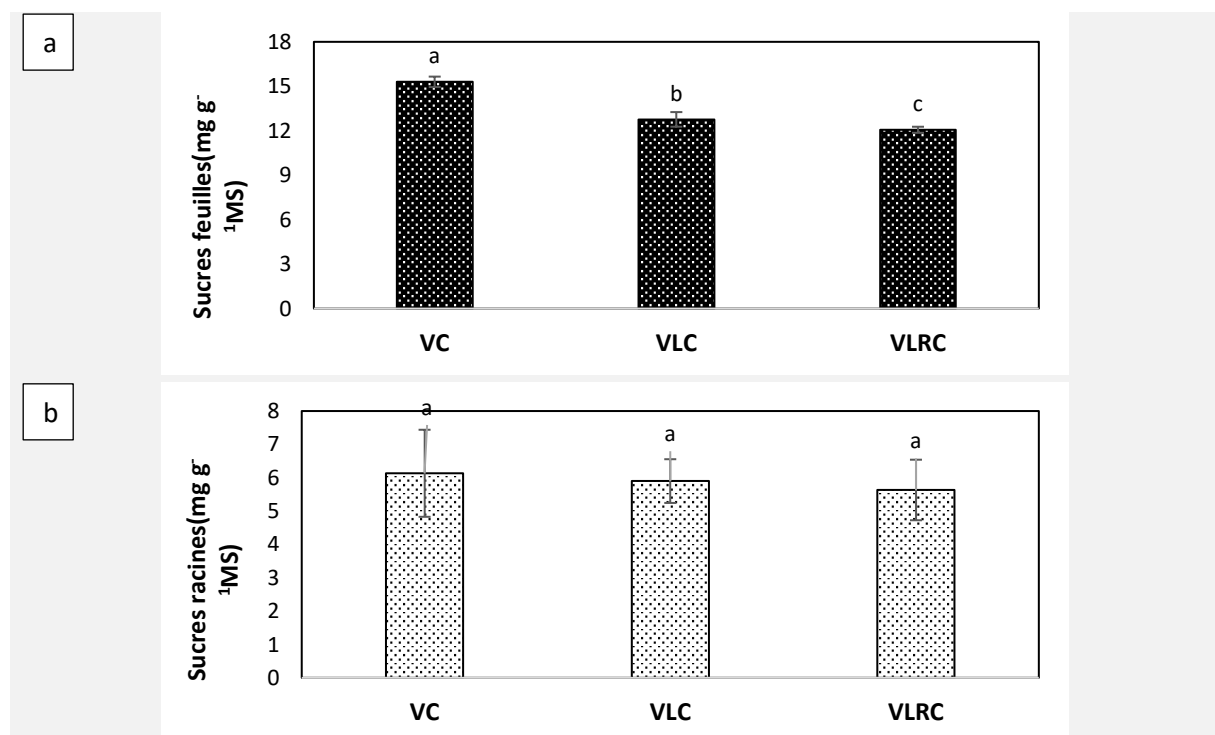
Au niveau racinaire, la présence de la luzerne avec et sans le rhizobium est plus spectaculaire chez la vigne des traitements (VLC) et (VLRC) par rapport à celle de la monoculture (VC), où le taux des protéines augmente par 47% par rapport au traitement (VC).



**Figure 3:** Variation de la teneur en protéines solubles totales (mg g<sup>-1</sup> MS) dans les feuilles (a) et les racines (b) de la vigne cultivé co-culture avec *M. sativa* et soumise à un stress métallique par le Cd. VC: la vigne seule, VLC: la vigne avec la luzerne, VLRC: la vigne avec la luzerne et le rhizobium. Les données suivies de différentes lettres sont significativement différentes selon le test TUKEY, p <0,05

### 3.4. Teneur en sucres totaux

La production des sucres totaux au niveau des feuilles de la vigne diminue considérablement dans la culture intercalaire par rapport à la monoculture. Cette diminution est plus prononcée en cas de la présence de la symbiose *Sinorhizobium-M. sativa* en culture avec la vigne. Par contre au niveau des racines, le système cultural n'a pas d'effet sur la production des sucres solubles (figure 4).



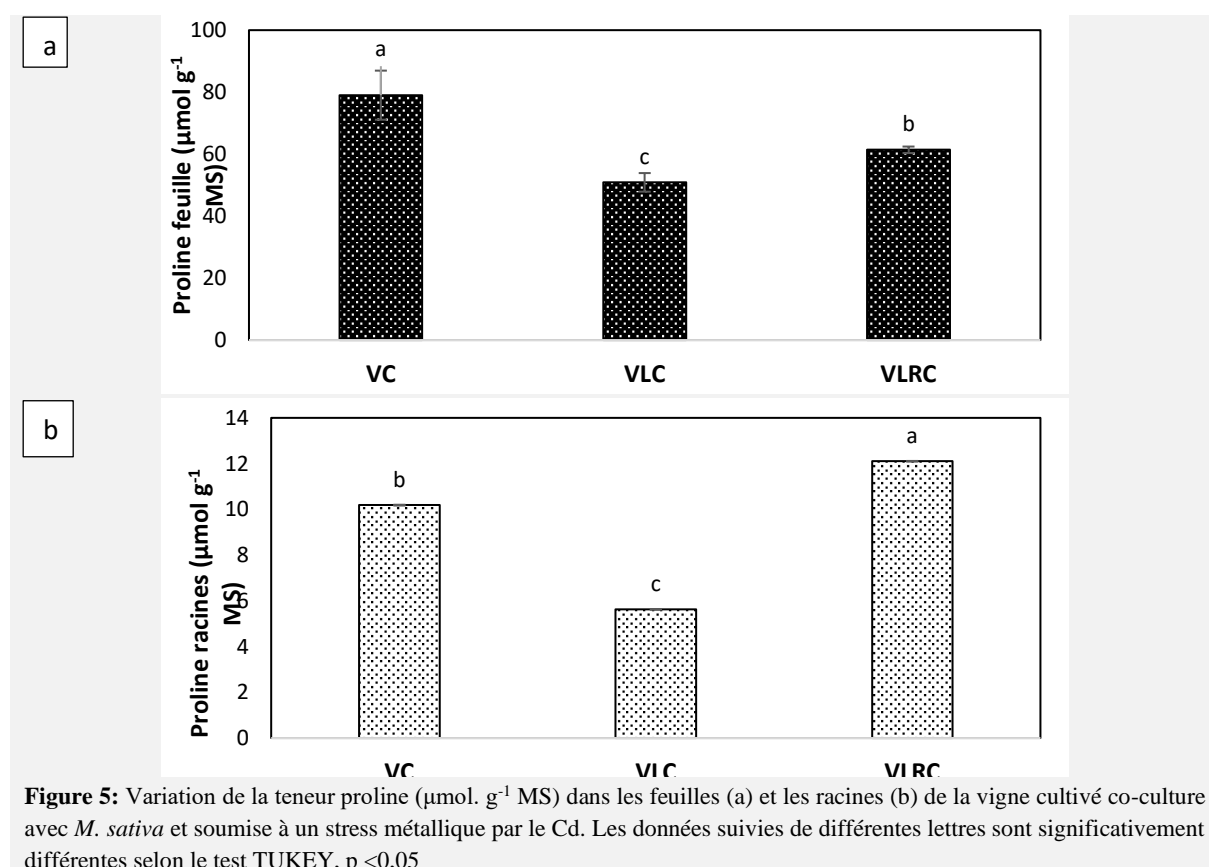
**Figure 4:** Variation de la teneur en sucres totaux (mg g<sup>-1</sup> MS) dans les feuilles (a) et les racines (b) de la vigne cultivé co-culture avec *M. sativa* et soumise à un stress métallique par le Cd. Les données suivies de différentes lettres sont significativement différentes selon le test TUKEY, p <0,05

### 3.5. Dosage de la proline

L'accumulation de la proline est considérée comme une des stratégies adaptatives déclenchées par la plante face aux contraintes environnementales. Elle est envisagée comme marqueur de résistance aux contraintes abiotiques.

L'analyse statistique a montré que le Cd a influencé significativement la teneur en proline. Une diminution des quantités de proline est enregistrée chez les feuilles de la vigne par rapport à la monoculture face à la concentration de Cd utilisée (figure 5). Toutefois, la diminution la plus remarquable chez les feuilles de la vigne est enregistrée en présence de la luzerne. Pareillement, en présence du couple symbiotique, la teneur foliaire en proline diminue par rapport à la celle de monoculture.

Aussi, les résultats montrent une diminution significative de la teneur racinaire en proline chez la vigne du traitement (VLC) par rapport au traitement monoculture. En outre, l'effet le plus spectaculaire de la concentration de Cd utilisée est observé chez les racines de vigne en présence du couple *M. sativa*-rhizobium.



### 4. Discussion

L'effet de la toxicité de Cd se résume principalement dans la diminution de la germination, de la croissance et du rendement des plantes. Au niveau cellulaire, cette toxicité se traduit par une réduction de l'activité photosynthétique, de l'altération de la nutrition minérale et de l'induction du stress oxydatif (Rizwan et al. 2017).

L'accumulation des métaux lourds tels que le Cd dans les sols pourrait affecter les mécanismes physiologiques et biochimiques des plantes. Il y a donc production d'espèces réactives de l'oxygène induisant un stress oxydatif dans la plante (Sandalo et al. 2001).

Dans notre étude, on a remarqué qu'en présence de Cd à une concentration de 1 mM, le taux foliaire de MDA chez la vigne a diminué en présence de *M. sativa* et son rhizobium. Des résultats similaires ont été noté par Ma et al. (2019) qui ont montré que *Helianthus annuus*, inoculé par une souche de pseudomonas et un champignon mycorhizien, présente un taux de MDA moins que les plantes non



inoculées et ça s'équivalait avec le principe de la culture associée. Ils ont montré aussi qu'en présence de Nickel, le taux de MDA augmente au niveau des racines et diminue au niveau des feuilles avec l'inoculation.

Les métaux lourds favorisent l'installation d'un état de stress oxydatif due à une surproduction des radicaux libres de l'oxygène (ROS) qui sont hautement toxiques. Grâce à leur pouvoir oxydant puissant, les ROS réagissent avec les biomolécules entraînant des modifications importantes telles que l'oxydation des protéines et la mutation des acides nucléiques et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (Shahid et al. 2020). L'austérité de ces dommages cellulaires dépend expressément de l'intensité du stress appliqué ainsi que le degré de la sensibilité des plantes vis-à-vis du stress (Jalleli 2018). Dans notre étude, la peroxydation d'hydrogène  $H_2O_2$  présente une variation significative entre les traitements. En appliquant du Cd, le taux de  $H_2O_2$  est élevé chez la vigne de la monoculture. Ce taux élevé est allégé par la co-culture avec *M. sativa* et le rhizobium, comme il a été mentionné par Mariem et al. (2014), qui ont montré que le taux de  $H_2O_2$  par fluorescence augmente en présence de concentrations croissantes de Cd. Ce taux diminue en inoculant les légumineuses par les rhizobiums spécifiques.

Les résultats de notre culture montrent que la co-culture de la vigne avec la luzerne avec/sans son rhizobium spécifique a allégé le stress protéique induit par l'ajout de 1mM du Cd chez les feuilles et les racines de vigne. Ceci se traduit par une augmentation de la teneur des protéines chez la vigne par rapport à la monoculture. Ces résultats peuvent être corrélés avec ceux de l'étude de Wang et al. (2020) qui ont montré que, sous stress cadmique, la culture intercalaire post-greffe de *Cosmos sulphureus* a augmenté de manière significative la teneur en protéines solubles. Aussi, une étude menée par Wu et al. (2019) sur les effets de la culture associée avec *Vigna radiata* et *Vigna umbellata* sur l'activité enzymatique antioxydante de *Cyphomandra betacea* soumis à un stress de Cd, a révélé que la culture intercalaire avec *V. umbellata* a augmenté la teneur en protéines solubles de 57,94% par rapport à la monoculture de *C. betacea*.

Dans notre étude, les résultats montrent que le taux foliaire des sucres solubles diminue en présence de la culture associée et le Cd. Ceci s'accorde avec l'étude de Ghaffarian et al. (2020) qui ont révélé que la culture en association de *Kochia (Kochia scoparia)* avec *Sesbania (Sesbania aculeata)* et *Guar (Cyamopsis tetragonolob)* en condition de salinité diminue la production des sucres solubles.

La proline est un acide aminé, qui a un effet très bénéfique sur les plantes exposées à diverses conditions de stress. La concentration de proline dans les cellules, les tissus et les organes végétaux est régulée par l'interaction de la biosynthèse, de la dégradation et du transport intercellulaire. Il est bien connue que la proline protège les plantes et l'intégrité de la membrane contre le stress, et stabilise les enzymes antioxydantes. Il agit également comme un régulateur osmotique cellulaire entre le cytoplasme et la vacuole, en détoxifiant les radicaux libres et en tamponnant le potentiel redox cellulaire, et en stabilisant le complexe de transport d'électrons (Ghaffari et al. 2021). Dans notre étude, on a enregistré une augmentation de la teneur foliaire et racinaire en proline chez la vigne du traitement de la co-culture ce qui pourrait mettre en évidence l'effet positif du système cultural adopté. En effet, Ghaffarian et al. (2020) ont montré que le taux de la proline diminue en présence de la co-culture de *Kochia* avec *Sesbania*, alors qu'il augmente en co-culture avec *Guar*.

## 5. Conclusion

Le système de culture en association a un effet efficace sur les paramètres biochimiques de la vigne sous stress métallique de Cd dans le sol. La présence de symbiose luzerne / rhizobium atténue ce stress via la fixation symbiotique de l'azote offrant des quantités supplémentaires d'azote dans le sol et la phytostabilisation de Cd impliqué. Il est nécessaire d'étudier en plein champs l'effet de 'l'intercropping' sur le rendement de la vigne ou d'autres arbres fruitiers et la fertilisation et la réhabilitation des sols.

## Références

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008)** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.
- Alia KV, Prasad SK, Saradhi PP (1995)** Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. *Phytochemistry*, 39(1), 45-47.
- Arfaoui M, Vallance J, Bruez E, Rezgui A, Melki I, Chebil S, Rey P (2019)** Isolation, identification and in vitro characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes. *Biological Control*, 129, 201-211.
- Bali AS, Sidhu GPS, Kumar V (2020)** Root exudates ameliorate cadmium tolerance in plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973)** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Bouamama-Gzara B, Selmi I, Chebil S, Melki I, Mliki A, Ghorbel A., ... & Mahfoudhi N (2017)** Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian Cultivar by Somatic Embryogenesis and Characterization of the Somaclones Using Ampelographic Descriptors. *The plant pathology journal*, 33(6), 561.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, vol. 72, p. 248.
- Brooker RW, Bennett AE, Cong WF, Daniell TJ, George TS, Hallett PD, ... White PJ (2015)** Improving intercropping: a synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist*, 206(1), 107-117.
- Carabalí MMS, García-Oliva F, Páez LEC, López-Lozano NE (2020)** Effect of Cadmium contamination on the rhizosphere bacterial diversity of *Echinocactus platyacanthus*. *Rhizosphere*, 13, 100187.
- Chakrabarty D (2009)** Comparative study on some organic manure commonly used in aquaculture. *Our Nature*, 7(1), 163-167.
- Ghaffari H, Tadayon MR, Bahador M, Razmjoo J (2021)** Investigation of the proline role in controlling traits related to sugar and root yield of sugar beet under water deficit conditions. *Agricultural Water Management*, 243, 106448.
- Ghaffarian MR, Yadavi A, Dehnavi MM, Nassab AD M, Salehi M (2020)** Improvement of physiological indices and biological yield by intercropping of *Kochia* (*Kochia scoparia*), *Sesbania* (*Sesbania aculeata*) and *Guar* (*Cyamopsis tetragonoloba*) under the salinity stress of irrigation water. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7), 1319-1330.
- Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G (2015)** Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*, 20(3), 186-194.
- Groupement Interprofessionnel de Fruits (GIFRUIT) (2016)** Manuel de bonnes pratiques agricoles. Raisin de table. Ministère de l'Agriculture, des Ressources hydrauliques et de la Pêche Tunisie.
- Huybrechts M, Cuypers A, Deckers J, Iven V, Vandionant S, Jozefczak M, Hendrix S (2019)** Cadmium and plant development: an agony from seed to seed. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3971.
- Jalleli K (2018)** « Impacts des pesticides sur la germination et la croissance des légumineuses à graines et fourragères », thèse de doctorat en sciences biologiques, sous la direction de Professeur Haythem Mhedhbi, Tunis, Faculté des sciences de Tunis, Université de Carthage, 154p.
- Jiang Q, Zhao Y, Zhang X, Yang X, Chen Y, Chu Z, ... You J (2019)** Surface passivation of perovskite film for efficient solar cells. *Nature Photonics*, 13(7), 460-466.
- Lebrazi S, Fikri-Benbrahim K (2018)** Rhizobium-Legume Symbioses: Heavy metal effects and principal approaches for bioremediation of contaminated soil. In *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (pp. 205-233). Springer, Singapore.

- Ma Y, Rajkumar M, Oliveira RS, Zhang, C, Freitas H (2019)** Potential of plant beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of metal-contaminated saline soils. *Journal of hazardous materials*, 379, 120813.
- Mariem W, Kilani BR, Benet G, Abdelbasset L, Stanley L, Charlotte P, ... Tahar G (2014)** How does NaCl improve tolerance to cadmium in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*?. *Chemosphere*, 117, 243-250.
- Mielmann A (2013)** The utilisation of lucerne (*Medicago sativa*): a review. *British Food Journal*.
- Rizwan M, Ali S, Adrees M, Ibrahim M, Tsang DC, Zia-ur-Rehman M, ... Ok YS (2017)** A critical review on effects, tolerance mechanisms and management of cadmium in vegetables. *Chemosphere*, 182, 90-105.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, Del Rio LA (2001)** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*, 52(364), 2115-2126.
- Shahid M, Niazi NK, Rinklebe J, Bundschuh J, Dumat C, Pinelli E (2020)** Trace elements-induced phytohormesis: A critical review and mechanistic interpretation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(19), 1984-2015.
- Wang X, Xu X, Xiao Y, Wei X, Wang Y, Liao MA (2020)** Effects of intercropping with post-grafting generation of *Cosmos sulphureus* on physiological and growth of grape seedling under cadmium stress. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 474, No. 2, p. 022004). IOP Publishing.
- Wang Y, Liu Y, Zhan W, Zheng K, Wang J, Zhang C, Chen R (2020)** Stabilization of heavy metal-contaminated soils by biochar: Challenges and recommendations. *Science of the Total Environment*, 729, 139060.
- Wu C, Liu J, Sun J, Yang L, Lin L (2019)** Effects of intercropping with *Vigna radiata* and *Vigna umbellata* on antioxidant enzyme activity of *Cyphomandra betacea* seedlings under cadmium stress. *E&ES*, 233(4), 042019.
- Yemm EW, Willis A (1954)** The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508-514.
- Zhang H, Reynolds M (2019)** Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Science of the Total Environment*, 678, 761-767.
- Zhu S, Ma X, Guo R, Ai S, Liu B, Zhang W, Zhang Y (2016)** A field study on heavy metals phytoattenuation potential of monocropping and intercropping of maize and/or legumes in weakly alkaline soils. *International journal of phytoremediation*, 18(10), 1014-1021.