

UMR INRA EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N, C, S
Université de Caen/Basse –Normandie
Institut National Agronomique Paris-Grignon

Thèse présentée par

Philippe MALAGOLI

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Option : Agronomie

Spécialité : Productions végétales

Modélisation de l'absorption de l'azote nitrique, de son allocation et de sa remobilisation chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) de la reprise de végétation au stade maturité des graines

Soutenue à Paris le **23 septembre 2004**, devant la commission d'examen composée de :

B. NEY, Professeur des Universités, INA P-G	Examineur
A. OURRY, Professeur des Universités, Université de Caen	Examineur
X. PINOCHET, Ingénieur, CETIOM	Examineur
C. SALON, Chargé de Recherches, INRA, Dijon	Rapporteur
B. TOURAINE, Professeur des Universités, Université de Montpellier II	Rapporteur

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur J. BOUCAUD qui m'a accueilli au sein de l'UMR INRA-UCBN 950 EVA et nutrition NCS à l'Université de Caen pour la réalisation de mon stage de DEA puis pour le début de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur le Professeur B. NEY pour m'avoir permis d'accéder à la formation du DEA « biologie, diversité et adaptation des plantes cultivées » de l'INA P-G ainsi que pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard pour le déroulement de la thèse.

Je suis très honoré que Monsieur le Professeur B. TOURAINE et Monsieur C. SALON aient accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire. Je remercie également Monsieur X. PINOCHET qui a bien voulu se joindre aux membres du jury afin de porter un regard critique sur mon travail.

Au terme de ce travail, j'exprime ma gratitude et ma reconnaissance à Monsieur le Professeur A. OURRY pour avoir accepté de diriger mes recherches et de m'avoir associé à un sujet nouveau au sein de l'unité. J'ai été sensible à l'intérêt que tu as constamment porté à mon travail, se manifestant entre autres par une source intarissable d'idées et de conseils qui m'ont été bénéfiques, notamment lors de la rédaction du manuscrit.

J'exprime mes remerciements vifs et sincères à Monsieur P. LAINE et Monsieur E. LE DEUNFF pour l'aide, la patience et les conseils qu'ils ont su m'apporter dans un premier temps lors de la réalisation de mon stage de DEA puis tout au long de ma thèse. Philippe, j'ai particulièrement apprécié ta gentillesse et ton esprit de rigueur qui m'ont permis, je l'espère, de progresser.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers Madame M-P HENRY pour m'avoir fait bénéficier de son expertise technique avec beaucoup de disponibilité lors de l'utilisation du spectromètre de masse, envers Monsieur P. BEAUCLAIR pour m'avoir apporté son concours technique, notamment lors de mesures de photosynthèse, envers Mademoiselle C. LE DANTEC pour son aide en biologie moléculaire. Par ailleurs, je souhaite aussi remercier Mademoiselle C. GOURBE pour son efficacité souvent salvatrice dans le domaine administratif, Madame M. COUSTENOBLE pour sa participation active aux récoltes ainsi qu'aux broyages des échantillons et Monsieur D. BALLOIS pour toutes ses solutions « bricolage ».

De façon plus générale, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont apporté leur aide et leur bonne humeur tout au long de ces quatre années parmi lesquelles Florence PAYNEL pour son indéfectible soutien, Carine NOQUET pour sa bonne humeur lors de l'expérimentation de plein champ et pendant les stages du CIES mais aussi Bertrand LASSEUR, Fabien LESUFFLEUR, Véronique AMIARD et Estelle GOULAS pour leur inébranlable humour.

Enfin, un grand merci à ma famille et en particulier à mes parents et à mon frère, Guillaume.

Ala	Alanine
Asp	Acide aspartique
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
CETIOM	Centre d'études techniques interprofessionnel des oléagineux métropolitains
CHATS	Constitutive high affinity transport system
CLATS	Constitutive low affinity transport system
CI	Control index
DW	Dry weight
GDH	Glutamate déshydrogénase
GS	Glutamine synthase
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
IHATS	Inducible high affinity transport system
ILATS	Inducible low affinity transport system
Im	Influx maximal
Km	Constante apparente d'affinité
LAD	Leaf area duration
LAI	Leaf area index
LR	Leaf rank
MF	Matière fraîche
MS	Matière sèche
NHI	Nitrogen harvest index
NR	Nitrate réductase
NUE	Nitrogen use efficiency
PAR	Photosynthetically active radiations
PCR	Polymerase chain reaction
PVC	Polyvinyl chlorure
QTL	Quantitative trait loci
RT	Reverse transcriptase
SAG	Senescence associated genes
SI	Standart influx
Vmax	Vitesse maximale
VSP	Vegetative storage protein

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
I. Analyse bibliographique.....	5
A. Mécanismes et régulations de l'absorption du NO₃⁻ chez les végétaux supérieurs.....	5
1. Systèmes de transport impliqués.....	5
a. Caractérisation physiologique.....	5
b. Caractérisation fonctionnelle.....	6
c. Caractérisations moléculaires.....	7
2. Régulation de l'absorption du nitrate.....	8
a. Par le nitrate racinaire endogène.....	9
b. Par les produits d'assimilation du nitrate et/ou de la photosynthèse.....	11
c. Par des facteurs environnementaux : la température.....	16
B. Etude de l'absorption du nitrate et répartition de l'azote au sein d'une culture de colza d'hiver au cours d'un cycle de culture.....	16
1. Absorption du nitrate.....	16
2. Répartition et efficacité d'utilisation de l'azote absorbé chez le colza d'hiver.....	18
a. Du semis au stade reprise de végétation (C1).....	18
b. De la reprise de végétation (C1) jusqu'au stade fin de montaison (E).....	18
c. Du stade floraison (F) jusqu'à la récolte (G5).....	19
3. Dynamique du recyclage de l'azote des différents rangs foliaires.....	21
C. Modélisation de l'absorption de l'azote et de sa répartition au sein de la plante.....	22
1. Modèle d'absorption.....	22
a. Approche agronomique.....	22
b. Approche physiologique.....	24
c. Intégration de régulations s'exerçant sur l'activité des systèmes de transport.....	26
2. Modèle de répartition de l'azote.....	26
a. Période végétative.....	27
b. Période reproductrice.....	28
D. Conclusions et objectifs de recherche.....	29
II. Matériels et méthodes.....	31
A. Matériel végétal, conditions de culture et protocoles expérimentaux.....	31
1. Conditions de culture en milieu hydroponique.....	31
a. Au laboratoire.....	31
b. Au champ (Expérimentation 3).....	32
2. Protocoles expérimentaux.....	32
a. Effets des facteurs environnementaux et endogènes sur l'influx de NO ₃ ⁻ (Expérimentations 1 et 2; Figure II.2).....	32
b. Mesure de l'influx du NO ₃ ⁻ par marquage ¹⁵ N (Expérimentations 1 et 2).....	33
c. Mesure par marquage ¹⁵ N des transferts d'azote au sein du végétal depuis la reprise de végétation jusqu'au stade maturité des graines en conditions de plein champ (Expérimentation 3 ; Figure II.4).....	34
B. Méthodes d'analyse et de calcul.....	35
1. Extraction et dosage du nitrate présent dans le sol.....	35
2. Dosage de l'azote total et analyse isotopique ¹⁵ N/ ¹⁴ N.....	35
3. Méthode de calcul de l'influx de ¹⁵ NO ₃ ⁻ (Expérimentations 1 et 2).....	36
4. Détermination de la répartition de l'azote issu de l'absorption et de l'azote endogène (Expérimentation 3).....	37
5. Exploitation statistique.....	38
C. Construction des modèles.....	38
1. Modèle d'absorption du NO ₃ ⁻	38
a. Bases du modèle.....	38
b. Intégration des variables environnementales et endogènes.....	39
c. Calcul de l'absorption simulée non régulée et régulée.....	39

d.	Variables d'entrée et de sorties	40
e.	Hypothèses de fonctionnement du modèle	41
2.	Modèle de répartition de l'azote absorbé de la reprise de végétation jusqu'au stade maturité des graines	43
a.	Modélisation des flux d'azote dans chaque organe.....	43
b.	Hypothèses de fonctionnement du modèle.....	45
III. Modeling N uptake in Brassica napus L. cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data..... 47		
A. Introduction 49		
B. Materials and methods..... 51		
1.	Physiological experiments	51
a.	Plant culture	51
b.	Experimental treatments for NO ₃ ⁻ influx measurements	52
c.	Measurement of NO ₃ ⁻ influx and harvest	53
d.	Total nitrogen and isotopic analyses	53
e.	Statistical analysis	54
2.	Model description	54
a.	Kinetic equations of nitrate transport systems.....	54
b.	Response curves of endogenous and environmental effects on HATS and HATS+LATS	55
c.	Introduction of auxiliary variables in the model	55
d.	Calculation of unregulated and regulated uptake	56
e.	Sources of input variables	56
f.	Basic assumptions for model construction	57
C. Results 58		
1.	Effect of environmental and endogenous factors on NO ₃ ⁻ influx.....	58
a.	Effect of light/darkness cycle (Experiment 1).....	58
b.	Effect of root temperature (Experiment 2)	59
c.	Effect of ontogeny (Experiment 3).....	59
d.	Effect of photosynthetically-active radiation (Experiment 4)	59
2.	Modeling N uptake during the growth cycle.....	60
a.	Individual effects.....	60
b.	Cumulative effect and the effect of N fertilization levels on NO ₃ ⁻ uptake	60
c.	Simulation of the relative contribution of each transport system to total N uptake.....	61
d.	Sensitivity analysis.....	62
D. Discussion 62		
1.	Effect of endogenous and environmental factors on NO ₃ ⁻ influx.....	62
2.	Modeling of N uptake by an oilseed rape crop	65
IV. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest I. Global N fluxes between vegetative and reproductive tissues in relation with leaf fall and their residual N..... 69		
A. Introduction 72		
B. Materials and methods..... 74		
1.	Crop culture	74
2.	Experimental treatment, labelling and harvest	74
3.	Chemical analysis and calculation of N fluxes	75
4.	Statistical analysis.....	76
C. Results 77		
1.	Dry matter production.....	77
2.	Apparent N accumulation/mobilization	77
3.	Dry matter and total N content patterns in dead leaves.....	78
4.	Partitioning of N taken up.....	78
5.	Partitioning of mobilized N.....	79
6.	N dynamics in each leaf rank (LR)	80

D. Discussion	81
V. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (<i>Brassica napus L.</i>) from bolting to harvest II. A ¹⁵N labelling based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues.	86
A. Introduction	88
B. Material and methods	91
1. Experiment design	91
2. Model description	91
3. Modelling total N in each tissue (Figure V.1).....	92
4. Allocation of N derived from uptake (Figure V.1)	92
5. Allocation of N flow derived from endogenous mobilization (Figure V.1).....	93
6. Assumptions of the model.....	94
7. Description of simulations	94
C. Results	95
1. Nitrogen flows in different tissues and deduced parameters.....	95
2. Endogenous amino-acids pool circulating at the whole plant level and relationships with current N uptake	97
3. Which processes to improve in order to increase pod N filling?	97
D. Discussion	99
1. Endogenous N pool circulating at the whole plant level.....	100
2. Agronomic applications	101
3. Conclusions.....	102
VI. Discussion générale	104
A. Régulation de l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture	106
1. de quantifier l'impact de chaque variable environnementale et endogène sur l'absorption du nitrate pendant le cycle de culture à l'échelle de la plante entière.	106
a. Cycle nyctéméral et rayonnements photosynthétiquement actifs (PAR)	106
b. Cycle ontogénétique (Figure III. 1C) :	108
c. Température :	110
2. de déterminer l'impact de l'ensemble des facteurs sur l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture.....	110
3. de quantifier la participation relative de chaque système de transport à l'absorption et leur durée d'activité au cours du cycle de culture à l'échelle du système racinaire.....	112
B. Etude de la dynamique de l'allocation et de la remobilisation de l'azote à partir de la reprise de végétation	113
1. Dynamique de l'azote	113
a. la contribution significative du compartiment foliaire au remplissage en azote des siliques.	114
b. la dynamique complexe de l'azote à l'intérieur du compartiment foliaire , se manifestant par des comportements différents entre les rangs de feuilles vis à vis de l'azote issu de l'absorption et/ou de la remobilisation.	114
2. Quantification du pool d'azote endogène libre circulant	117
3. Applications agronomiques.....	119
VII. Perspectives	120
A. Absorption du nitrate par le colza et régulations associées	120
B. Remobilisation de l'azote chez le colza : variabilité environnementale et génotypique.	122
VIII. Références bibliographiques	125

INTRODUCTION GENERALE

La culture de colza (*Brassica napus* L.), espèce issue de l'hybridation naturelle du chou (*Brassica oleacifera* L.) et de la navette (*Brassica rapa* L.), a connu un essor très important en France depuis les années 1960. En effet, la surface française emblavée de colza est passée de 50 000 ha à 1 000 000 ha en 2003, représentant ainsi 38 % de la surface consacrée à cette culture en Europe.

Cette extension s'explique par les débouchés alimentaires et industriels multiples qu'offre cette culture. Le colza est traditionnellement cultivé pour ses graines qui contiennent environ 50 % d'une huile de bonne qualité à destination de l'alimentation humaine. Après extraction de l'huile par pression, le résidu de la graine, le tourteau, riche en protéine (40 % de la matière sèche), est utilisé pour l'alimentation animale. L'huile de colza est également utilisée dans diverses applications industrielles : le biocarburant (diester), la fabrication d'agents anti-poussières, de lubrifiants et en lipochimie.

D'un point de vue agronomique, l'implantation du colza d'hiver pendant la période d'interculture (saison automno-hivernale) a d'abord été envisagée comme un moyen de constituer un bon précédent cultural dans les assolements céréaliers, améliorant ainsi le rendement des cultures principales. Par la suite, le colza a aussi été implanté pendant cette même période afin de « séquestrer » le nitrate présent dans la solution du sol, issu de la minéralisation de la matière organique pendant l'automne, empêchant ainsi la lixiviation de ce dernier dans les nappes aquifères. En effet, la famille des Brassicacées, et en particulier le colza, présente de fortes capacités à prélever le nitrate comparativement à d'autres familles botaniques telles que les Fabacées, les Poacées ou encore les Hydrophyllacées. La capacité du colza à prélever le nitrate est d'autant plus élevée que le semis est effectué précocement. Cependant, une tendance relativement récente consiste à réduire les quantités d'intrants azotés pour cette culture en interdisant tout épandage d'engrais azoté avant la reprise de végétation printanière. Néanmoins, les apports azotés pour la culture de colza restent importants, 180 kg N.ha⁻¹ constituant la fertilisation moyenne classiquement utilisée pour obtenir un rendement optimal (compris entre 30 et 40 quintaux par hectare). Par ailleurs, l'élaboration par le CETIOM d'une « réglette azote », permettant de calculer les doses d'azote en fonction des

besoins de la culture (définis par la production de biomasse), a contribué à améliorer la gestion des intrants azotés. Toutefois, l'extension de cette culture et les restitutions importantes d'azote liées à celle-ci conduisent à un bilan azoté défavorable pour l'environnement. En effet, l'efficacité du transfert de l'azote vers les tissus récoltés (essentiellement les siliques) est relativement faible. La perte d'azote par minéralisation des feuilles mortes, qui chutent avec des teneurs élevées en azote (de l'ordre de 4,5 %), peut représenter 160 kg N.ha⁻¹. Il a été clairement établi que les basses températures survenant pendant la période automno-hivernale étaient à l'origine de la chute anticipée des feuilles de la rosette, conduisant ainsi à un relargage d'azote, principalement sous forme organique. Seule, une faible fraction de cet azote, qui peut atteindre jusqu'à 100 kg N.ha⁻¹, est ultérieurement réabsorbée par la culture. La chute des feuilles observée à partir de la floraison peut également entraîner une restitution d'azote dans l'environnement (de l'ordre de 60 kg N.ha⁻¹). La limitation du vidage en azote des feuilles (organes sources), suite à leur chute prématurée, pourrait s'expliquer par l'intervention de facteurs environnementaux (déficit hydrique, diminution drastique du rayonnement à l'intérieur du couvert) et/ou endogènes (synthèse de phytohormones : acide jasmonique par exemple). Par ailleurs, les fortes teneurs en azote observées au moment de leur chute pourraient aussi résulter d'un asynchronisme entre le début de la mobilisation de l'azote à partir des organes sources (feuilles) et le début du remplissage en azote des organes puits (siliques), privilégiant dans ce cas l'hypothèse d'une limitation de la mobilisation azotée foliaire par les puits.

Par conséquent, la réduction de la pollution environnementale par l'azote sous culture de colza nécessite une optimisation de la gestion des intrants azotés en adaptant par exemple les dates d'apports d'engrais azotés ainsi que les niveaux de fertilisation utilisés aux besoins de la culture. De ce fait, il apparaît nécessaire d'étudier l'impact des différents facteurs environnementaux et endogènes susceptibles d'intervenir au cours du cycle de culture sur le prélèvement d'azote. Par ailleurs, la compréhension de la stratégie d'allocation de l'azote à partir de la reprise de végétation printanière devrait permettre une meilleure valorisation de l'azote vers les tissus récoltés et peut-être fournir des indicateurs de fonctionnement utilisables en sélection.

Dans un premier temps, notre travail a donc consisté à élaborer un modèle mécaniste original de l'absorption du nitrate basé sur l'activité des différents systèmes racinaires de transport présents chez le colza et la disponibilité en nitrate de la solution du sol. L'impact des

différents facteurs environnementaux et endogènes sur l'activité des systèmes de transport du nitrate a ensuite été déterminé, puis intégré dans le modèle. Il est ainsi possible, d'une part, de quantifier le poids respectif de chacun de ces facteurs sur le prélèvement d'azote et, d'autre part, de déterminer la contribution relative des différents systèmes de transport au cours du cycle de culture. L'originalité de cette approche réside dans le fait de combiner des données obtenues en conditions contrôlées (cinétique de fonctionnement des transporteurs, lois d'action des facteurs du milieu) pour modéliser le prélèvement d'azote au champ et sur le cycle de culture en utilisant la banque de données colza de l'INRA (<http://www-grignon.inra.fr>).

Dans un deuxième temps, une approche complémentaire visant à quantifier la dynamique de l'allocation et de la remobilisation de l'azote au sein des différents tissus, et plus particulièrement entre les différents étages foliaires au cours du développement de la plante, a été réalisée en conditions de plein champ. La contribution de l'azote exogène à la formation des différents organes au cours du cycle de culture a été estimée grâce à un marquage $K^{15}NO_3$ effectué toutes les semaines, du stade « reprise de végétation » jusqu'au stade « fin de remplissage des siliques ». La distribution du traceur entre les différents organes a permis de déterminer très précisément l'allocation de l'azote absorbé et de déduire le recyclage interne pour chacun d'eux. Les résultats obtenus ont permis de construire un modèle descriptif (module répartition) de la dynamique de l'azote absorbé (sortie du module absorption) et de sa mobilisation au sein d'une population de colza au cours d'un cycle de culture.

Le manuscrit se décompose en une analyse bibliographique permettant de préciser les objectifs de recherche de ce travail, d'une description des méthodologies utilisées alors que les résultats, précédant une discussion générale conduisant à la présentation des perspectives de recherche, sont exposées au travers des trois articles scientifiques suivants :

- **Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B. and A. Ourry**, 2004. Modeling N uptake in *Brassica napus* L. cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. **Plant Physiology**, 134: 388-400.
- **Malagoli P., Lainé P., Rossato L. and A. Ourry**, 2004. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest. I.

Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest. Soumis à **Annals of Botany**.

- **Malagoli P. Lainé P., Rossato L. & A. Ourry**, 2004. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest. II. A ¹⁵N labelling based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) from bolting to harvest. Soumis à **Annals of Botany**.

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à l'attribution d'une allocation de recherche du Ministère de l'Education nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT) dans le cadre de l'Ecole Doctorale ABIES.

CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

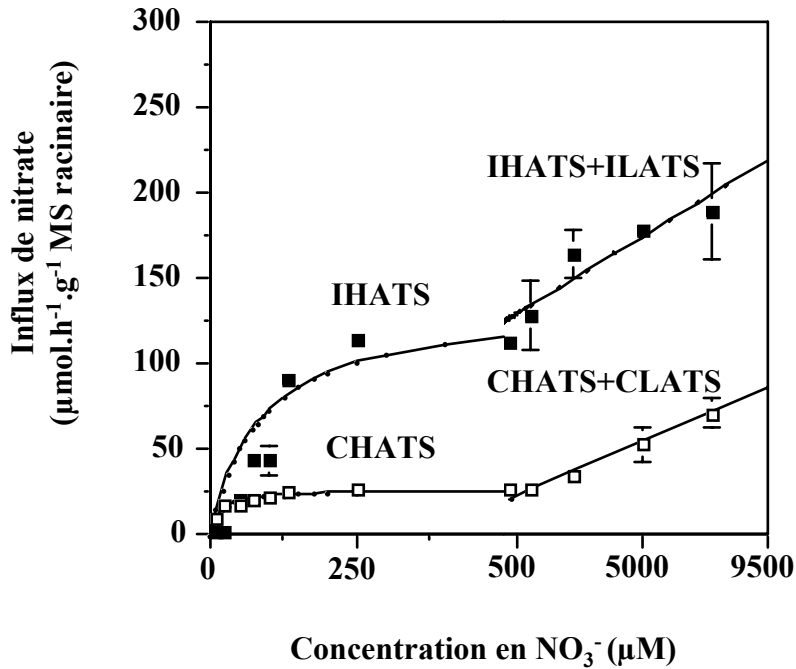


Figure I.1 : Cinétiques d'absorption du nitrate par les composantes constitutives (C) et inducibles (I) des systèmes de transport HATS et LATS chez *Brassica napus* L. en fonction de la concentration en NO₃⁻ de la solution nutritive. L'activité réelle des systèmes d'absorption LATS est obtenue en déduisant les valeurs d'influx des systèmes HATS aux valeurs d'influx obtenues pour les systèmes HATS + LATS. Chaque barre verticale représente l'écart-type de la moyenne pour n=3, lorsqu'elle est plus grande que le symbole. D'après Faure-Rabasse *et al.* (2002).

I. Analyse bibliographique

A. Mécanismes et régulations de l'absorption du NO_3^- chez les végétaux supérieurs

1. Systèmes de transport impliqués

a. *Caractérisation physiologique*

Il a été clairement établi chez les végétaux supérieurs, que l'absorption du nitrate est sous la dépendance de deux systèmes de transport, que les plantes soient préalablement cultivées en présence (plantes induites) ou en absence (plantes non induites) de nitrate (voir la revue de Forde, 2002). Ces systèmes présentent une affinité différente pour le nitrate : le système à forte affinité est responsable de l'absorption pour de faibles concentrations (en général $[\text{NO}_3^-] \leq 500 \mu\text{M}$) et le système à faible affinité intervient pour des concentrations supérieures à 1 mM.

- Système à forte affinité et de faible capacité d'absorption (HATS)

Le système de transport HATS (High Affinity Transport System) suit une cinétique de type Michaelis-Menten et il est saturable à partir de concentrations en NO_3^- atteignant 200 à 500 μM selon les espèces étudiées (Doddema et Telkamp, 1979). La cinétique d'absorption du système HATS peut être caractérisée par deux paramètres, la constante apparente d'affinité (K_m) et l'influx maximal (I_m). Les cinétiques d'absorption du HATS récemment déterminées chez le colza par Faure-Rabasse *et al.* (2002) ont révélé que l'influx maximal de NO_3^- chez les plantes préalablement cultivées en présence de nitrate présentait une valeur élevée comparativement à celle mesurée chez les plantes cultivées en l'absence de NO_3^- (Figure I.1). Mäck et Tischner (1990) en utilisant un analogue structural, la p-fluorophénylalanine qui empêche la synthèse de protéines fonctionnelles en se substituant à la phénylalanine (acide aminé supposé intervenir fréquemment dans la constitution des sites actifs des transporteurs anioniques animaux ou végétaux), ont pu inhiber chez l'orge l'augmentation de la vitesse d'absorption lorsque les plantes sont réalimentées avec une solution nutritive contenant du nitrate. Comme pour l'ensemble des végétaux étudiés jusqu'à présent, le système de transport, agissant pour de faibles concentrations en nitrate chez le colza, serait constitué d'une composante exprimée de façon constitutive appelée " CHATS "

(Constitutive High Affinity Transport System) et d'une composante inductible appelée "IHATS" (Inducible High Affinity Transport System), nécessitant la synthèse de protéines fonctionnelles (Figure I.1).

- Système à faible affinité et de forte capacité d'absorption (LATS)

Pour de fortes concentrations de nitrate (>900 μM), Faure-Rabasse *et al.* (2002) ont montré chez le colza que l'influx de NO_3^- est proportionnel à la concentration en nitrate dans le milieu extérieur. En effet, le système de transport LATS n'est pas saturable par le nitrate. Il est généralement admis que ce système est exprimé de façon constitutive (Siddiqi *et al.*, 1990 ; Glass et Siddiqi, 1995). Cependant, les mesures d'influx réalisées chez des jeunes plantes de colza préalablement cultivées en présence ou en absence de NO_3^- , bien que controversées, semblent indiquer la présence d'un système constitutif CLATS et d'un système ILATS induit par la présence de NO_3^- (Figure I.1 ; Faure-Rabasse *et al.*, 2002). Par ailleurs, les études moléculaires effectuées chez diverses espèces confirment l'existence d'un système LATS inductible (*Hordeum vulgare* : Huang *et al.*, 1999 ; *Nicotiana plumbaginifolia* : Fraisier *et al.*, 2001 ; *Arabidopsis thaliana* : Okamoto *et al.*, 2003). De plus, l'obtention de mutants déficients en systèmes de transport HATS chez *Arabidopsis thaliana* a permis de montrer que le système LATS interviendrait également pour de faibles concentrations en nitrate dans le milieu extérieur (Okamoto *et al.*, 2003).

b. Caractérisation fonctionnelle

Le nitrate, pour être absorbé, doit être transporté contre un gradient de potentiel électrochimique négatif et contre un gradient de concentration. Le cytosol des cellules racinaires est chargé négativement (-100 à -250 mV) par rapport au milieu extérieur et la concentration en NO_3^- des cellules racinaires (de l'ordre du mM) est généralement beaucoup plus élevée que dans le milieu extérieur. Ceci implique que le transport du nitrate est actif et nécessite de l'énergie (Crawford, 1995). Celle-ci est fournie par une hydrolyse d'ATP au niveau des pompes H^+ -ATPases situées au niveau du plasmalemme. Une alcalinisation du milieu extérieur ainsi qu'une dépolarisation transitoire de la membrane durant l'absorption racinaire de NO_3^- suggèrent que le système de transport, HATS, nécessitent un cotransport H^+/NO_3^- ou $\text{OH}^-/\text{NO}_3^-$. L'utilisation de différents inhibiteurs des pompes H^+ -ATPases réduit l'absorption du nitrate et la repolarisation de la membrane plasmique démontrant ainsi que le transport du nitrate est un symport couplé aux protons (voir revue de Ourry *et al.*, 1997). Ce symport implique 2 H^+ pour 1 NO_3^- (Glass *et al.*, 1992), ce qui expliquerait la dépolarisation.

c. *Caractérisations moléculaires*

- Famille de gènes codant les systèmes de transport à forte affinité (HATS)

Les systèmes de transport HATS sont codés par la famille des gènes *nrt2*. Le premier gène a été isolé par Unkless *et al.* en 1991 chez *Apergillus nidulans*. L'utilisation d'une sonde moléculaire correspondant au gène codant le système de transport inductible IHATS chez cet organisme a permis d'identifier les gènes homologues *nrt2* chez de nombreux végétaux supérieurs (*Hordeum vulgare* : Trueman *et al.*, 1996 ; *Nicotiana plumbaginifolia* : Quesada *et al.*, 1997 ; *Glycine max* : Amasrasingh *et al.*, 1998 ; *Arabidopsis thaliana* : Filleur et Daniel-Vedele, 1999 ; Zhuo *et al.*, 1999 ; *Lycopersicon esculentum* : Ono *et al.*, 2000). En fait, il peut exister chez les végétaux de deux (*Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana plumbaginifolia*) à sept (*Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*) copies de ce gène. Chez *Arabidopsis thaliana*, les 7 copies sont situées sur 3 chromosomes différents.

De faibles niveaux d'expression des gènes *Npnrt2* ont été détectés dans les feuilles, les pétioles, les inflorescences, les fleurs et les graines. Il semble donc que ceux-ci soient préférentiellement exprimés au niveau racinaire chez *Nicotiana plumbaginifolia*. Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *Atnrt2.1*, *Atnrt2.2* et *Atnrt2.4* sont exprimés préférentiellement dans les racines alors que le gène *Atnrt2.7* est exprimé majoritairement dans les parties aériennes, suggérant son implication dans le déchargement du NO_3^- au niveau foliaire (Krapp *et al.*, 1998). Le suivi de l'expression racinaire des gènes *Atnrt2* a montré que les transcrits s'accumulent à proximité des apex dans les cellules de l'endoderme et de l'épiderme.

Chez l'orge (*Hordeum vulgare*), les suivis du niveau de transcrits des gènes *Hvnrt2.1*, *Hvnrt2.2* et *Hvnrt2.3* et des valeurs d'influx de NO_3^- ont montré que ces gènes codaient des systèmes de transport IHATS (Vidmar *et al.*, 2000). Par ailleurs, des expérimentations menées chez *Arabidopsis thaliana* ont permis d'associer les gènes *Atnrt2.1* et *Atnrt2.2* au IHATS et les gènes *Atnrt2.4*, *Atnrt2.5* et *Atnrt2.6* au CHATS (Okamoto *et al.*, 2003). Les gènes *nrt2.1* et *nrt2.2* ont également été clonés par RT-PCR chez *Brassica napus* par Faure-Rabasse *et al.* (2002).

- Famille de gènes codant les systèmes de transport à faible affinité (LATS)

Le premier gène *Atnrt1.1* (appelé initialement CHL1) codant un système de transport LATS a été cloné et caractérisé à partir de mutants résistants au chlorate chez *Arabidopsis thaliana* (Tsay *et al.*, 1993). Par la suite, un autre gène *nrt1* a été isolé chez

Brassica napus (Muldin et Ingemarsson, 1995), puis chez d'autres espèces végétales. Bien qu'allant à l'encontre des résultats physiologiques précédemment relatés, Tsay *et al.* (1993) ont montré que le niveau de transcription du gène *Atnrt1.1* était fortement augmenté par la présence de nitrate, suggérant ainsi l'existence d'un système de transport LATS constitutif et inductible. Un autre gène *Atnrt1.2* supposé coder un système CLATS a ensuite été identifié chez *Arabidopsis thaliana* (Huang *et al.*, 1996). L'utilisation de sondes moléculaires hétérologues a permis d'isoler d'autres gènes homologues de *Atnrt1.1* (*Lenrt1.2-Lycopersicon esculentum*, Lauter *et al.*, 1996 ; *Npnrt1.2-Nicotiana plumbaginifolia*, Fraisier *et al.*, 2001 ; *Bnnrt1.1-Brassica napus*, Faure-Rabasse *et al.*, 2002) et de *Atnrt1.2* (*Lenrt1.1-Lycopersicon esculentum*, Lauter *et al.*, 1996 ; *Npnrt1.1-Nicotiana plumbaginifolia*, Fraisier *et al.*, 2001). Récemment, Okamoto *et al.* (2003) ont isolé deux autres gènes, *Atnrt1.3* et *Atnrt1.4*, chez *Arabidopsis thaliana*. La comparaison entre des séquences de *Atnrt1* issues de *Arabidopsis thaliana* et d'autres organismes ont permis jusqu'à présent de recenser 51 gènes *nrt1*.

Actuellement, seule l'expression de quatre d'entre eux a été étudiée. Les gènes *nrt1* seraient impliqués dans l'absorption racinaire du NO_3^- mais également dans son déchargement dans les feuilles et dans l'organogenèse (Guo *et al.*, 2001 ; Okamoto *et al.*, 2003). A la différence du gène *Atnrt1.2*, le gène *Atnrt1.1* coderait un système de transport à faible (LATS) et à forte (HATS) affinité. En effet, des mesures d'influx réalisées à partir de mutants d'*Arabidopsis thaliana* ont montré que le gène *Atnrt1.1* code un système de transport HATS et LATS (Wang *et al.*, 1998). De plus, son expression dans des ovocytes de xénope confirme que ce gène coderait des systèmes de transport à forte affinité constitutif et inductible (Liu *et al.*, 1999).

Contrairement aux cinétiques d'absorption généralement déterminées chez les plantes cultivées en présence ou en absence de nitrate, les divers résultats obtenus au niveau moléculaire démontrent clairement l'existence d'un système de transport CLATS et ILATS. Seule, l'étude cinétique liée à l'activité du LATS réalisée chez *Brassica napus* par Faure-Rabasse *et al.* (2002), bien que controversée, semble attester de la présence de ces deux systèmes.

2. Régulation de l'absorption du nitrate

L'objectif de ce paragraphe n'est pas d'énumérer de façon exhaustive l'ensemble des facteurs endogènes et environnementaux pouvant potentiellement exercer une action

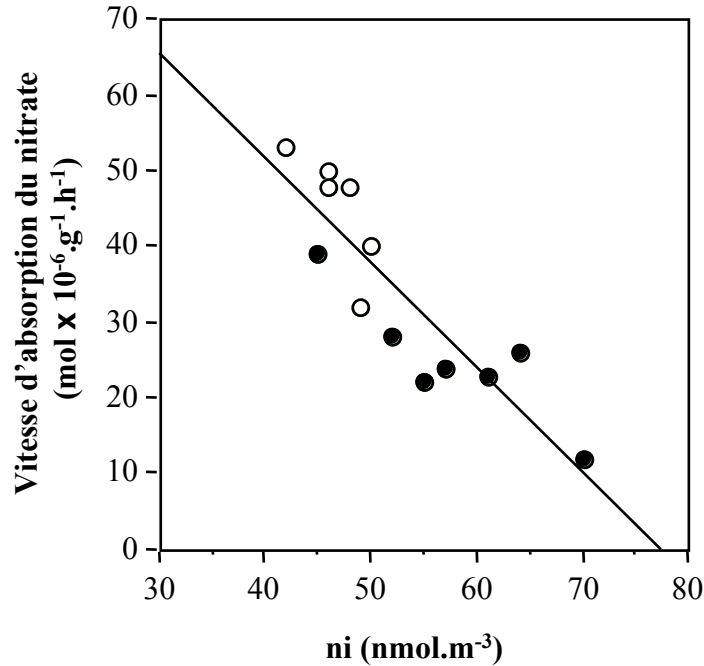


Figure I.2 : Relation entre la vitesse d'absorption nette du nitrate et sa concentration endogène dans la plante entière (ni) chez des plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) âgées de 19 jours. (○: plantes récoltées pendant la période diurne; ●: plantes récoltées pendant la période nocturne). D'après Càrdenas-Navaro *et al.* (1998).

activatrice ou inhibitrice sur l'absorption du nitrate. En effet, le but de cette analyse bibliographique est de se focaliser principalement sur les facteurs clés susceptibles d'exercer un rétro-contrôle sur l'absorption du nitrate à court terme (cycle nyctéméral) ou à long terme (cycle ontogénétique).

a. Par le nitrate racinaire endogène

Divers travaux ont montré qu'il existait une relation négative entre l'absorption nette du nitrate et sa concentration racinaire (Breteler et Nissen, 1982 ; Lainé *et al.*, 1995) ou de la plante entière (Càrdenas-Navarro *et al.*, 1998) (Figure I.2). En effet, il existerait une concentration seuil de nitrate qui régulerait l'absorption nette (Càrdenas-Navarro *et al.*, 1998). Par exemple, une diminution de la concentration endogène en nitrate lors de la reprise de l'activité photosynthétique au lever du jour stimulerait l'absorption nette de NO_3^- chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* ; Càrdenas-Navarro *et al.*, 1998).

L'absorption nette du nitrate est la résultante d'un influx et d'un efflux entre le milieu extérieur et le cytosol de la cellule racinaire. La chute de l'absorption nette pourrait donc être liée à une diminution de la valeur de l'influx et/ou à une augmentation de celle de l'efflux de NO_3^- .

- Modification de l'influx

Chez l'orge, le nitrate endogène racinaire exercerait un rétro-contrôle négatif sur l'influx sans stimuler l'efflux de NO_3^- (Vidmar *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'utilisation d'un double mutant ne possédant pas de nitrate réductase au niveau racinaire a permis de préciser que le nitrate et l'ammonium racinaire pouvaient inhiber l'influx de nitrate chez l'orge, et plus particulièrement, l'activité de la composante inductible du HATS (King *et al.*, 1993).

Le pool de nitrate racinaire impliqué dans la régulation de l'influx de nitrate n'est actuellement pas identifié. En effet, les études présentées ci-dessus n'ont permis d'établir aucune relation entre les variations de l'influx et celles de la concentration cytosolique en nitrate. Par ailleurs, Kronzucker *et al.* (1995) ont observé que la valeur d'influx de nitrate la plus élevée était obtenue pour une concentration cytosolique en nitrate maximale. De ce fait, Britto et Kronzucker (2003) ont suggéré que les flux de nitrate pourraient être contrôlés par le **pool vacuolaire racinaire de nitrate**. De plus, Forde (2002) a aussi proposé que le **pool de nitrate dans les parties aériennes** pourrait participer, à plus long terme, au contrôle de

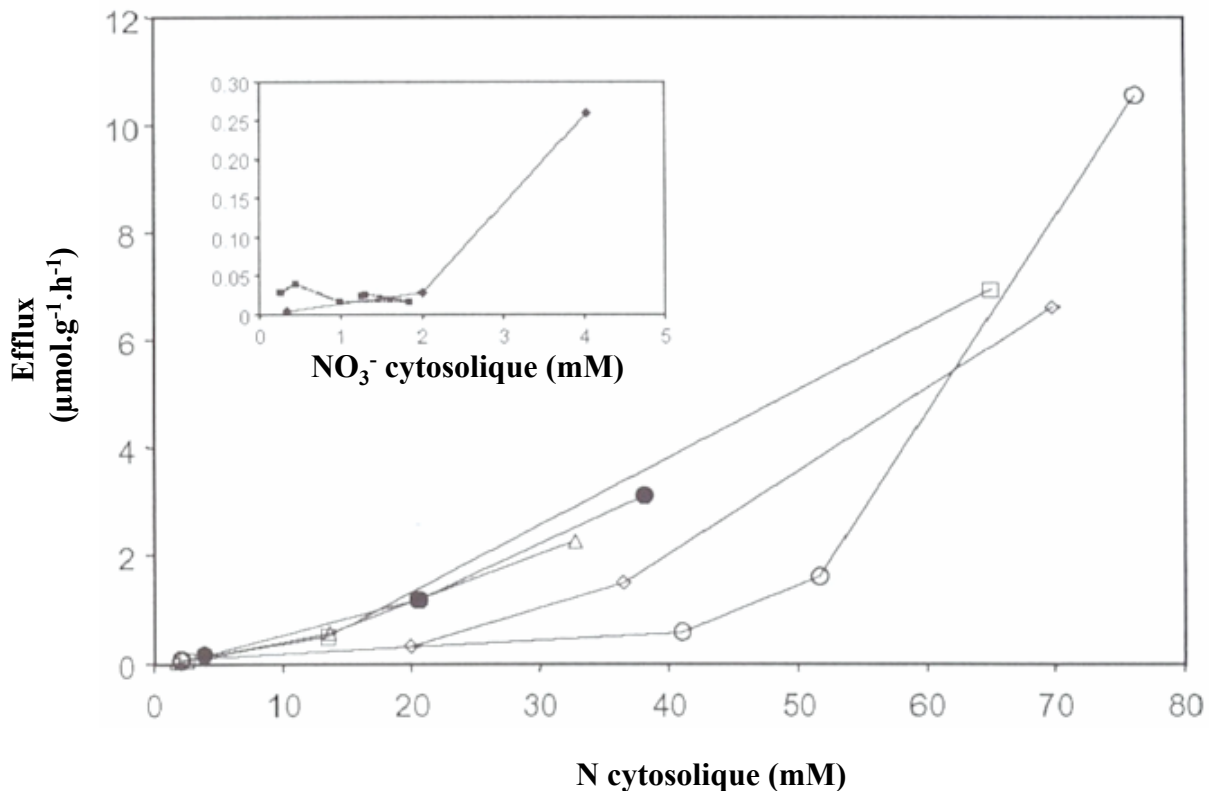


Figure I.3 : Variation de l'efflux de nitrate du cytosol vers le milieu extérieur en fonction de la concentration cytosolique en azote dans des racines de jeunes plantes chez l'orge (*Hordeum vulgare*) (● : Siddiqi *et al.*, 1991 ; ○ : Kronzucker *et al.*, 1999). La figure dans l'encart montre les variations de l'efflux de nitrate en fonction de la concentration cytosolique en nitrate dans des racines de jeunes plantes chez l'épicéa (*Picea glauca*) (Kronzucker *et al.*, 1995). D'après Britto et Kronzucker (2003).

l'absorption du nitrate en agissant directement sur la croissance des racines latérales chez le tabac.

De récents travaux ont montré que le **nitrate endogène racinaire** induisait la transcription du gène codant le HATS chez l'orge (*Hordeum vulgare*, Vidmar *et al.*, 2000) et chez *Arabidopsis thaliana* (Krapp *et al.*, 1998 ; Filleur et Daniel-Vedele, 1999 ; Lejay *et al.*, 1999). Néanmoins, la ou les voies de transduction du « signal nitrate » n'ont pas encore été identifiées (Forde, 2002).

- Modification de l'efflux

Les variations de l'absorption nette pourraient également résulter d'une modification de la valeur de l'efflux. En effet, des auteurs ont proposé un modèle appelé « pump and leak » où la valeur de l'efflux serait uniquement fonction de la concentration racinaire en nitrate (Scaife, 1989). Néanmoins, une analyse compartimentale effectuée grâce à l'utilisation de l'isotope radioactif $^{13}\text{NO}_3^-$ à partir de plantes d'orge préalablement cultivées pendant 7 jours avec des concentrations en NO_3^- de la solution nutritive s'échelonnant de 0 à 10 mM a permis de montrer que la valeur de l'efflux ne variait pas quelle que soit la concentration endogène en NO_3^- racinaire (Britto et Kronzucker, 2001). Plus récemment, Britto et Kronzucker (2003) ont montré que l'efflux n'était pas linéairement corrélé à sa concentration cytosolique racinaire. En effet, aucune modification de la valeur d'efflux n'a été observée chez l'orge pour des concentrations cytosoliques allant de 20 à 40 mM NO_3^- . Au delà de cette concentration, l'efflux augmenterait fortement pour atteindre une valeur proche de celle de l'influx (Figure I.3).

D'un point de vue agronomique, il est peu probable qu'en condition de plein champ l'absorption nette de nitrate puisse être contrôlée par un efflux de nitrate. En effet, l'azote minéral est souvent considéré comme le principal élément limitant la croissance des végétaux. Par ailleurs, la concentration en NO_3^- cytosolique au niveau racinaire, à laquelle pourrait se manifester un efflux de nitrate en conditions contrôlées, est très rarement rencontrée chez les plantes cultivées en conditions de plein champ. Par exemple, Lainé *et al.* (1998) ont montré chez le raygrass d'Italie (*Lolium multiflorum*) que la teneur en nitrate des racines des plantes cultivées en hydroponie et en conditions contrôlées était 5 fois plus élevée que celle des racines des plantes cultivées au champ. A notre connaissance et probablement faute d'une méthodologie satisfaisante, aucune expérimentation n'a été réalisée pour mettre en évidence un efflux de nitrate chez des plantes cultivées au champ. Des expérimentations

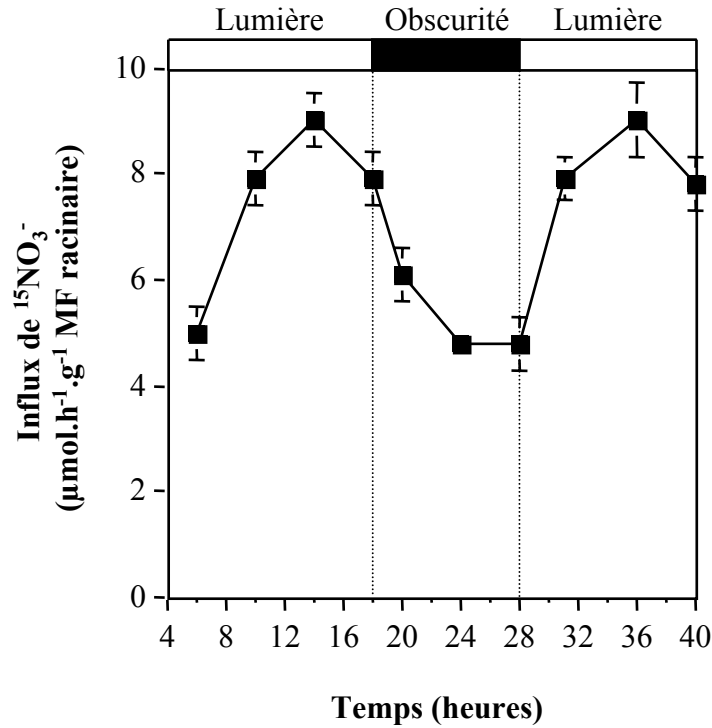


Figure I.4 : Variations nyctémérales de l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ mesurées pendant une période de 34 heures chez des plantes de soja (*Glycine max* L.) âgées de 20 jours. D'après Delhon *et al.* (1995a).

physiologiques devront être effectuées afin de démontrer l'existence d'un efflux de nitrate en conditions naturelles.

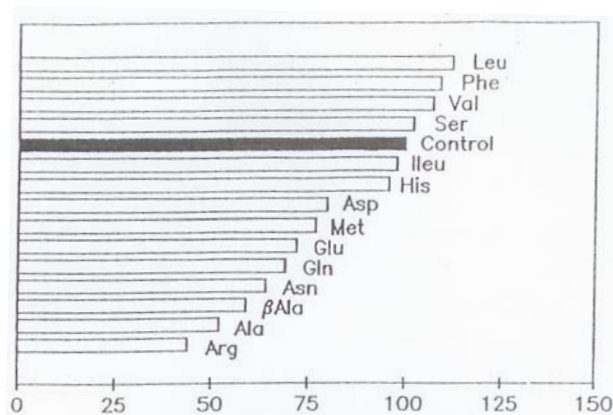
b. Par les produits d'assimilation du nitrate et/ou de la photosynthèse

Plusieurs travaux ont montré que l'absorption du nitrate variait au cours d'un cycle jour/nuit (Hansen, 1980 ; Le Bot et Kirkby, 1992 ; Scaife et Schloemer, 1994 ; Tischner, 2000). En effet, l'absorption de nitrate augmente dès le début de la phase diurne pour atteindre un maximum en milieu de cette phase avant de chuter lors de la période nocturne (Figure I.4). Les travaux de Dehlon *et al.* (1995) ont montré que cette chute de l'absorption lors de la transition jour/nuit était due à l'inhibition de l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ chez le soja (*Glycine max* L.). Contrairement à la variation de l'activité de la NR racinaire qui suit un rythme circadien, ces mêmes auteurs ont montré que les variations nyctémérales de l'influx de nitrate étaient liées aux fluctuations de l'éclairement, suggérant ainsi l'implication de molécules issues des parties aériennes dans la régulation de l'activité du système HATS.

A l'inverse, peu d'expérimentations ont été consacrées à l'étude de l'activité du HATS au cours du cycle ontogénétique (Mattson *et al.*, 1992). Cependant, Rossato *et al.* (2001) ont observé chez le colza (*Brassica napus* L.), à partir d'expérimentations menées en hydroponie et en conditions contrôlées grâce à l'utilisation du traceur ^{15}N , que la transition phase végétative/phase reproductrice était caractérisée par un arrêt de l'absorption du nitrate, suggérant une inhibition de l'absorption par des « facteurs endogènes » de la plante. Afin d'expliquer le rétro-contrôle de l'absorption du nitrate à court et à long terme, **plusieurs modèles de régulation proposant l'intervention de molécules telles que les acides aminés, les acides organiques ou encore les sucres ont été avancés:**

- Les acides aminés

L'ajustement du prélèvement racinaire de nitrate à la demande azotée des parties aériennes nécessite un contrôle de l'absorption du nitrate. Dans ce contexte, les acides aminés issus de l'assimilation du nitrate et/ou de la protéolyse au niveau des parties aériennes semblent être de bons candidats pour jouer un rôle dans la régulation de l'absorption du nitrate. Lee *et al.* (1992) ont montré qu'une baisse de la teneur en acides aminés cytosoliques obtenue, soit par une privation des plantes en NO_3^- , soit par l'utilisation d'inhibiteurs de la glutamine synthétase (MSO : D-L méthionine sulfoximide), entraînait une augmentation de l'absorption. **Cooper et Clarkson (1989) ont suggéré que l'existence d'un pool d'acides aminés libres circulant entre les racines et les parties aériennes via le xylème et le**



Absorption du nitrate (en % du témoin)

Figure I.5 : Effet de l'immersion de la partie coupée de cotylédons de soja (*Glycine max* L.) dans des solutions d'acides aminés (10 mM ; pH=5,5) sur l'absorption de NO_3^- . L'absorption est mesurée 15 heures après l'apport de l'acide aminé. Les valeurs sont exprimées en % du témoin. D'après Muller et Touraine (1992).

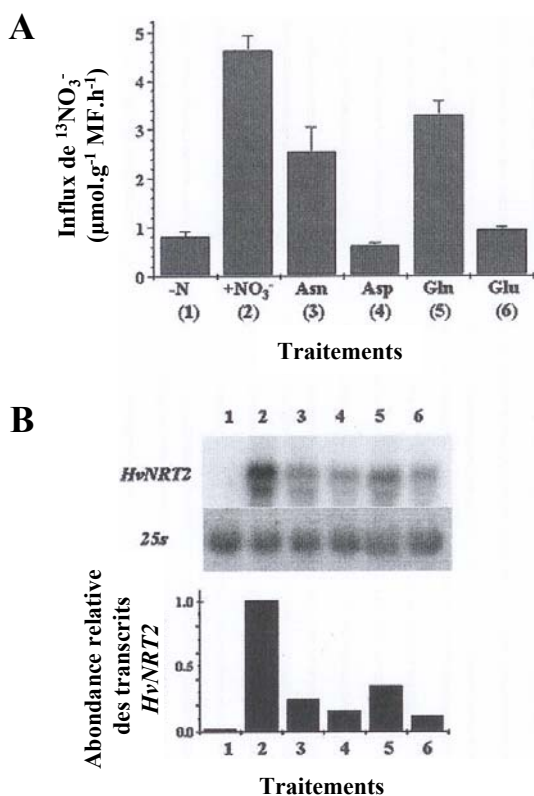


Figure I.6 : Effets d'apport d'acides aminés dans la solution nutritive sur l'influx de $^{13}\text{NO}_3^-$ et sur l'accumulation dans les racines de transcrits *HvNRT2*. **A :** Influx de $^{13}\text{NO}_3^-$ mesuré à 50 μM. **B :** Analyse du northern-blot des transcrits *HvNRT2* d'ARN isolés à partir de racines d'orge (*Hordeum vulgare*). Traitements : (1) : sans azote ; (2) à (6) : traité avec 10 mM NO_3^- seul (2) ou avec 10 mM NO_3^- + des acides aminés pendant 6 heures (3) à (6). (3) : 1mM Asn ; (4) : 1 mM Asp ; (5) : 1 mM Gln ; (6) : 1 mM Glu. L'abondance des transcrits a été calculé en proportion du traitement (2). D'après Vidmar *et al.* (2000).

phloème pourrait participer au contrôle de l'absorption. Ce modèle pourrait rendre compte des variations de l'activité du HATS à court terme. **Ismande et Touraine (1994) ont également proposé un modèle permettant d'expliquer la régulation de l'absorption du nitrate par les acides aminés à plus long terme (i.e. le cycle de développement).** Lors de la période végétative, l'assimilation foliaire du nitrate permettrait la synthèse d'acides aminés nécessaires à la protéosynthèse. Ainsi, la faible quantité d'acides aminés transportés vers les racines n'exercerait pas de rétro-contrôle négatif sur l'activité du HATS. A l'inverse, pendant la période reproductrice, et plus particulièrement lors du remplissage des grains, la diminution de la protéosynthèse et l'augmentation de la protéolyse liée à la sénescence foliaire contribueraient à l'augmentation de la concentration en acides aminés dans le phloème et à la diminution voire l'arrêt de l'absorption.

Tous les acides aminés ne seraient pas impliqués dans la régulation de l'absorption. Des expérimentations basées sur l'apport exogène d'acides aminés dans la solution nutritive (Breteler et Arnozis, 1985) ou sur l'application d'acides aminés au niveau des parties aériennes (i.e. cotylédons) permettant d'augmenter le transport des acides aminés (Muller et Touraine, 1992) ont montré que certains d'entre eux (Ala, Asp, Asn, Glu, Gln) inhibaient plus fortement l'absorption que d'autres (Figure I.5). Des travaux plus récents ont par ailleurs montré que l'influx de nitrate et l'abondance du gène *Hvnr2* étaient diminués de façon décroissante par un apport exogène d'Asp, Glu, Asn et Gln (Vidmar *et al.*, 2000 ; Figure I.6). De même, d'autres auteurs ont observé qu'un prétraitement des racines en présence d'ammonium et d'acides aminés provoquait une diminution de l'abondance des transcrits *nrt2* (Quesada *et al.*, 1997 ; Krapp *et al.*, 1998 ; Zhuo *et al.*, 1999). Ainsi, il a été émis l'hypothèse que **les acides aminés exerceraient un contrôle sur l'absorption du nitrate au niveau transcriptionnel.**

Néanmoins, l'identification des acides aminés intervenant *in planta* dans la régulation de l'absorption apparaît difficile. En effet, peu d'auteurs ont réalisé des dosages endogènes d'acides aminés au niveau racinaire afin de vérifier, d'une part, que l'acide aminé testé avait été absorbé et, d'autre part, qu'il n'avait subi aucune interconversion. Ainsi, les modifications observées suite à l'apport d'un acide aminé dans la solution nutritive peuvent résulter des produits d'interconversion de celui-ci. Par exemple, bien qu'il ait été observé, grâce à des apports exogènes, que l'asparagine (Asn) inhibait l'influx de nitrate (Touraine et Muller, 1992), d'autres auteurs (Dehlon *et al.*, 1996) ont montré que les fluctuations nyctémérales de l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ n'étaient pas liées à une variation de la teneur racinaire en

asparagine. En revanche, d'autres approches basées sur l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes impliquées dans l'assimilation du nitrate comme l'azaserine (AZA : inhibiteur de la glutamate synthase) ont permis de montrer qu'une augmentation de la concentration cytosolique de la glutamine entraînait une diminution respective de 97% et de 95% de l'influx de $^{13}\text{NO}_3^-$ et de l'abondance des transcrits du gène *Hvnr2* (Vidmar *et al.*, 2000). La **glutamine serait le principal acide aminé rétro-inhibant l'activité du IHATS au niveau transcriptionnel** chez l'orge (Vidmar *et al.*, 2000) et le colza (Beuve *et al.*, 2004). Cependant, Beuve *et al.* (2004) ont aussi mis en évidence l'intervention d'un effecteur positif dans la régulation de l'absorption du nitrate : le GABA stimulerait l'expression de *Bnnrt2*. Selon ces auteurs, le feed-back positif de cet acide aminé interviendrait dans des situations de carence azotée ou de forte demande en azote (*i.e.* pendant la montaison chez le colza). Cette situation de stress stimulerait la synthèse de glutamate (molécule s'accumulant lors de stress biotiques et abiotiques) et, de fait, la production de GABA, permettant ainsi d'augmenter les capacités d'absorption racinaire du nitrate.

Par ailleurs, l'implication des acides aminés dans la rétro-inhibition de l'absorption est fortement controversée. En effet, lors d'une alimentation hétérogène en nitrate, la privation d'une partie du système racinaire en NO_3^- est compensée par une augmentation des capacités d'absorption de l'autre partie des racines au contact du nitrate bien que le pool d'acides aminés libres de cette dernière soit identique à celui des plantes alimentées de façon homogène en nitrate (Lainé *et al.*, 1995 ; Tillard *et al.*, 1998).

Seules, les expérimentations prenant en compte la compartimentation des acides aminés dans la racine devraient conduire à l'identification des acides aminés exerçant un contrôle au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel sur l'absorption du nitrate.

- Les acides organiques

La réduction de l'absorption du nitrate pendant la période nocturne pourrait s'expliquer par une diminution de l'assimilation du nitrate au niveau des parties aériennes, rejoignant ainsi le **modèle hypothétique de Ben Zioni *et al.* (1971)**. Ce modèle est basé sur l'implication des acides organiques dans la régulation de l'absorption du nitrate. En effet, **les acides organiques** issus de l'absorption du nitrate et de sa réduction dans les parties aériennes pourraient contrôler l'absorption (Ben Zioni *et al.*, 1971 ; Touraine, 1992). La réduction foliaire du nitrate entraînerait la production d'ions hydroxyles (OH^-) fortement basiques dans

les feuilles. Pour maintenir l'homéostasie cellulaire, des acides organiques, l'acide oxaloacétique et l'acide malique, seraient synthétisés au niveau foliaire. Puis, l'acide malique serait véhiculé *via* le phloème en compagnie d'un ion K^+ vers les racines où il serait décarboxylé. La décarboxylation du malate et l'exsorption d'un ion carbonate (HCO_3^-) permettraient par un antiport, l'absorption d'un ion NO_3^- . L'ion K^+ serait ensuite recyclé avec le nitrate nouvellement absorbé vers les parties aériennes. Cependant, des apports de malate réalisés au niveau racinaire pendant la période nocturne ou de nitrite effectués au niveau foliaire pour stimuler la synthèse de malate ont permis de montrer que la disponibilité en malate ne constituait pas le facteur limitant l'absorption du nitrate chez le soja (*Glycine max* L. ; Dehlon *et al.*, 1996). De plus, il a été observé que l'absorption des plantes ayant reçu un apport foliaire de nitrite est plus fortement réduite que celle observée chez les plantes témoin. Ainsi, il a été proposé par Dehlon *et al.* (1996) que **l'inhibition de l'absorption pendant la période nocturne serait le résultat d'une chute de l'allocation de squelettes carbonés vers les racines au profit de l'assimilation du nitrate dans les parties aériennes.**

Néanmoins, les variations de l'absorption observées chez le colza par Rossato *et al.* (2001) au cours du cycle ontogénétique pourraient s'expliquer **par le modèle de régulation proposé par Imsande et Touraine (1994)** qui s'appuie sur la modification de l'assimilation de l'azote minéral et des flux d'azote survenant lors la transition phase végétative/phase reproductrice. L'assimilation de l'azote au niveau des parties aériennes pendant la période végétative serait importante pour permettre la mise en place de tissus photosynthétiquement actifs. Cette forte activité de réduction foliaire du nitrate s'accompagnerait d'une synthèse d'acides organiques, exportés vers les racines *via* le phloème, qui stimuleraient l'absorption du nitrate selon le modèle de Ben Zioni *et al.* (1971). A partir de la floraison, l'assimilation de l'azote dans les feuilles diminuerait, entraînant ainsi une réduction de la production d'acides organiques et, par conséquent, d'ions hydroxyles dans les racines. Cette diminution serait concomitante à la remobilisation de l'azote foliaire au profit des siliques qui entraîne une augmentation de la concentration en acides aminés dans le phloème circulant entre les racines et les parties aériennes et, par voie de conséquence, une répression de l'activité des systèmes de transport du nitrate.

- Les sucres

Dehlon *et al.* (1996) ont montré qu'un apport de saccharose dans la solution nutritive chez le soja pendant la période nocturne empêchait la chute de l'influx de $^{15}NO_3^-$

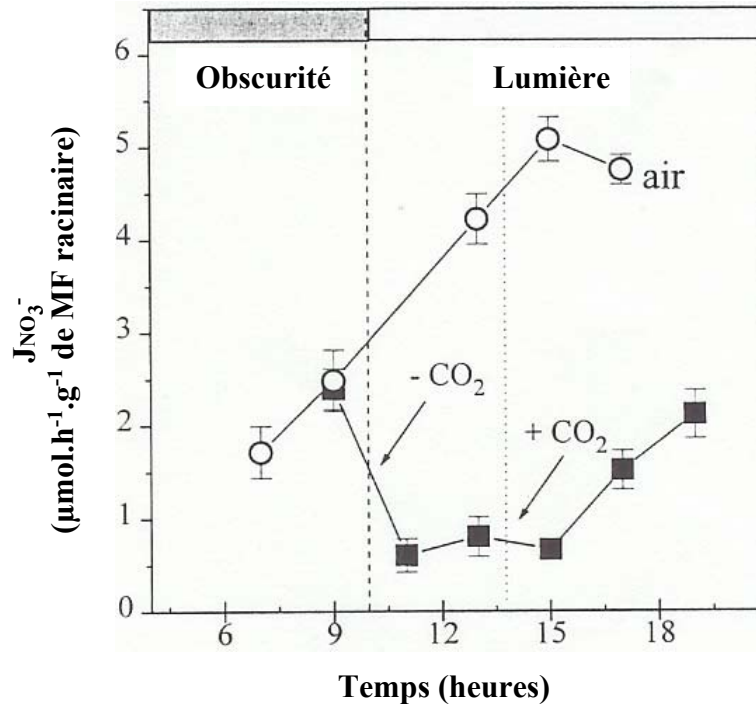


Figure I.7 : Effet de la concentration en CO_2 de l'atmosphère sur la vitesse d'absorption nette du NO_3^- ($J_{\text{NO}_3^-}$) par du soja âgé de 20 jours. Dans une chambre, la concentration en CO_2 est maintenue à 400 ppm pendant la période nocturne, décroît à 4-10 ppm pendant les 4 premières heures de la période diurne et revient à 400 ppm pendant les 6 heures qui suivent (■). Dans une autre chambre, des plantes témoins sont laissées à l'air ambiant pendant tout le cycle nuit/jour (○). D'après Dehlon *et al.* (1996).

normalement observée. Par ailleurs, la chute de l'influx consécutive à une diminution de la teneur en CO₂ atmosphérique (Dehlon *et al.*, 1996 ; Figure I.7) laisse suggérer que les **molécules carbonées synthétisées au niveau des parties aériennes réguleraient l'absorption du nitrate afin de permettre une meilleure coordination entre l'activité photosynthétique et l'absorption du nitrate.**

La diminution de l'influx de nitrate pendant la nuit pourrait s'expliquer par une **limitation énergétique** : la chute de la quantité de substrats carbonés pourrait réduire la production d'ATP et, par conséquent, limiter le fonctionnement des systèmes de transport HATS. Par ailleurs, une réduction de la quantité de molécules carbonées véhiculées vers les racines pourrait être à l'origine d'une **limitation de l'activité de la NR racinaire**. Ainsi, l'augmentation de la concentration endogène en nitrate pourrait entraîner une inhibition de l'absorption du nitrate pendant la période nocturne.

Le saccharose peut aussi agir comme une **molécule signal** régulant l'activité et/ou l'expression des gènes codant les systèmes de transport HATS. En effet, Lejay *et al.* (1999) et Ono *et al.* (2000) ont respectivement mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et *Lycopersicon esculentum* une diminution de l'expression des gènes *Atnrt2.1* et *Lenrt2.1* et *Lenrt2.2* pendant la nuit (Figure I.8). Ces auteurs ont également montré qu'un apport externe de saccharose réalisé pendant la nuit pouvait prévenir la chute du niveau de transcrits *Atnrt2*. De plus, Matt *et al.* (2001) ont établi une corrélation entre le niveau d'expression du gène *nrt2* et la concentration racinaire en sucre chez le tabac (*Nicotiana tabaccum*). Par conséquent, les **sucres pourraient induire l'expression des gènes *nrt***. Par ailleurs, Lam *et al.* (1996) ont observé que l'expression des gènes *Atnrt2.1* et *Atnrt1.1* était positivement régulée par l'apport de saccharose alors que les métabolites azotés rétro-inhibent uniquement *Atnrt2.1*, suggérant des voies de transduction différentes pour les sucres et les acides aminés.

Des travaux plus récents menés chez *Arabidopsis thaliana* semblent montrer que le saccharose n'agirait pas directement sur l'expression du gène *Atnrt2* (Lejay *et al.*, 2003). En effet, l'activité de l'hexokinase 1 constituerait une étape clé dans la régulation du niveau de transcrits *Atnrt2*. A la lumière de ces résultats, il apparaît que la nature des molécules carbonées ainsi que les voies de transduction intervenant dans la régulation de l'absorption du nitrate ne sont pas encore clairement établies.

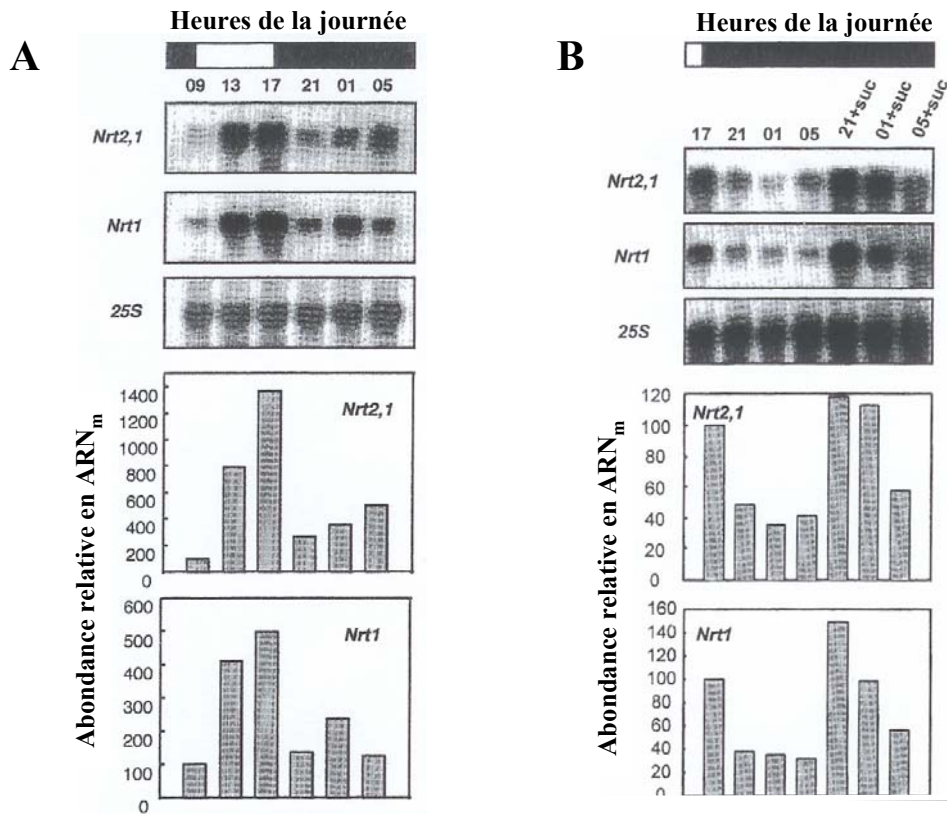


Figure I.8 : Variations de l'expression de *Nrt2.1* et *Nrt1* au cours du cycle nyctéméral (A) et effet de l'apport en saccharose (B) sur l'expression de *Nrt2.1* et *Nrt1* par des racines de plantes âgées de 6 semaines chez *Arabidopsis thaliana* et alimentées avec une solution nutritive contenant 1mM NO₃⁻. Les plantes traitées reçoivent 1 % saccharose et des antibiotiques à la transition lumière/obscurité. Les plantes témoins reçoivent seulement les antibiotiques. D'après Lejay *et al.* (1999).

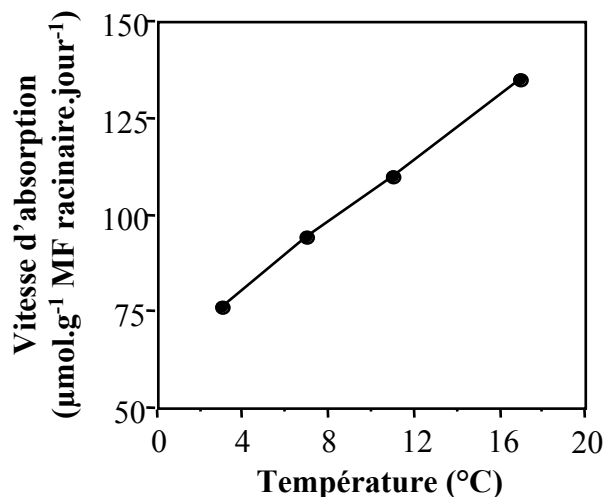


Figure I.9 : Variations de la vitesse d'absorption nette de NO₃⁻ (exprimée en μmol.g⁻¹ de MF racinaire.jour⁻¹) mesurées chez le colza (*Brassica napus* L.) en fonction de la température appliquée (3, 7, 11 et 17 °C) dans une solution nutritive contenant 10 mM de nitrate. L'absorption est mesurée après 4 jours d'acclimatation du système racinaire à la température testée. D'après Macduff *et al.* (1987).

c. *Par des facteurs environnementaux : la température*

De nombreuses expériences font état de l'influence de la température sur l'absorption (Macduff et Hopper, 1986 ; Macduff *et al.*, 1987 ; Clarkson *et al.*, 1992). Chez l'orge, Macduff *et al.* (1987) ont montré que la vitesse d'absorption du nitrate était augmentée lorsque la température passait de 3 à 17°C (Figure I.9). Plus particulièrement, l'étude de l'effet Q10 (Glass *et al.*, 1990) sur l'activité des systèmes de transport a montré que le HATS était sensible à une variation de température alors que l'activité du LATS variait peu. La différence de sensibilité du HATS et du LATS aux variations de température peut s'expliquer par le fait que le HATS serait un système de transport actif et énergétiquement dépendant (Rao *et al.*, 1976). Au contraire, le LATS serait un canal passif. Cependant, Cerezo *et al.* (2000) ont proposé grâce à l'utilisation d'inhibiteur métabolique l'existence de deux types de systèmes LATS chez le citron. Pour une concentration en nitrate inférieure à celle mesurée dans le cytosol (de l'ordre de 5 mM), le fonctionnement du LATS nécessiterait de l'énergie. A l'inverse pour des concentrations nettement plus élevées (30 mM), le LATS se comporterait comme un canal ionique.

B. Etude de l'absorption du nitrate et répartition de l'azote au sein d'une culture de colza d'hiver au cours d'un cycle de culture

1. Absorption du nitrate

Plusieurs études, réalisées en conditions de plein champ, ont permis de suivre les prélèvements d'azote chez le colza au cours d'un cycle de culture. Chez le colza d'hiver, les besoins en azote sont peu importants pendant la période automno-hivernale. Par contre, la demande en azote devient très élevée au printemps, de la "reprise de végétation" (stade rosette, C1) jusqu'à la floraison (F), que les plantes aient été cultivées en conditions contrôlées (Wright *et al.*, 1988 ; Rossato *et al.*, 2001, Figure I.10) ou en conditions de plein champ (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gabrielle *et al.*, 1998a). Chez le colza de printemps, l'absorption d'azote est fortement stimulée du stade jeune plante (B) jusqu'à la floraison (F; Hocking *et al.*, 1997 ; Chamorro *et al.*, 2002). Au-delà de ce stade, l'absorption d'azote est soit stoppée (Rossato *et al.*, 2001, Figure I.10) soit fortement ralentie (Merrien *et al.*, 1988 ; Wright *et al.*, 1988 ; Gabrielle *et al.*, 1998a ; Chamorro *et al.*, 2002).

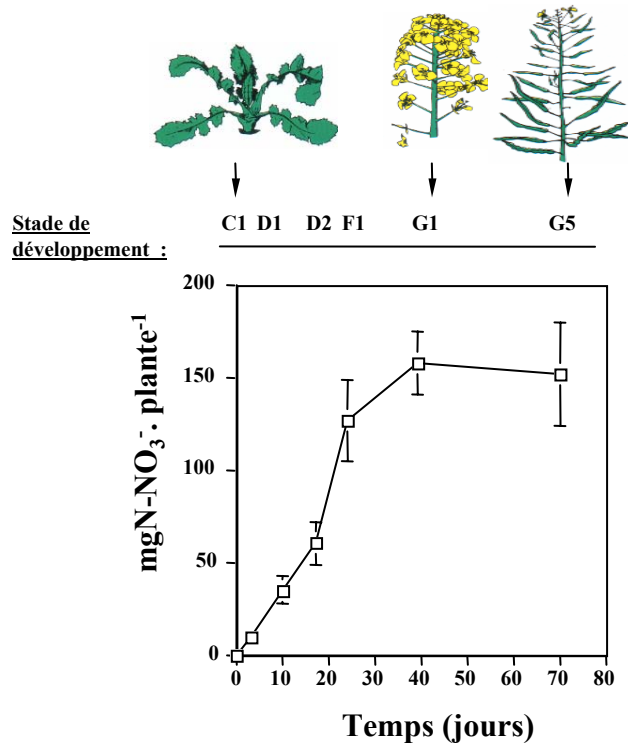


Figure I.10 : Absorption cumulée d'azote nitrique (exprimée en mg N-NO₃⁻·plante⁻¹) estimée par marquage au ¹⁵NO₃⁻ pendant 70 jours et en conditions de culture hydroponique. Les barres verticales indiquent ± l'écart-type de la moyenne pour n=6, lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole. Les stades indiqués (C à G) correspondent à ceux définis par le CETIOM. C1 : montaison; F : début floraison; G : début formation des siliques; G5 : graines colorées. D'après Rossato *et al.* (2001).

Selon Merrien *et al.* (1988), la chute de l'absorption de nitrate résulterait d'un déficit hydrique du sol pendant cette période. Celui-ci aurait pour conséquence de provoquer une forte diminution du flux de convection et de diffusion du nitrate dans la solution du sol. En effet, les expérimentations menées par Wright *et al.* (1988) ont montré qu'une irrigation associée à un apport d'engrais azoté important lors du remplissage des siliques permettait le maintien de l'absorption jusqu'au stade "maturité des graines (G5)". Néanmoins, des travaux plus récents, effectués en conditions hydroponiques, ont permis de montrer, grâce à l'utilisation de nitrate marqué (^{15}N), que l'arrêt de l'absorption du nitrate au moment de la floraison n'était pas uniquement lié à une diminution de l'offre en azote du sol chez *Brassica napus* L.. Rossato *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse que cet arrêt de l'absorption serait dû à la synthèse d'une phytohormone, le méthyl jasmonate (MeJa), par les boutons floraux et/ou les organes sénescents. En effet, une application foliaire ou un apport exogène dans la solution nutritive de cette phytohormone provoque très rapidement une chute de l'absorption (90 % en 4 jours) ainsi qu'une diminution du niveau de transcription des gènes codant les systèmes de transports IHATS et ILATS. D'autres études, plus anciennes, avaient déjà mis en évidence que la chute de l'absorption du nitrate coïncidait avec le début de la sénescence foliaire (Rood *et al.*, 1984). La diminution de la quantité de photoassimilats alloués vers le système racinaire pourrait également être la cause de la chute de l'absorption du nitrate. Ce déficit d'allocation de substrats carbonés vers le système racinaire pourrait avoir pour origine :

- une chute très importante de la biomasse photosynthétiquement active (début de la sénescence foliaire ; Rood *et al.*, 1984),
- une atténuation très importante du PAR incident (de l'ordre de 60 à 80 % ; Mendham *et al.*, 1981 ; Chapman *et al.*, 1984) due à la formation d'un écran au niveau du couvert végétal suite à l'apparition des fleurs et/ou des siliques,
- l'apparition de nouveaux drains métaboliques (siliques) à partir du stade floraison.

A l'évidence, le (ou les) facteur (s) responsable(s) de la chute drastique de l'absorption chez *Brassica napus* L. ne sont pas encore clairement identifié(s) puisque dans certaines conditions (carence azotée pendant la période végétative lié à un déficit hydrique du sol, Schjoerring *et al.*, 1995 ; fortes disponibilité en azote dans le sol après la floraison, Chamorro *et al.*, 2002) le prélèvement d'azote peut se poursuivre, mais dans une moindre mesure, au-delà de la floraison.

2. Répartition et efficience d'utilisation de l'azote absorbé chez le colza d'hiver

a. Du semis au stade reprise de végétation (C1)

Comparativement à d'autres espèces, le colza présente un fort potentiel de stockage de l'azote pendant la période automnale, les quantités d'azote absorbées étant d'autant plus importantes que la date de semis aura été précoce (Vos et Van der Putten, 1997). Cependant, les conditions climatiques défavorables rencontrées pendant cette période (faible rayonnement, basses températures) peuvent conduire à une forte restitution d'azote dans le sol *via* la chute des feuilles de la rosette encore très riches en azote (Colnenne *et al.* 1998 ; Dejoux, 1999). Par exemple, la chute des feuilles de la rosette avec de fortes teneurs en azote (jusqu'à 4,5 %), suite à une période de basses températures, conduit à une restitution d'azote dans l'environnement pouvant atteindre jusqu'à 100 kg N. ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 2000). L'étude des cinétiques de décomposition des feuilles préalablement marquées au ¹⁵N a permis de montrer que 28 et 24 % de l'azote restitué au sol étaient respectivement réabsorbés par la culture de colza au stade floraison et au stade récolte (Dejoux *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré qu'une quantité importante de l'azote (40 %, calculée par défaut de bilan), issu de la minéralisation des feuilles, se volatilisait dans l'atmosphère tandis qu'une faible quantité était lixiviée. Cette réabsorption d'azote issu des feuilles tombées au sol peut s'expliquer, d'une part, par le fait que les conditions climatiques (température, pluviométrie) rencontrées au printemps sont favorables à leur minéralisation et, d'autre part, que celle-ci se produit lorsque les besoins en azote de la culture sont élevés. Soulignons cependant que la part de l'azote réabsorbé est fonction de l'importance des précipitations.

b. De la reprise de végétation (C1) jusqu'au stade fin de montaison (E)

De la reprise de végétation jusqu'au début de la floraison, la majeure partie de l'azote absorbé est allouée vers le compartiment foliaire (environ 75 % de l'azote présent au sein de la plante ; Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997). L'azote restant est réparti entre la hampe (16 %) et le pivot (9 %). De plus, Justes *et al.* (2000) ont montré, en pratiquant différents niveaux de fertilisation azotée pendant la période végétative, que l'azote absorbé était préférentiellement exporté vers les feuilles afin de maintenir une vitesse de croissance élevée. La production de biomasse avant la floraison dépend principalement de la rapidité avec laquelle se réalise la mise en place de l'appareil aérien. Il a d'ailleurs été mis en évidence

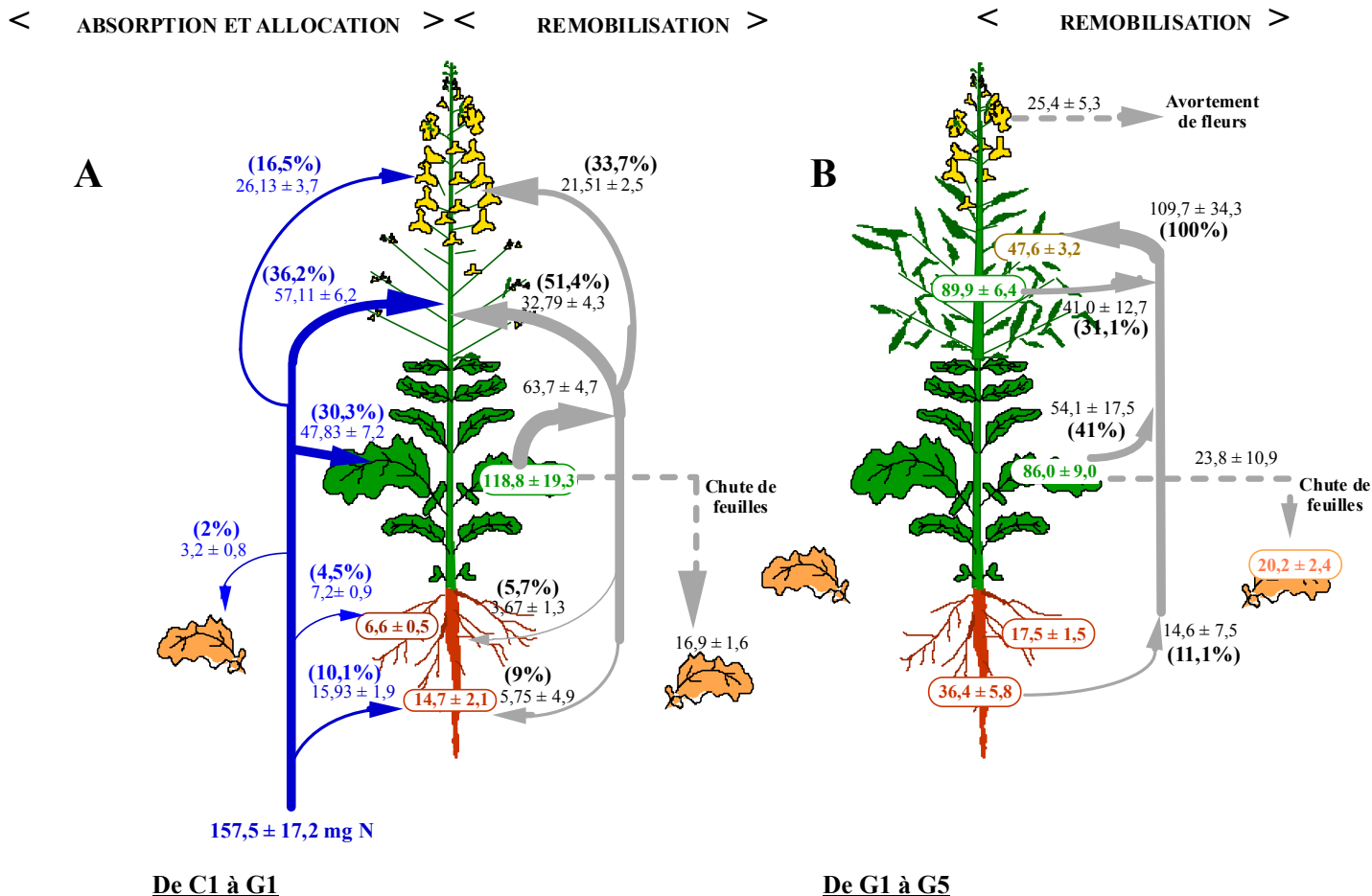


Figure I.11 : A) Bilan des transferts d'N endogène (flèches de droite) et exogène (flèches de gauche) en mg N.plante⁻¹ entre les stades C1 (montaison) et G1 (début de la formation des siliques) et entre les stades G1 (début de la formation des siliques) et G5 (graines colorées). Les chiffres entre parenthèses indiquent la répartition entre organes en % de l'azote endogène remobilisé à partir des feuilles vertes (à droite) ou en % de l'azote absorbé (à gauche). La quantité totale d'azote présent au sein de chaque organe au début de l'expérimentation (stade C1) est donnée dans les boîtes. Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne pour n=6. **B)** Bilan des transferts d'N total (absorbé et remobilisé) en mgN.plante⁻¹ au sein de la plante entre les stades G1 (début de la formation des siliques) et G5 (graines colorées). Les chiffres entre parenthèses indiquent la contribution de chaque organe au remplissage en azote total des siliques et des graines. Le contenu initial en azote total de chaque organe au stade G1 est donnée dans les boîtes. Chaque valeur correspond à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne pour n=6. D'après Rossato *et al.* (2001).

une relation linéaire positive entre la quantité de biomasse produite à l'échelle de la plante entière avant la floraison et la biomasse de siliques obtenue à la récolte (Habekotté, 1993).

c. Du stade floraison (F) jusqu'à la récolte (G5)

La transition phase végétative/phase reproductrice constitue chez le colza l'étape la plus critique du cycle de développement pour l'élaboration du rendement. La période de floraison, relativement longue par rapport à d'autres cultures (une semaine chez le blé, par exemple), s'étale sur trois à quatre semaines (Diepenbrock, 2000). C'est au début de la floraison que le nombre potentiel de siliques, défini par le nombre d'inflorescences apparues, est déterminé par la biomasse produite pendant la montaison (Habekotté, 1993). Par conséquent, il est important que, pendant cette phase, la disponibilité en substrats carbonés, nécessaires au développement et à la croissance des inflorescences puis des jeunes siliques, soit suffisante pour satisfaire la demande de ces nouveaux puits. Ainsi, la floraison est caractérisée par une modification des relations source/puits pour le carbone (Rood *et al.*, 1984; Tribou-Blondel, 1988) et pour l'azote (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Gabrielle *et al.*, 1998a ; Rossato *et al.*, 2001 ; Figure I.11) au profit des tissus reproducteurs.

Puisque l'absorption d'azote est fortement réduite au cours de la floraison, le remplissage en azote des siliques est essentiellement réalisé à partir de la remobilisation de l'azote des tissus végétatifs en place (feuilles, hampe, pivot ; Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Rossato *et al.*, 2001). Pendant les périodes « floraison » et « post floraison », les siliques constituent les puits majeurs pour l'azote. Hocking *et al.* (1997) ont montré que, chez le colza de printemps, la quantité d'azote mobilisé à partir des feuilles et de la hampe représentait 58 % de l'azote présent dans les siliques à la récolte. D'autres travaux ont montré que la hampe représentait la principale source d'azote lors du remplissage des siliques (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Dreccer *et al.*, 2000). Les feuilles auraient un rôle plus restreint que la hampe dans le remplissage des siliques, la majeure partie d'entre elles étant déjà tombées au sol à ce stade.

La remobilisation de l'azote à partir des feuilles encore présentes sur la plante serait cependant plus importante. L'application d'urée marqué (^{15}N) au début de la floraison sur les feuilles situées sous la première ramification montre qu'environ 80 % de l'azote marqué sont exportés vers les siliques (35 et 48 % respectivement au début et à la fin de la floraison; Zhang *et al.*, 1991). Des études plus récentes ont été réalisées par Rossato *et al.* (2001) en conditions contrôlées afin de suivre la dynamique de l'azote au sein de la plante pendant les

phases végétative et reproductrice (Figure I.11). Ces auteurs ont mis en évidence que la hampe et le pivot pouvaient constituer des compartiments "tampon" capables de stocker transitoirement l'azote issu des feuilles avant d'être ultérieurement alloué vers les siliques. En effet, l'azote présent dans les feuilles est remobilisé au profit de la hampe (51 %), des inflorescences (33 %) et du pivot (9 %) avant l'apparition des siliques.

De plus, des travaux effectués en conditions contrôlées chez le colza d'hiver ont mis en évidence l'existence de flux internes d'azote avant le remplissage des siliques entre les feuilles situées respectivement en bas et en haut du couvert (Kullman et Geisler, 1986 ; Ogunlela *et al.*, 1990). Par ailleurs, les expérimentations réalisées au champ par Schjoerring *et al.* (1995) ont précisé que l'azote endogène remobilisé pouvait représenter jusqu'à 50 % de l'azote présent dans les jeunes feuilles. Au cours du remplissage des siliques, l'azote issu des feuilles, de la hampe et du pivot représente respectivement 41, 31 et 11 % de la quantité allouée aux siliques. Pendant le remplissage des graines, les parois des siliques représentent également des sources importantes d'azote (Dreccer *et al.*, 2000). L'application d'urée marquée (^{15}N) sur les siliques montre que l'azote est principalement transféré vers les graines de ces siliques et qu'une petite partie est transportée vers les siliques situées au niveau supérieur (Zhang *et al.*, 1993).

Malgré ses fortes capacités à prélever l'azote, les rendements obtenus chez le colza, généralement compris entre 25 et 30 quintaux.ha⁻¹, suggèrent que l'azote absorbé n'est pas valorisé de façon optimale. Comparativement à d'autres espèces, les valeurs d'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE : biomasse de graines produites.kg⁻¹ N absorbé) peuvent varier de 6 à 40 % en fonction du niveau de fertilisation azoté et de la date d'apport de l'engrais azoté (Hocking *et al.*, 1997 ; Chamorro *et al.*, 2002). En effet, une quantité importante de l'azote est restitué au sol *via* la chute des feuilles sénescentes avec de fortes teneurs en N (de l'ordre de 2,5 %). Ainsi, les quantités d'azote restituées au sol peuvent représenter jusqu'au deux tiers de l'azote apporté sur la culture (150 kg N.ha⁻¹ restitués contre 270 kg N.ha⁻¹ épandus). La faible efficacité d'utilisation de l'azote, qui peut résulter d'une faible remobilisation de l'azote foliaire vers les graines, se traduit par un indice de récolte azoté (NHI : rapport entre la quantité d'azote présent dans les graines et la quantité d'azote de la plante entière) qui passe de 80 à 70 % lorsque les feuilles mortes tombées avant la floraison sont prises en considération (Schjoerring *et al.*, 1995). Chez le colza, cet indice de récolte azoté est d'autant plus faible que le niveau des intrants azotés est important (Dreccer *et al.*, 2000). Les quantités d'azote restituées au sol pendant la floraison, qui peuvent varier de 20 à 60 kg N.ha⁻¹ en fonction du niveau de fertilisation pratiquée (Hocking *et al.*, 1997 ; Gosse *et*

al., 1999), ne sont ainsi pas valorisables pour le remplissage des siliques de la culture de colza en place (Thomsen et Christensen, 1998 ; Trinsoutrot *et al.*, 2000).

3. Dynamique du recyclage de l'azote des différents rangs foliaires

Rares sont les études ayant permis de caractériser l'évolution de la teneur en azote dans les différents rangs foliaires chez le colza au cours du cycle de culture. A notre connaissance, seuls, les travaux menés par Triboï-blondel (1988) ont permis de suivre au cours d'un cycle complet de végétation au champ le rythme d'apparition et de disparition des différentes feuilles ainsi que l'évolution de leur poids, surfaces, teneurs en azote et en glucides chez le colza d'hiver (*Brassica napus* L. oleifera Metzg. Cv Jet Neuf).

Le rythme d'émergence des feuilles (exprimé en °Cjours) est constant pour les 16 premières feuilles (75 °Cjours) puis chute pour les feuilles supérieures (20°Cjours pour les feuilles 17 à 33). La durée de vie des feuilles varie de 440°Cjours pour la feuille 1, à 850°Cjours pour les feuilles 26 à 33, avec une augmentation régulière pour les feuilles 2 à 25. La durée de vie des feuilles est d'autant plus longue que les températures sont basses.

Au moment de leur émergence, les feuilles de colza présentent des teneurs élevées en azote (6-7 %) quel que soit leur positionnement sur la plante. Puis, celles-ci diminuent tout au long de leur développement pour chuter avec une teneur en azote de l'ordre de 2 à 2,5 %. Ces teneurs en azote sont nettement supérieures à celles des autres organes aériens encore présents au stade récolte (0,5 à 1 %, Triboï-Blondel, 1988 ; Wright *et al.*, 1988 ; Hocking *et al.*, 1997).

Bien que Triboï-Blondel (1988) ait conclu que cette teneur puisse correspondre à l'azote structural des feuilles, plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer le déterminisme de la chute des feuilles avec des teneurs en azote élevées comparativement à d'autres espèces cultivées. Par exemple, les feuilles de blé (*Triticum aestivum*) chutent avec une teneur en azote de l'ordre de 1 %. Une mauvaise remobilisation de l'azote endogène liée à une limitation de la demande en azote par les organes puits pourrait expliquer les fortes teneurs en azote mesurées dans les feuilles mortes. Selon cette hypothèse, la quantité d'azote remobilisé à partir des sources serait fonction du nombre et de la taille des graines, comme c'est le cas chez le blé (*Triticum aestivum* ; Dreccer *et al.*, 2000). A l'inverse, il a été démontré qu'un apport d'engrais azoté entraîne une augmentation du rendement et de la teneur en azote des graines, suggérant cette fois-ci une limitation de la capacité de vidage des sources. Ainsi, la faible capacité de remobilisation de l'azote foliaire chez le colza pourrait également résulter du développement insuffisant des compartiments "tampon" (hampe et

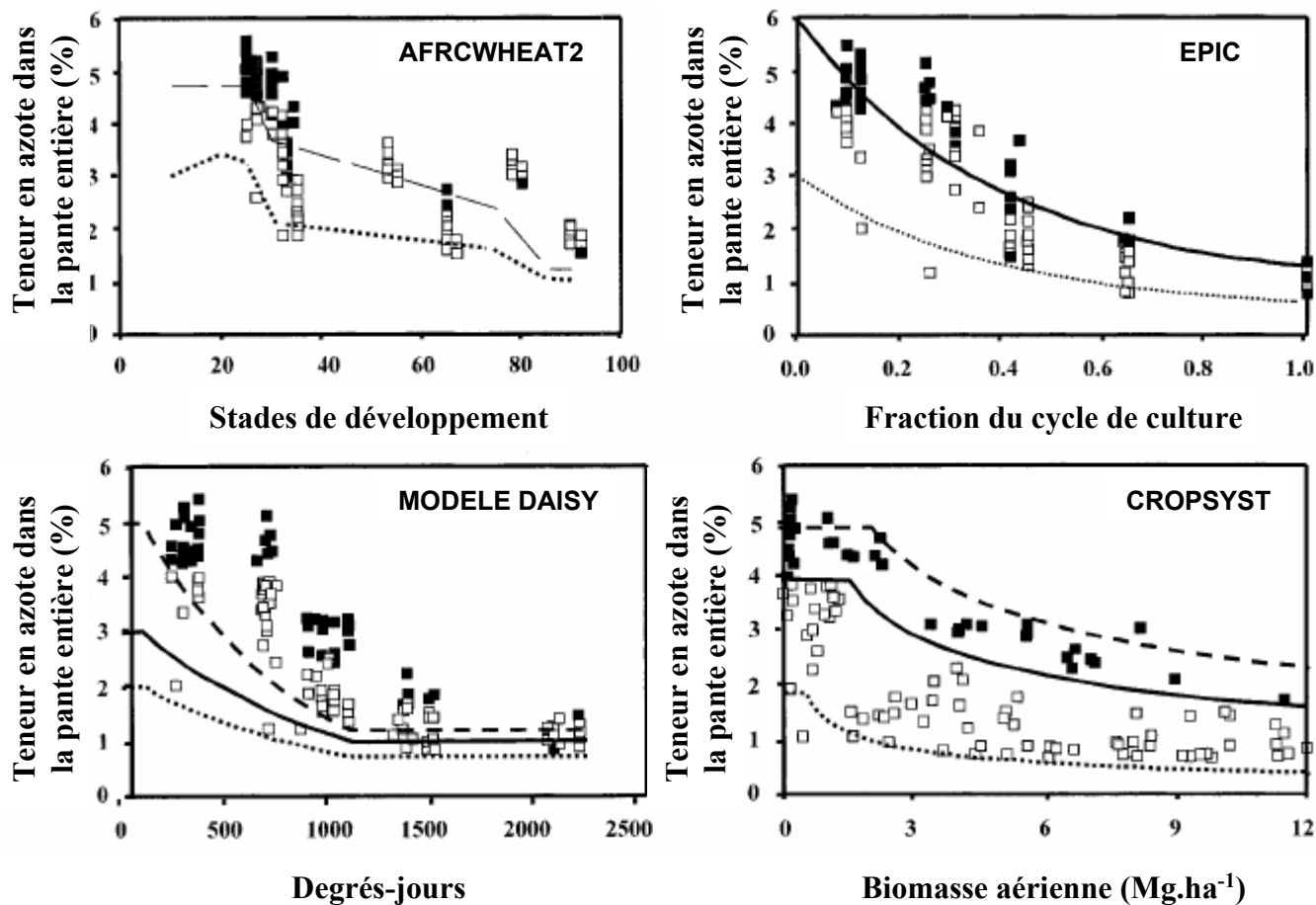


Figure I.12 : Comparaison de la capacité de quatre modèles agronomiques à estimer la teneur en N chez le blé (*Triticum aestivum* L.) à partir de données obtenues lors de conditions limitantes et non limitantes d'offre en azote du sol, à Auzeville, France en 1992-1993. □: conditions limitantes d'offre en N; ■: conditions non limitantes d'offre en N; ligne brisée: teneur en azote maximale (N_{\max}); ligne continue: Teneur en azote critique (N_{crit}); pointillés: Teneur en azote minimale (N_{\min}). D'après Stockle et Debaeke (1997).

pivot) au début du vidage en azote des feuilles (Rossato *et al.*, 2001). Enfin, elle pourrait aussi être la conséquence d'une chute anticipée des feuilles suite à des conditions environnementales défavorables. Par exemple, l'atténuation du rayonnement incident due à l'apparition des inflorescences puis des siliques pourrait provoquer la chute prématurée des feuilles (Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*, 1997 ; Dreccer *et al.*, 2000).

C. Modélisation de l'absorption de l'azote et de sa répartition au sein de la plante

1. Modèle d'absorption

La modélisation de l'absorption du nitrate est souvent envisagée selon des approches différentes par les agronomes et les physiologistes.

a. Approche agronomique

Généralement, en agronomie, la modélisation de l'absorption est intégrée comme un sous-module dans les modèles de croissance et de développement dont l'objectif est de prédire soit la production de biomasse, soit le rendement d'un peuplement végétal. Cette modélisation repose sur un équilibre entre l'offre du sol et la demande de la plante en azote.

Il est hors du cadre de ce mémoire de décrire l'ensemble des processus et des mécanismes contribuant à l'offre en azote du sol. Cependant, il peut être rappelé que la disponibilité de l'azote du sol est généralement modélisée par les flux de masse et de diffusion du nitrate vers les racines, tels que définis par Watts et Hanks (1978). Par la suite, des formes simplifiées de ces équations ont été utilisées dans les modèles pour prendre en compte la quantité d'azote disponible dans la rhizosphère (Gabrielle *et al.*, 1998a).

- « Courbe de dilution de l'azote »

Dans la plupart des modèles, la demande en azote est définie par la teneur en azote critique à un stade donné de développement du végétal : cette valeur correspond à la teneur en azote nécessaire pour obtenir une croissance maximale. Les modèles les plus complexes intègrent les teneurs maximale et minimale en azote, cette dernière correspondant à la teneur pour laquelle un arrêt de la croissance est observé. Selon les différents modèles rencontrés, l'évolution de la teneur en azote dans les différents compartiments du végétal peut être exprimée soit en fonction du temps thermique (colza-Daisy ; Hansen *et al.*, 1991), du

Tableau I.I. Modèles mécanistes (M) et statistiques (S) de l'absorption de l'azote minéral chez les végétaux supérieurs. n1 : teneur en azote dans le compartiment métabolique; n2 : teneur en azote dans le compartiment structural ; RGR : vitesse de croissance relative ; a, k (= 10a) : teneur en azote à la fin de la phase exponentielle de croissance ; b : coefficient d'ajustement ; MS: biomasse aérienne; q = 1-b : coefficient d'allométrie entre la surface foliaire et la biomasse ; Vm : vitesse maximale ; Km : constante d'affinité ; Nsol : teneur en azote de la solution du sol ; drac : densité racinaire ; Im : influx maximal ; Ni concentration endogène en nitrate ; Ni₀ : Ni pour laquelle Im = 0 ; Vc : vitesse de croissance ; D coefficient de diffusion ; e : teneur en eau ; Z : épaisseur de la couche de sol ; [NO₃⁻] : teneur en nitrate ; Na : teneur en azote critique du compartiment considéré ; Nc : teneur en azote critique des feuilles.

Modèle/Facteurs expliqués	Facteurs explicatifs	Formalisme de l'absorption	Références
(M) / N plante	Compartiments métabolique et structural (unité : g/100 g MS)	$N_{tot} = [(n1 - n2) / RGR_{max}] \times RGR + n2$	Caloin et Yu (1984)
(S) / N plante	Biomasse aérienne (unité : g/100 g MS)	$N(\%) = a (MS)^b$	Lemaire et Salette (1984)
(M) / N plante	Compartiments surfacique et massique de la plante (Unité : g/100 g MS)	$N = k \cdot MS^q$	Hardwick (1987)
(S) / N plante	Biomasse feuilles, tiges, racines N sol	$N = k (MS/100)^b$	Gabrielle <i>et al.</i> (1998)
(M) / croissance N plante flux absorbé	N sol (unité : kg N/ha/J)	$N_{dem} = 10^{-2} [MS(1,4Nc - Na) + \Delta MS(1,4Nc)]$ $N_{offre} = D \cdot d_{rac} \cdot 1,5 [([NO_3^-] - 0,5) / \theta] Z$ $Abs = [\min(\min \{ \phi_i^t ; \phi_i^a \} ; 10a (1 - b)MS - b) Vc]$ Avec $\phi_i^a = [(Vm \times Nsol) / (Km + Nsol)] \times d_{rac}$	Brisson <i>et al.</i> (1996)
(M) / N plante	N sol N interne (unité : moles/g.h)	$I = [[(Im \times Nsol) / (Km + Nsol)] - 1] - [[(Im \times Nsol) / (Km + Nsol) + 1]^{(Ni/Ni0)}$	Cárdenas-Navarro <i>et al.</i> (1999)

stade de développement (blé-EPIC, blé-AFRCWHEAT2) ou encore en fonction de la biomasse des parties aériennes (*i.e.* « courbe de dilution de l'azote » ; blé-CropSyst, Stockle et Nelson, 1996). La comparaison des quantités d'azote absorbé, simulées à l'aide de ces différents modèles, a permis de montrer que le meilleur ajustement entre les valeurs simulées et expérimentales est obtenu avec l'utilisation de la « courbe de dilution de l'azote » (CropSyst, Stockle et Nelson, 1996 ; Stockle et DeBaeke, 1997, Figure I.12).

La modélisation de la demande azotée grâce à l'utilisation de cette courbe de dilution, qui a tout d'abord été envisagée selon une approche statistique (Lemaire et Salette, 1984, Tableau I.I) puis une approche mécaniste (Caloin et Yu, 1984 ; Hardwick, 1987, Tableau I.I), présente l'avantage de différencier les situations de carences et d'offres azotées non limitantes. Aussi, une courbe de dilution a pu être établie chez de nombreuses espèces (blé, Justes *et al.*, 1994 ; colza, Colnenne *et al.*, 1998, Figure I.13; pois, Ney *et al.*, 1997). Ce concept a d'ailleurs été repris par la suite par Gabrielle *et al.* (1998a) pour modéliser la demande en azote au cours d'un cycle de culture chez le colza d'hiver. Ainsi, la demande journalière de la culture est calculée pour l'ensemble de la plante à l'aide des courbes de dilution établies pour chaque compartiment : feuille, hampe, racine (Tableau I.I).

La modélisation à partir de la courbe de dilution repose sur l'hypothèse que la demande en azote, et indirectement son prélèvement par la culture, est déterminée par la croissance. Or, les limites d'utilisation de ces modèles semblent atteintes lorsque d'une part, la disponibilité en azote dans le sol est très importante (Gabrielle *et al.*, 1998a), et d'autre part, la croissance est limitée par des facteurs biotiques (attaque de pathogènes) et abiotiques (déficit hydrique du sol ; Stockdale *et al.*, 1997) et non par le niveau de fertilisation azotée (Vos et van der Putten, 1997). C'est la raison pour laquelle d'autres approches basées sur les capacités d'absorption ont été développées.

- Capacité d'absorption de l'azote

D'autres auteurs (Vold *et al.*, 1999) ont proposé de modéliser le prélèvement d'azote par une culture grâce à l'utilisation d'équations mathématiques de type Michaelis-Menten. Il est ainsi possible de simuler le prélèvement d'azote à partir de la disponibilité en azote dans le sol et de la biomasse produite. Aucun des modèles cités ci-dessus ne tient compte du développement du système racinaire et de sa capacité à prélever l'azote au cours du cycle de culture. En effet, peu nombreux sont les modèles agronomiques ayant pris en considération le compartiment racinaire et ses capacités d'absorption. Après avoir déterminé

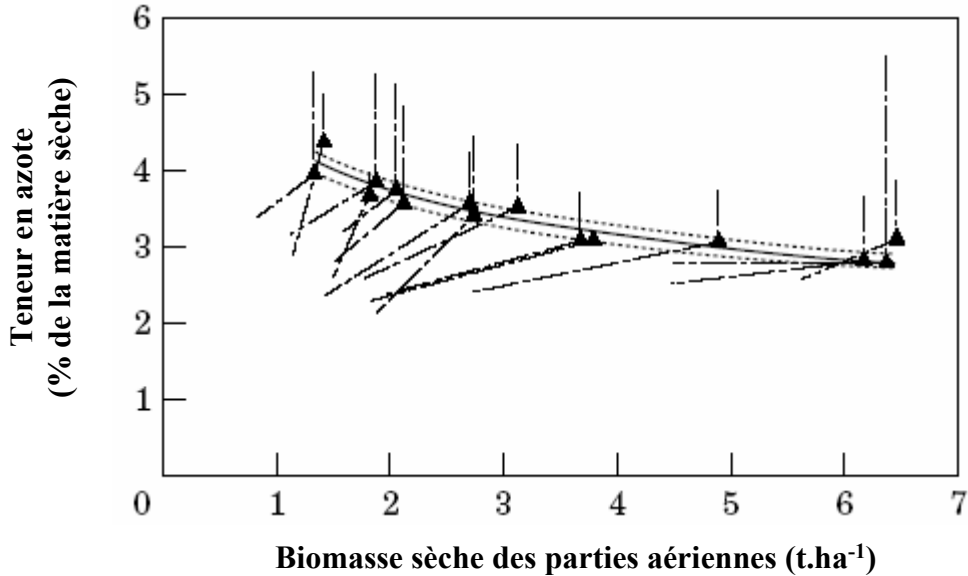


Figure I.13 : Détermination de la courbe critique de dilution de l'azote. — $N=4.48 \times MS^{-0.25}$; --- écart de confiance; — - — représentation schématique de la distribution des valeurs mesurées correspondant à des niveaux de fertilisation différents ayant permis le calcul des points (▲) nécessaires à l'établissement de l'équation décrivant la courbe de dilution de l'azote. Colnenne *et al.* (1998).

les capacités d'absorption à partir de la biomasse du système racinaire et de la quantité d'azote prélevé entre deux récoltes, Kleemola *et al.* (1996) ont proposé un modèle de croissance basé, entre autres, sur l'évolution des capacités d'absorption racinaire en fonction de la concentration en azote dans la solution du sol. Dans ce cas, le contrôle de l'absorption de l'azote par la croissance ne peut pas rendre compte des régulations agissant sur le fonctionnement des différents systèmes de transport de l'azote.

Le modèle agronomique de croissance STICS (Brisson *et al.*, 1998) définit l'absorption, dans l'un de ses sous-modules, comme la résultante entre une offre et une demande (Tableau I.I). L'offre est définie, d'une part, par un flux de nitrate vers la racine (pour une couche de sol i) calculé par les équations de convection (ϕ_i^c) et de diffusion (ϕ_i^d) du nitrate dans le sol ($\phi_i^t = \phi_i^c + \phi_i^d$) et, d'autre part, par un flux à travers la racine (ϕ_i^a) ajusté par deux cinétiques de type Michaelis-Menten qui s'apparentent aux cinétiques d'absorption établies par les physiologistes sur les composantes inductibles (IHATS) et constitutives (CHATS) du système de transport à forte affinité. La demande est définie par la loi de dilution et par la vitesse de croissance. Quand la demande est supérieure à l'offre, l'absorption est égale à l'offre ($\min\{\phi_i^a; \phi_i^t\}$). Lorsque la demande est inférieure à l'offre, l'absorption est égale à la demande corrigée par le rapport ϕ_i/ϕ où ϕ_i ($\min\{\phi_i^a; \phi_i^t\}$) et ϕ représentent, respectivement, l'offre potentielle au niveau de la couche i et sur l'ensemble des couches du profil.

b. Approche physiologique

Comme il a été montré précédemment, les modèles agronomiques négligent souvent le compartiment racinaire pour des raisons méthodologiques. De leur côté, les physiologistes ont développé des modèles mécanistes beaucoup moins opérationnels orientés sur les processus d'absorption et/ou assimilation de l'azote afin de mieux comprendre ceux-ci et d'en étudier les régulations (Figure I.14). Ces approches reposent sur des expérimentations menées au laboratoire, en conditions contrôlées, à l'échelle de la racine et sur des pas de temps courts, de l'ordre de l'heure voire du jour. L'utilisation de ces modèles nécessite d'opérer des changements d'échelle de temps (de l'heure ou du jour au cycle de culture) et d'espace (de la racine à la plante entière ou au peuplement).

Dans ce type de modèle, Hoffland *et al.* (1990), s'appuyant uniquement sur les flux de masse et de diffusion de l'azote vers la racine et sur la compétition inter-racinaire, surestiment

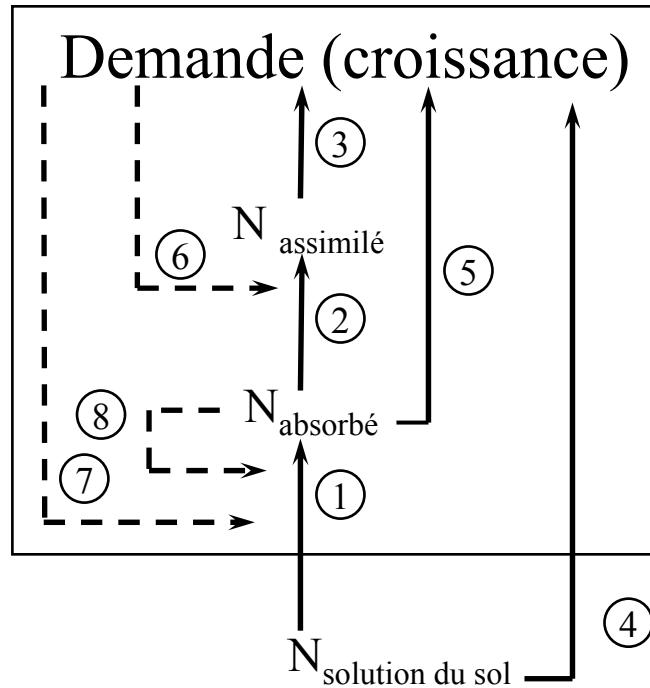


Figure I.14 : Schéma décrivant les différentes approches de la modélisation de l'absorption de l'azote. Les lignes continues représentent les processus d'absorption / assimilation et les lignes en pointillés les processus de régulation. ① : absorption ; ② : assimilation ; ③ : utilisation ; ④ et ⑤ : contrôle de la croissance par l'absorption et l'assimilation de l'azote ; ⑥ et ⑦ : rétrocontrôle de l'assimilation et de l'absorption par la croissance ; ⑧ : rétrocontrôle de l'absorption par l'azote endogène. D'après Le Bot *et al.* (1998).

l'absorption d'azote chez *Brassica napus* du fait que les équations mathématiques descriptives de l'activité des différents systèmes de transport ne soient pas intégrés dans celui-ci. Par ailleurs, ce modèle ne prend en compte la compétition que du point de vue des concentrations et n'envisage pas de modifications du développement racinaire et/ou des capacités d'absorption. En effet, Lainé *et al.* (1998) ont montré respectivement chez *Lolium multiflorum* et *Brassica napus* qu'une alimentation spatialement hétérogène en nitrate modifiait la répartition de la biomasse racinaire ainsi que les capacités d'absorption : l'influx et la biomasse des racines au contact du nitrate augmentent et compensent ainsi le déficit d'absorption des parties racinaires non alimentées.

- Activité des systèmes de transport

Seule, une approche basée sur le fonctionnement des différents systèmes de transport de l'azote et leurs régulations par les facteurs endogènes et environnementaux permettra aux modèles de croissance et de développement d'être opérationnels durant tout le cycle de culture et dans une large gamme de conditions climatiques. C'est pourquoi les physiologistes ont tenté de développer des modèles mécanistes s'appuyant sur (i) l'activité des systèmes de transport, définie par des équations mathématiques descriptives de type Michaelis-Menten, (ii) la disponibilité de l'azote au niveau racinaire (*via* l'utilisation des équations de flux de masse et de convection) et (iii) une estimation de la croissance racinaire. C'est ainsi que de nombreux auteurs ont élaboré des modèles d'absorption pour le phosphore (Silberbush et Barber, 1983 ; Bidin, 1985 ; Gillespie et Pope, 1990), le potassium (Silberbush et Barber, 1983 ; Van Rees *et al.*, 1990 ; Kelly *et al.* 1992). Outre l'avantage de prendre en compte le fonctionnement des systèmes de transport en relation avec la concentration de l'élément étudié, ces modèles permettent aussi, *via* les analyses de sensibilité, de déterminer les paramètres affectant de façon significative l'absorption. Cependant, dans cette approche, n'est prise en compte que l'offre en azote du sol. En effet, l'absence d'intégration des facteurs endogènes et environnementaux, susceptibles de réguler l'activité des systèmes de transport, ne permet pas de rendre compte du contrôle de l'absorption par la demande en azote des parties aériennes (Modèle hypothétique de Touraine, 1992). En effet, seule une limitation de la croissance racinaire et/ou une modification de la disponibilité en azote dans ces modèles sont susceptibles d'exercer un contrôle sur la quantité d'azote absorbé par le végétal.

c. Intégration de régulations s'exerçant sur l'activité des systèmes de transport

Des modèles plus ciblés ont été construits afin de prendre en compte ces régulations. Par exemple, le modèle proposé par Càrdenas-Navarro *et al.* (1999) chez la tomate permet d'intégrer les effets des concentrations externes (Nsol) et internes (Ni) en nitrate sur l'influx de nitrate dans les équations de type Michaelis-Menten (Tableau I.I). Pour des concentrations variables en nitrate dans le milieu, ces auteurs ont déterminé une valeur seuil en nitrate interne pour laquelle l'influx est nul ("set-point"). L'ajustement satisfaisant des sorties du modèle aux valeurs expérimentales semble mettre en évidence l'existence d'un rétro-contrôle négatif du nitrate endogène sur l'absorption. Cependant, des travaux récents effectués au niveau moléculaire ont montré que l'absorption du nitrate serait régulée par les produits de son assimilation (NH_4^+ , acides aminés) plutôt que par le nitrate lui-même (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002). En effet, l'élaboration d'un modèle d'acquisition de l'azote (absorption du NO_3^- et fixation de N_2 atmosphérique) en fonction de la taille du pool circulant des composés azotés réduits permet de simuler correctement le prélèvement d'azote chez le trèfle blanc en conditions contrôlées (Soussana *et al.*, 2002). Ces modèles, élaborés à partir de données obtenues en conditions contrôlées, restent difficilement transposables en conditions de plein champ. En effet, un changement d'échelle de temps (de l'heure ou du jour au cycle de culture) et d'espace (de la racine à la plante entière ou au peuplement) peut poser quelques problèmes. Cette transposition oblige à déterminer précisément les variables d'entrée du modèle (biomasse racinaire, concentration en nitrate de la solution du sol) et les fluctuations des paramètres cinétiques (constante apparente d'affinité, K_m ; vitesse maximale d'absorption du nitrate, V_{max}) déterminées, par exemple, à partir de racines excisées prélevées au champ (Léon *et al.*, 1995). Des tentatives de transfert de modèles d'absorption au niveau du cycle de culture ont cependant déjà été réalisées pour l'ammonium, le phosphore et le potassium chez le riz (*Oriza sativa* ; Téou *et al.*, 1995).

2. Modèle de répartition de l'azote

La modélisation de la répartition de l'azote, qui repose sur la demande en azote de chaque organe, varie en fonction de la période du cycle de culture : période végétative ou reproductrice.

a. Période végétative

Dans les modèles agronomiques de croissance et de développement, la demande en azote est généralement définie dans chaque organe par la teneur en azote optimale permettant un croissance maximale au cours du temps (Daisy, Hansen *et al.*, 1991 ; CERES-Colza, Gabrielle *et al.*, 1998a). Une valeur maximale et résiduelle, correspondant à l'azote structural (non remobilisable), est déterminée expérimentalement et intégrée dans le modèle. Bien que cette approche permette de simuler correctement la distribution de l'azote dans la plante au cours de la période végétative dans les conditions de l'expérimentation, la prise en compte empirique de l'allocation de l'azote au sein du végétal rend le fonctionnement de ces modèles difficilement extrapolable à d'autres géotypes et d'autres conditions environnementales, mettant ainsi en évidence la nécessité d'utiliser des approches mécanistes pour établir des règles d'allocation de l'azote. D'autres approches mécanistes alternatives sont basées sur le modèle de Minchin *et al.* (1993), qui s'appuie lui-même sur la théorie de Münch du flux de masse des assimilats. Dans ce modèle, les relations sources/puits sont déterminées, d'une part, par la différence de concentration en assimilats entre la source et le puits et, d'autre part, par l'activité des organes puits. Tabourel-Tayot et Gastal (1998a, b), en utilisant conjointement la distribution des assimilats carbonés selon la théorie de Münch et le ratio C/N de chaque tissu, ont développé un modèle de répartition de l'azote et du carbone (appelé "MeCaniCal") chez *Lolium perenne*. La demande en azote est associée à l'activité des organes puits, définie par trois processus caractérisant la croissance et le fonctionnement de l'organe: la respiration, la synthèse protéique et la mise en place des structures. Dans ce modèle, la répartition de l'azote est uniquement basée sur l'acquisition et l'utilisation de l'azote, omettant ainsi les processus de transport phloémique. Cette approche se justifie par le fait que les paramètres nécessaires pour utiliser le modèle qui intégrerait ces processus (résistance hydraulique phloémique et concentration des assimilats dans les organes source) sont difficiles à mesurer précisément (Bancal et Soltani, 2002).

Des facteurs de l'environnement, susceptibles de modifier l'activité des organes puits, peuvent influencer sur la répartition de l'azote. De ce fait, le modèle "MeCaniCal" a été développé afin d'intégrer, par exemple, l'effet du rayonnement et de la nutrition azotée sur la dynamique de l'azote. L'intégration de ces facteurs agit soit directement sur la répartition de l'azote soit indirectement *via* une altération de l'activité des organes puits. Par exemple, la remobilisation de l'azote des feuilles les moins éclairées vers les plus éclairées augmente

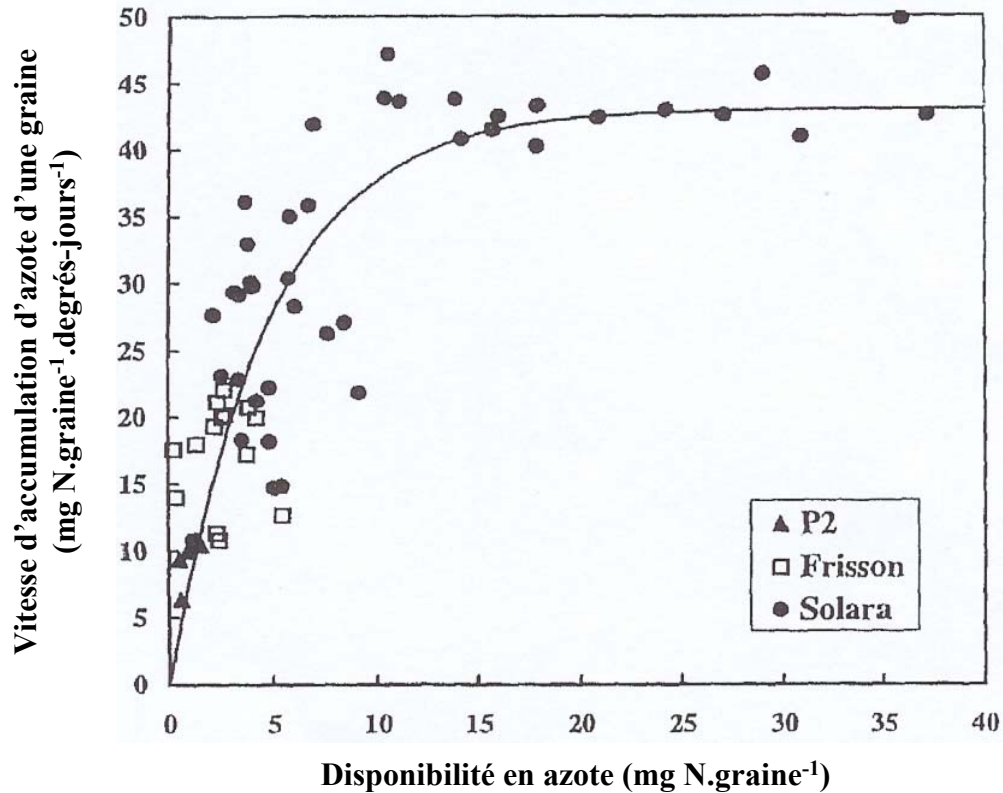


Figure I.15 : Relation entre la vitesse d'accumulation d'azote d'une graine (V_N) et la disponibilité en azote chez différentes variétés de pois et pour différents niveaux de nutrition azotée (*Pisum sativum*). D'après Lhuillier-Soundele (1999).

l'activité de la photosynthèse de 15 à 20 % selon les espèces étudiées (Grindlay, 1997). Un modèle conceptuel proposé par Lemaire et Millard (1999) permettrait également d'intégrer les variations de température. Une augmentation de la température entraîne une stimulation de la multiplication cellulaire dans les feuilles chez *Lolium perenne* induisant une élévation des exportations azotées vers ces puits (Lemaire et Millard, 1999). Ainsi, des approches mécanistes, basées sur des processus physiologiques (respiration, turn-over protéique, photosynthèse) intégrant les variables de l'environnement, ont été développées afin de prédire ou de mieux décrire la répartition de l'azote au sein du végétal. Cependant, ces modèles n'intègrent pas les régulations endogènes s'exerçant sur la distribution de l'azote *in planta*.

b. Période reproductrice

La période reproductrice se caractérise notamment par l'apparition puis le remplissage en azote des organes reproducteurs à partir de l'azote issu de l'absorption et/ou de la remobilisation des tissus végétatifs. Dans la plupart des modèles, l'absorption est considérée comme négligeable après l'anthèse comme dans le modèle de Sinclair et Amir (1992). Par conséquent, la quantité d'azote disponible à partir des sources est simulée à un moment donné du cycle par la différence entre la teneur en azote des tissus et la teneur en azote correspondant à l'azote structural non remobilisable (modèle SUCROS ; Van Keulen et Seligman, 1987). Lorsque la quantité en azote disponible est faible, ce sont les organes source qui limitent le remplissage en azote des graines comme c'est le cas dans les modèles développés chez le pois (Lhuillier-Soundele *et al.*, 1999, Figure I.15). A l'inverse, quand l'offre en azote est importante, la vitesse d'accumulation est plafonnée par les activités de croissance et/ou métaboliques des organes puits. Dans ce cas, la vitesse d'accumulation de l'azote est définie par rapport à la croissance des graines ($\text{mg N. g}^{-1} \text{ graines. degrés-jour}^{-1}$) (Figure I.15). Par ailleurs, d'autres modèles intègrent une valeur seuil de teneur en azote dans les graines au-dessous de laquelle la vitesse de remobilisation de l'azote, notamment à partir des feuilles, est accélérée pour répondre à la demande en azote des organes puits. Néanmoins, la quantité remobilisable étant fixée dans le modèle, l'accélération de la vitesse de remobilisation de l'azote à partir des feuilles n'a pour effet que d'accélérer la sénescence foliaire (Sinclair et Amir, 1992). Si la demande en azote des puits n'est toujours pas satisfaite, certains modèles intègrent une reprise de l'absorption d'azote (SIRIUS, Jamieson *et al.*, 1998). Les règles d'allocation déterminant les flux d'azote ne sont pas encore clairement établies et les modèles comme SIRIUS sont utilisés pour déterminer les compartiments,

sources ou puits, limitant le remplissage en azote des graines. Ainsi, les simulations effectuées à l'aide du modèle SIRIUS (Jamieson *et al.*, 1998 ; Jamieson et Semenov, 2000) montrent que la remobilisation de l'azote à partir des organes sources constitue le facteur limitant le remplissage en azote des graines chez le blé.

D. Conclusions et objectifs de recherche

L'analyse bibliographique a révélé que l'activité des systèmes de transport (HATS et LATS) n'était pas intégrée dans les modèles agronomiques de croissance et de développement. De plus, il existe peu d'études consacrées à la régulation de l'activité des systèmes de transport par des facteurs environnementaux (températures, rayonnement) ou endogènes (cycle nyctéméral, ontogénèse). Par conséquent, l'activité des systèmes de transport est-elle régulée de la même façon par ces différents facteurs? Quel est l'impact de ces facteurs sur l'activité des systèmes de transport au cours du cycle de culture? Quelle est la contribution relative de chaque système de transport à l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture?

Par ailleurs, l'analyse bibliographique a mis en évidence, d'une part, la contribution importante de l'azote issu des tissus végétatifs, en particulier la hampe et les feuilles, au remplissage en azote des graines et, d'autre part, la restitution d'une quantité importante d'azote, notamment par voie foliaire, dans l'environnement avant et pendant la floraison. Cependant, la dynamique de l'azote au sein du compartiment foliaire est encore mal décrite. En effet, est-ce que toutes les feuilles ont des capacités identiques de remobilisation? Quels sont les étages foliaires participant majoritairement au remplissage en azote des siliques? Quelle est l'origine de l'azote participant au remplissage des feuilles?

L'ensemble de ces questions nous a conduit à définir les objectifs de recherche suivants:

- ◆ Nous avons tout d'abord étudié l'effet de facteurs environnementaux (température, rayonnement) et endogènes (cycle nyctéméral, ontogénèse) sur les activités des systèmes de transport du nitrate (HATS et LATS). L'utilisation conjointe des lois d'action, obtenues en conditions contrôlées, et des variables d'entrée (concentrations en nitrate dans les différentes couches du sol, température, rayonnement, matière sèche racinaire du pivot) disponibles dans la banque de données Colza de l'INRA (Gosse *et al.*, 1999) nous a permis de construire un

modèle mécaniste simulant l'absorption du nitrate à l'échelle du peuplement au cours du cycle de culture. A la différence du modèle STICS et du modèle CERES-Colza, la limitation de la demande en azote ne repose pas sur la loi de dilution de l'azote des parties aériennes mais uniquement sur l'effet de variables environnementales et endogènes s'exerçant sur l'activité de l'ensemble des systèmes de transport (HATS et LATS) ajustée à l'aide des équations cinétiques (Premier chapitre de résultats).

- ◆ Dans un deuxième temps, nous avons quantifié les flux d'azote issu de l'absorption et de la remobilisation du stade "reprise de végétation" (C2) au stade "maturité des graines" (G5). L'étude des transferts d'azote a été réalisée en effectuant un marquage hebdomadaire avec le traceur $^{15}\text{NO}_3^-$ en conditions de plein champ. En particulier, nous nous sommes attachés à étudier la dynamique de l'azote dans chaque rang foliaire (Deuxième chapitre de résultats).
- ◆ Enfin, l'acquisition de ces données nous a permis d'élaborer un modèle décrivant la dynamique de l'azote dans les différents compartiments du colza. Dans un premier temps, la cinétique de l'azote (total ou issu de l'absorption) dans chaque organe a été décrite par des paramètres caractérisant la quantité en azote (initiale, maximale et résiduelle) ou les vitesses d'accumulation et de remobilisation de l'azote. L'utilisation de ce modèle compartimental nous a permis de tester des hypothèses conduisant à une meilleure remobilisation de l'azote à partir de feuilles (Troisième chapitre de résultats).

Table III.III. Simulation of total N uptake during the growth cycle of rape by each of the four transporters (CHATS, IHATS, CLATS, ILATS) and their activity time for an unfertilized rape culture (N0) or one receiving 273 kg N ha⁻¹ (N2).

Table III.III. Quantité d'azote nitrique absorbé (kgN. ha⁻¹) par chacune des composantes des systèmes de transport (IHATS, CHATS, ILATS, CLATS) et leur durée d'intervention (°Cdays) en fonction du niveau de fertilisation en azote (N0 : 0 kg N.ha⁻¹; N1 : 135 kg N.ha⁻¹; N2 : 270 kg N.ha⁻¹) au cours d'un cycle de culture chez *Brassica napus* L..

	N exported (kg N ha ⁻¹)		Duration (°Cdays)	
	N0	N2	N0	N2
IHATS	75	147	1254	1254
CHATS	19	32	1254	1254
ILATS	10	138	663	863
CLATS	2	28	663	863
Total	106	345	-	-

Table V. III. Seed simulated N contents (% of DW) in seeds and yield ($t\cdot ha^{-1}$) with the tested scenarii :

S0: control;

S1: total N content of LR 11-21 equal to 1 % at the leaves drop,

S2: delayed drop of LR 11-21 (at $1604.3^{\circ}Cdays$) with a total N content equal to 1%,

S3: delayed drop of LR 11-21 (at $1604.3^{\circ}Cdays$) with a total N content equal to 1% in all leaves ranks.

Table V. III. Calcul des teneurs en azote dans les graines (%N MS) et des rendements ($t\cdot ha^{-1}$) en fonction des scénarios testés:

S0: témoin;

S1: Chute des RF 11-21 avec des teneurs en azote égales à 1%,

S2: Chute retardée des RF 11-21 (à $1604.3^{\circ}Cdays$) avec une teneur en azote égale à 1%,

S3: Chute retardée des RF 11-21 (à $1604.3^{\circ}Cdays$) avec une teneur en azote égale à 1% dans tous les rangs de feuilles.

	N contents (% of DW) with a constant yield of		Yields ($t\cdot ha^{-1}$) with a constant N content	
	$3.6 t\cdot ha^{-1}$	$8.2 t\cdot ha^{-1}$	3.18%	3.18%
S0	3.18	3.18	3.6	8.7
S1	3.49	3.34	3.95	9.17
S2	3.37	3.28	3.82	9.03
S3	3.64	3.40	4.12	9.34

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

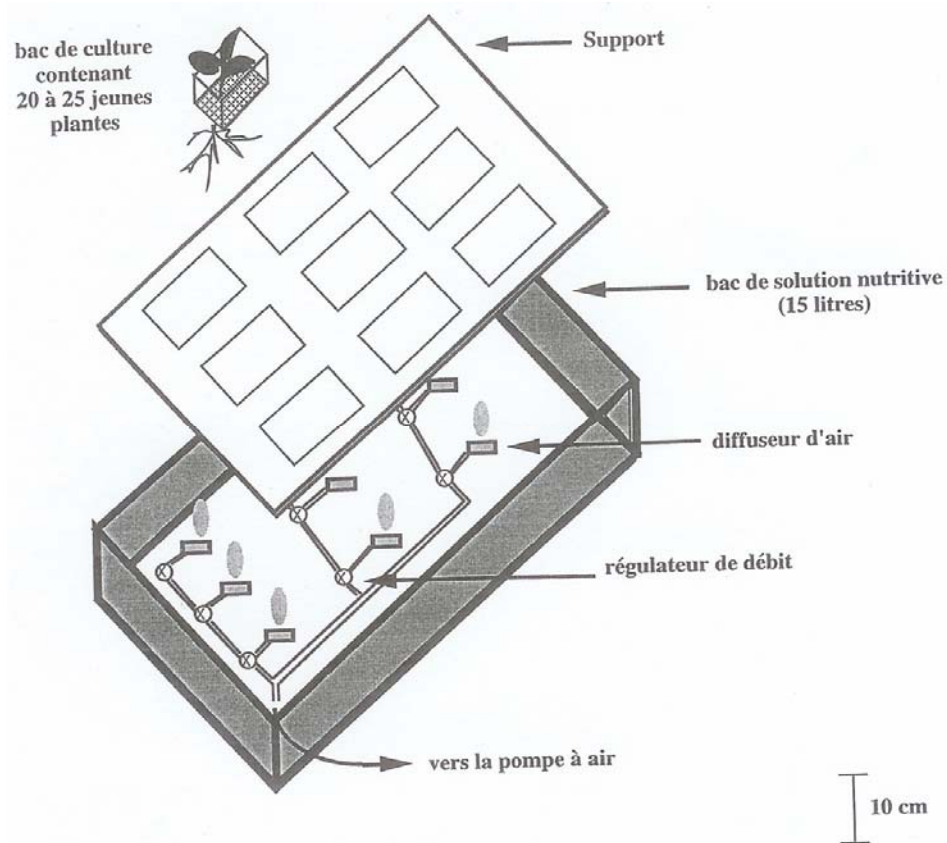


Figure II.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la culture de jeunes plantes de colza (*Brassica napus* L.) en hydroponie.

Tableau II.1. Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture en hydroponie du colza.

Macroéléments	mM	Microéléments	μM
CaCl ₂	3,0	H ₃ BO ₄	14,0
KNO ₃	1,0	MnSO ₄	5,0
K ₂ SO ₄	1,0	ZnSO ₄	3,0
MgSO ₄	0,5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,7
KH ₂ PO ₄	0,4	CuSO ₄	0,7
Fe-Na-EDTA	0,2	CoCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	0,15		

II. Matériels et méthodes

A. Matériel végétal, conditions de culture et protocoles expérimentaux

L'espèce végétale qui a été utilisée pour les différentes expérimentations en conditions contrôlées et en conditions de plein champ est une Brassicacée: le colza oléagineux à floraison semi-tardive (*Brassica napus* L., var Capitol).

1. Conditions de culture en milieu hydroponique

a. *Au laboratoire*

- Cultures des jeunes plantes (Expérimentation 1)

Les semences de colza sont stérilisées en surface avec de l'éthanol à 80 % pendant 30 secondes puis avec de l'hypochlorite de sodium à 20 % pendant 20 minutes. Elles sont ensuite rincées abondamment à l'eau déminéralisée. Les semences ainsi stérilisées sont mises à germer sur les grilles de petits bacs de culture disposés sur un support en PVC (Figure II.1) qui repose sur un bac contenant 15 litres de solution nutritive dont la composition est décrite dans le tableau II.I. Un apport de CaCO_3 effectué à raison de 200 mg.l^{-1} permet une bonne stabilité du pH à $6,5 \pm 0,2$ pendant au moins 48 heures. La solution est continuellement aérée et renouvelée tous les deux jours afin d'éviter une chute trop importante de la concentration en éléments nutritifs. Les plantes sont cultivées en serre où elles reçoivent un éclairage d'appoint de $170 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiations photosynthétiquement actives dispensées par des tubes Phytor pendant 16 heures sur 24 heures. Les températures diurnes et nocturnes sont respectivement de 25 et 18°C.

- Cultures des plantes prélevées au champ (Expérimentation 2)

Les conditions de cultures hydroponiques ne permettant pas le développement d'un pivot comparable à celui rencontré chez des plantes cultivées en conditions naturelles, des plantes de colza ont été prélevées au stade rosette, au champ, à la fin de l'hiver (début mars). Leur système racinaire a été rincé à l'eau déminéralisée, puis les plantes ont été placées sur des supports pouvant contenir 27 plantes, reposant sur des bacs contenant 15 litres de

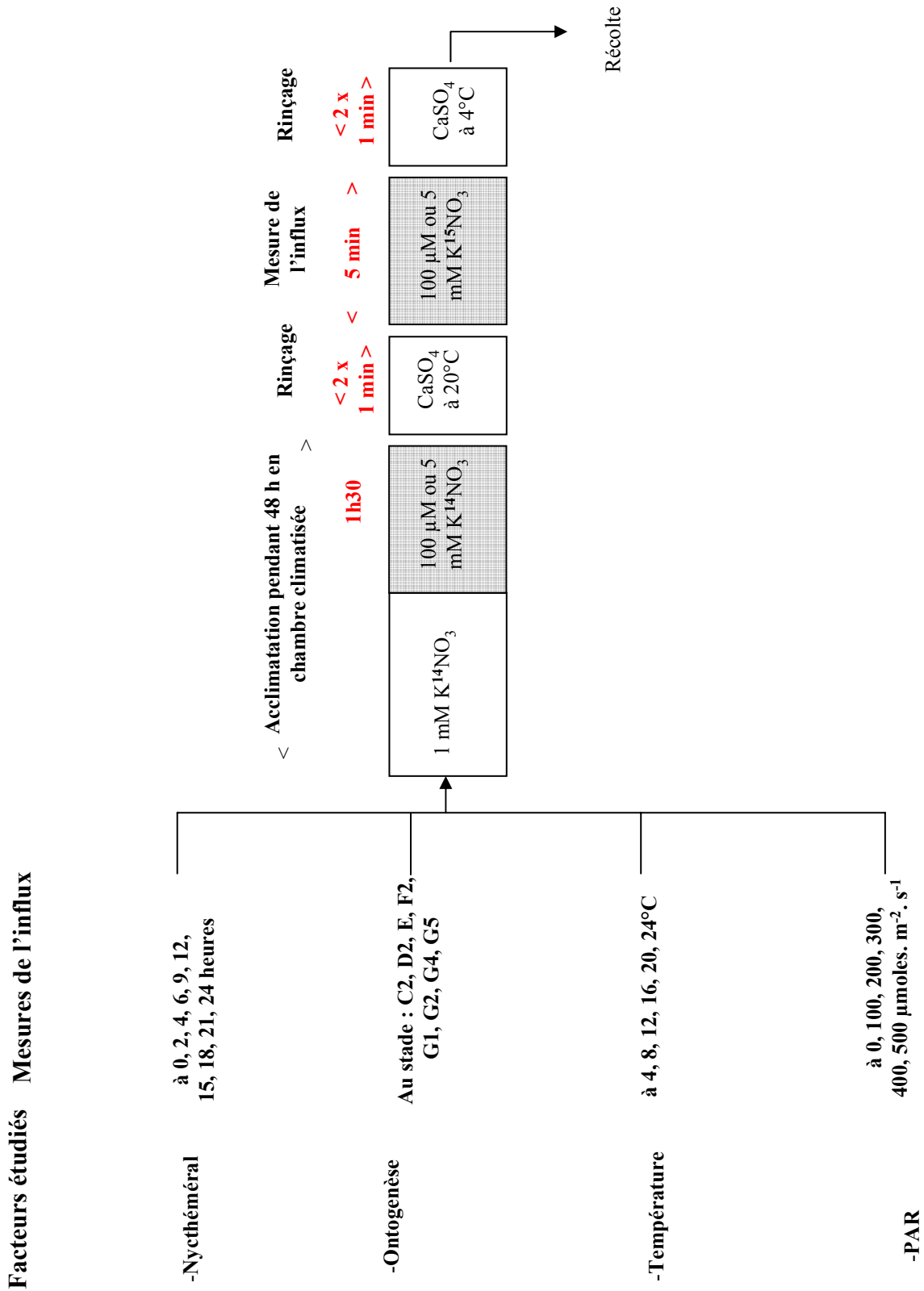


Figure II.2 : Schéma décrivant le protocole utilisé pour effectuer les mesures d'influx du $^{15}\text{NO}_3^-$ à partir de jeunes plantes de colza (*Brassica napus*) âgées de 3 semaines.

solution nutritive. Les conditions de culture en serre sont identiques à celles précédemment décrites.

b. Au champ (Expérimentation 3)

Un semis de colza d'hiver (*Brassica napus* L. var Capitol) a été réalisé le 10 septembre 2000 à Hérouvillette, à 10 km au nord de Caen (49°10' nord, 00°27' ouest), France. Deux apports de fertilisants azotés ont été réalisés sous la forme de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) à la reprise de végétation (stade C2 selon la classification du CETIOM; 75 kgN.ha^{-1}) et lors de l'élongation de la hampe florale (stade E; 150 kg.ha^{-1}). Des traitements phytosanitaires ont été effectués afin que la culture ne soit pas attaquée par des pathogènes. La densité de plantes était de 37 à 40 plantes. m^{-2} au cours de l'expérimentation.

2. Protocoles expérimentaux

a. Effets des facteurs environnementaux et endogènes sur l'influx de NO_3^- (Expérimentations 1 et 2; Figure II.2)

Les expérimentations décrites ci-dessous ont été réalisées chez de jeunes plantes cultivées en hydroponie sous serre pendant 14 jours excepté celles concernant l'étude des variations de l'influx au cours du cycle ontogénétique qui a nécessité l'utilisation de plantes plus âgées prélevées au champ.

- Effet du cycle nyctéméral (Expérimentation 1)

Les variations de l'activité des transporteurs HATS et LATS sont suivies au cours du cycle nyctéméral. L'influx est mesuré pendant la phase diurne (durée égale à 16 heures) aux temps $t = 3, 6, 9, 12$ heures après le début de l'illumination des jeunes plantes ainsi que pendant la phase nocturne (durée égale à 8 heures), c'est à dire aux temps $t = 0, 2, 4, 6$ et 8 heures après l'arrêt de l'éclairage des plantes. Avant de mesurer l'influx de nitrate, les plantes sont acclimatées pendant 1h30 sur une solution nutritive dont la concentration en nitrate est similaire à celle utilisée pour mesurer l'activité des systèmes HATS ($100 \mu\text{M}$) et LATS (5 mM).

Stades repères du colza

Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes sont à ce stade.

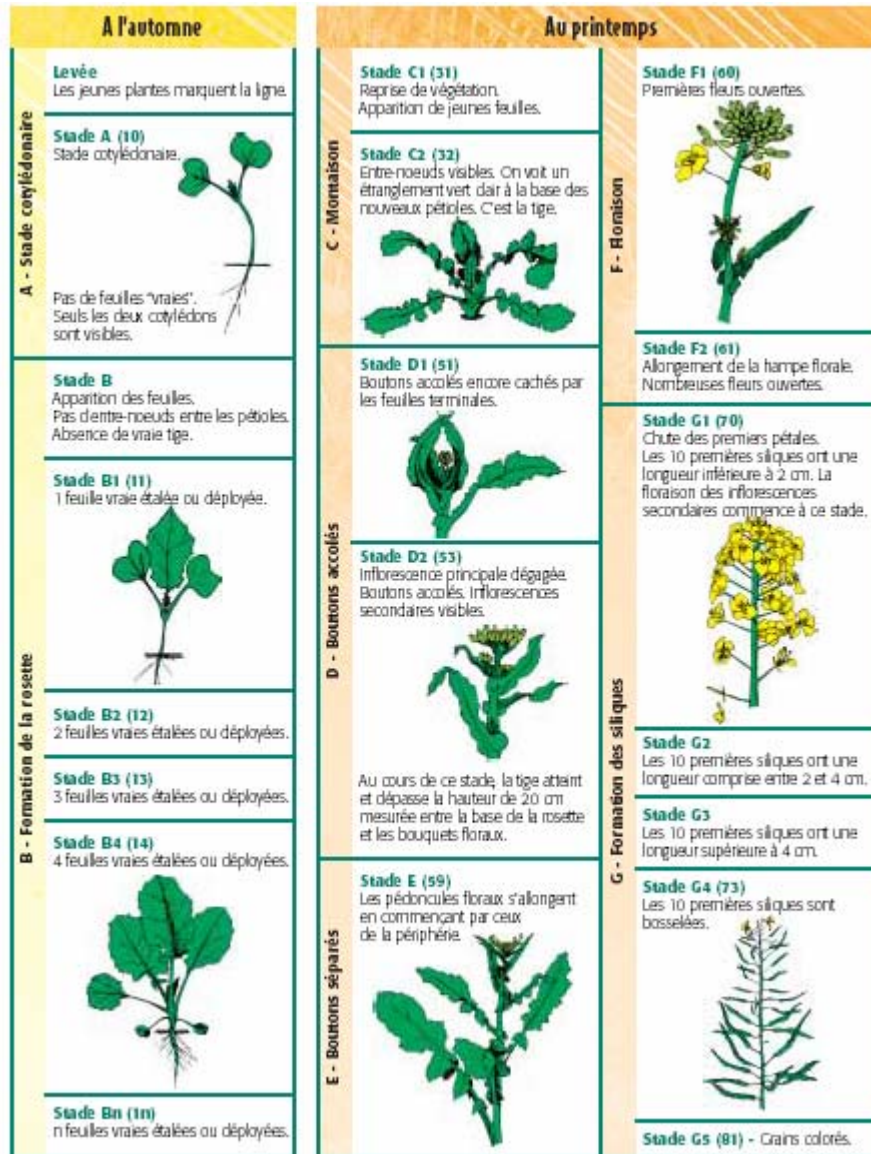


Figure II.3 : Stades repères phénologiques du colza définis par le CETIOM.

- Effet de la température appliquée au niveau du système racinaire (Expérimentation 1)

Les jeunes plantes sont acclimatées sur une solution nutritive contenant 100 μM ou 5 mM de K^{14}NO_3 pendant 1 heure 30 aux températures de 4, 8, 12, 16, 20 et 24°C avant d'effectuer les mesures de l'influx. La solution nutritive est maintenue à la température souhaitée grâce à l'utilisation d'un cryostat. Les mesures de l'activité des transporteurs HATS et LATS sont réalisées en transférant les jeunes plantes sur des solutions nutritives contenant respectivement 100 μM et 5 mM de K^{15}NO_3 , et dont la température est identique à celle utilisée précédemment pour les acclimater.

- Effet du rayonnement photosynthétiquement actif (Expérimentation 1)

Les jeunes plantes sont transférées de la serre à la chambre climatisée 48 heures avant la mesure de l'influx afin d'être acclimatées à la valeur de PAR testée (0, 100, 200, 300, 400 ou 500 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les valeurs de PAR sont obtenues en faisant varier la distance entre les lampes et le sommet du couvert. Après 1h30 d'acclimatation dans une solution nutritive contenant 100 μM ou 5 mM de K^{14}NO_3 , l'influx de nitrate est mesuré.

- Effet du cycle ontogénétique (Expérimentation 2)

L'influx de nitrate est déterminé à différents stades de développement des plantes de colza. Les stades testés (B2, B4, C2, D2, E, F2, G2, G4 et G5) sont déterminés par des caractéristiques physiologiques décrites au sein de la figure II.3. Avant de mesurer l'influx de nitrate, les plantes sont transférées pendant 1h30 sur une solution nutritive dont la concentration en nitrate est similaire à celle utilisée pour déterminer l'activité des systèmes HATS (100 μM) et LATS (5 mM).

b. Mesure de l'influx du NO_3^- par marquage ^{15}N (Expérimentations 1 et 2)

Les plantes sont transférées dans une chambre climatisée 48 heures avant la réalisation des mesures d'influx où elles reçoivent un éclairage artificiel de 180 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dispensé par des lampes à sodium haute pression (phytoclaude 400 W) pendant 16 heures sur 24 heures. La température est maintenue précisément à 20°C le jour et à 15°C la nuit.

Avant d'effectuer les mesures d'influx, les racines sont rincées deux fois en les plongeant successivement dans deux bacs contenant 600 ml de CaSO_4 (1 mM) à 20°C. Il est à noter que lors de l'étude de l'effet des basses températures, la température de cette solution est

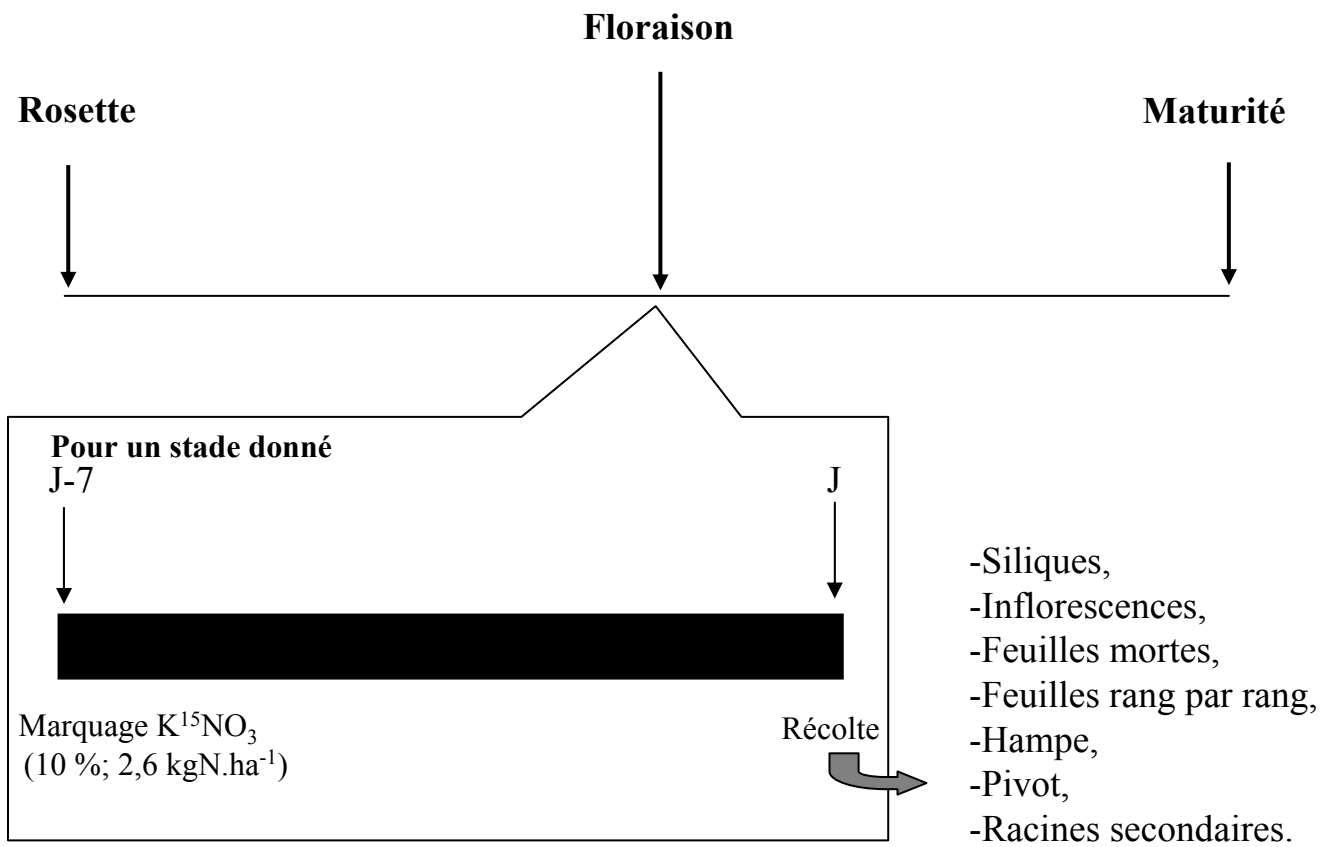


Figure II.4 : Protocole utilisé pour marquer les plantes en conditions de plein champ. A partir du stade reprise de végétation, un apport de $K^{15}NO_3^-$ (10%, 2,5 kgN.ha⁻¹) est réalisé tous les 7 jours jusqu'au stade maturité des siliques (G5) sur chaque plante.



Figure II.5 : Méthode utilisée pour attacher le pétiolle des feuilles sénescentes à la hampe du végétal (A) et pour appliquer le traceur ^{15}N à la base de chaque plante (B).

identique à celle utilisée pour effectuer la mesure afin d'éviter un choc thermique affectant l'influx.

Les racines sont ensuite essuyées, puis elles sont placées sur une solution nutritive contenant 100 μM ou 5 mM de nitrate marqué (K^{15}NO_3 , excès isotopique = 99 %) afin de mesurer les activités respectives des systèmes de transport HATS et HATS + LATS. Après 5 minutes d'exposition au traceur, les racines sont de nouveau rincées deux fois en les plongeant successivement dans deux bacs de CaSO_4 (1 mM) maintenus à 4°C afin de bloquer le métabolisme racinaire.

Les parties aériennes et les racines sont ensuite séparées, pesées (MF), séchées à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, pesées à nouveau (MS) puis réduites en poudre fine grâce à un broyeur à bille. La teneur en azote total ainsi que l'excès isotopique sont déterminés par spectrométrie de masse.

c. Mesure par marquage ^{15}N des transferts d'azote au sein du végétal depuis la reprise de végétation jusqu'au stade maturité des graines en conditions de plein champ (Expérimentation 3 ; Figure II.4)

Un marquage hebdomadaire ^{15}N en conditions de plein champ est réalisé afin de suivre la dynamique de l'azote issu de l'absorption et de la remobilisation au sein du végétal de la reprise de végétation (C2) jusqu'au stade maturité des graines (récolte finale ; G5).

Sept jours avant chaque récolte, 12 plantes estimées au même stade de développement selon les critères définis par le CETIOM (Figure II.3) sont échantillonnées dans le couvert. Au niveau de chaque plante, le pétiole de chaque feuille sénescence, susceptible de se détacher du végétal entre deux dates de récolte, est attaché à la hampe avec un fil de nylon (Figure II.5A). Grâce à ce dispositif, qui permet la récolte des feuilles sénescences entre deux dates de marquage, il est possible de déterminer de manière très précise la biomasse des feuilles mortes ainsi que leurs teneurs en azote tout au long de l'expérimentation. 750 ml de K^{15}NO_3 (Excès isotopique=10%) à la concentration de 1 mM sont ensuite épandus sur une surface de 400 cm^2 de sol autour du végétal, en faisant attention de ne pas marquer la base du végétal par une application directe du traceur (Figure II.5B). Après sept jours de marquage, les plantes sont récoltées avec une attention particulière pour le système racinaire localisé dans les 30 premiers centimètres de sol afin de récupérer l'ensemble du pivot et des racines latérales. Les 12 plantes sont alors regroupées en trois lots de quatre plantes. Les plantes récoltées sont ensuite séparées de la manière suivante : racines latérales, pivot, feuilles vertes, feuilles mortes, hampe, inflorescences, siliques, parois des siliques et graines pour les stades de

développement les plus avancés. Après avoir été numérotées, les feuilles vertes sont récoltées en fonction de leur position et donc de leur rang sur la hampe. Par convention, la numérotation a été effectuée du bas vers le haut du couvert. Le numéro de la première feuille présente sur la hampe a été déterminé suite au dénombrement des cicatrices présentes sur le collet et sur la hampe. L'utilisation de ce protocole, déjà utilisé par Titonel *et al.* (1988), a permis d'obtenir un nombre de rangs foliaires (36) comparable avec celui rencontré dans la bibliographie chez la même espèce (37 : Titonel *et al.* (1988)).

Lors de chaque récolte, cinq prélèvements de sol ont été effectués sur une profondeur de 30 cm (correspondant au seul horizon présent sur la parcelle) afin de déterminer la concentration en nitrate de la solution du sol et sa teneur en eau. Par ailleurs, les données climatiques, correspondant à la période de l'expérimentation, ont été fournies par la station météorologique de Carpiquet. L'ensemble de ces données a été, par la suite, utilisé pour la validation du modèle absorption, élaboré à l'aide des données issues de la banque INRA-colza (<http://www-bioclim.grignon.inra.fr/ecobilan/base/accueil.html>).

B. Méthodes d'analyse et de calcul

1. Extraction et dosage du nitrate présent dans le sol

Après avoir rassemblé et homogénéisé les échantillons de sols (3 échantillons par date de récolte correspondant à 3 carottages), le nitrate est extrait avec une solution de KCl (1 mM). Le nitrate est ensuite dosé grâce à une chaîne d'analyse Technicon dont le principe repose sur la réduction du NO_3^- en NO_2^- par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium et analyse colorimétrique (réactif de Griess) du contenu en nitrite.

2. Dosage de l'azote total et analyse isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

Le système utilisé pour les analyses isotopiques comprend un spectromètre de masse ("twenty-twenty", Europa Scientific) permettant de mesurer le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, couplé à un appareil assurant la production de N_2 à partir d'échantillons solides ou liquides (Roboprep CN).

Les échantillons, sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des nacelles en aluminium de 4 mm de diamètre et de 6 mm de hauteur de façon à injecter 80 à

100 µg d'azote dans le spectromètre de masse. La masse précise de l'échantillon est alors notée à ± 1 µg.

Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans un injecteur en tête de la colonne de combustion (injecteur Robopreb CN). Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu en tête de colonne d'oxydation (Cr_2O_3 et oxyde de cuivre à une température de 1000°C). Une élévation de température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme de N_2 , CO_2 , H_2O et d'oxydes d'azote. La réduction de ces derniers en N_2 est alors assurée par un passage sur une colonne de cuivre métallique à 600°C (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du CO_2 est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du "carbisorb"(PDZ Europa).

L'azote gazeux est injecté dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé. Les ions moléculaires positifs alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés dans un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse (m) à leur charge (z). Toutes les molécules de N_2 ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est directement affecté par leur masse. Ainsi, la déviation de l'azote moléculaire de masse 28 sera plus importante que celle de l'azote de masse 29, elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30.

Les ions sont ensuite collectés sur trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification de l'azote est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$) et 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$). L'abondance isotopique en ^{15}N est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 29/28 pour de faibles excès isotopiques et 30/29 pour des excès isotopiques élevés.

3. Méthode de calcul de l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$ (Expérimentations 1 et 2)

A partir de l'excès isotopique et de la teneur en azote total d'un échantillon, il est possible de calculer la vitesse d'influx du nitrate.

Soit : - MS : le poids de la matière sèche de l'échantillon en g

- N : la teneur en azote total de l'échantillon en %

- E : l'excès isotopique de l'échantillon en %

- Es : l'excès isotopique de la solution nutritive marquée ^{15}N
- d : la durée de l'incubation exprimée en heure
- MS rac. : le poids de la matière sèche des racines secondaires en g

Exprimée en μmoles par heure et par gramme de matière sèche racinaire, la vitesse d'influx du NO_3^- dans la racine est égale à :

$$\frac{\text{MS} \times \text{N}/100 \times \text{E}/100}{\text{d} \times \text{MS rac.} \times 15 \times \text{Es}} \times 100 \times 10^6$$

4. Détermination de la répartition de l'azote issu de l'absorption et de l'azote endogène (Expérimentation 3)

Lors de l'épandage du K^{15}NO_3 , le mélange du ^{15}N provenant du fertilisant avec l'azote du sol entraîne une dilution de l'excès isotopique initial. Ne connaissant pas exactement le facteur de dilution du ^{15}N ainsi que la fluctuation de l'excès isotopique de la solution du sol entre la date où le marquage est réalisé et la date de récolte des plantes, l'absorption n'a pas pu être directement déterminée *via* la quantité de ^{15}N retrouvé dans la plante. Par conséquent, l'absorption d'azote au niveau de la plante entière est déterminée par différence de son contenu en azote total entre deux dates de récolte.

En revanche, l'excès isotopique mesuré dans chaque tissu a permis de calculer la répartition de l'azote absorbé. En émettant l'hypothèse que l'azote non marqué du sol a été absorbé et réparti de façon similaire à l'azote marqué, la quantité réelle d'azote issu de l'absorption dans chaque tissu a été calculée de la façon suivante:

$$\frac{(\text{N}_{\text{j}+7\text{jours}} - \text{N}_\text{j}) \times \text{excès } ^{15}\text{N} \text{ dans chaque tissu}}{\text{Excès } ^{15}\text{N} \text{ de la plante entière}}$$

Avec N_j : la quantité en azote total (mg) au jour j correspondant au jour d'apport du K^{15}NO_3 ,

$\text{N}_{\text{j}+7\text{jours}}$: la quantité en azote total (mg) au jour j+7 jours après que le K^{15}NO_3 ait été apporté.

La quantité d'azote endogène (*i.e.* la quantité d'azote déjà présente à la reprise de végétation) est calculée par la différence entre la quantité d'azote total et la quantité d'azote provenant de l'absorption. Le flux d'azote endogène, correspondant au flux d'azote issu de la remobilisation, est calculé pour chaque tissu entre deux récoltes par la différence entre la quantité en azote endogène au jour j et la quantité d'azote total au jour j-7.

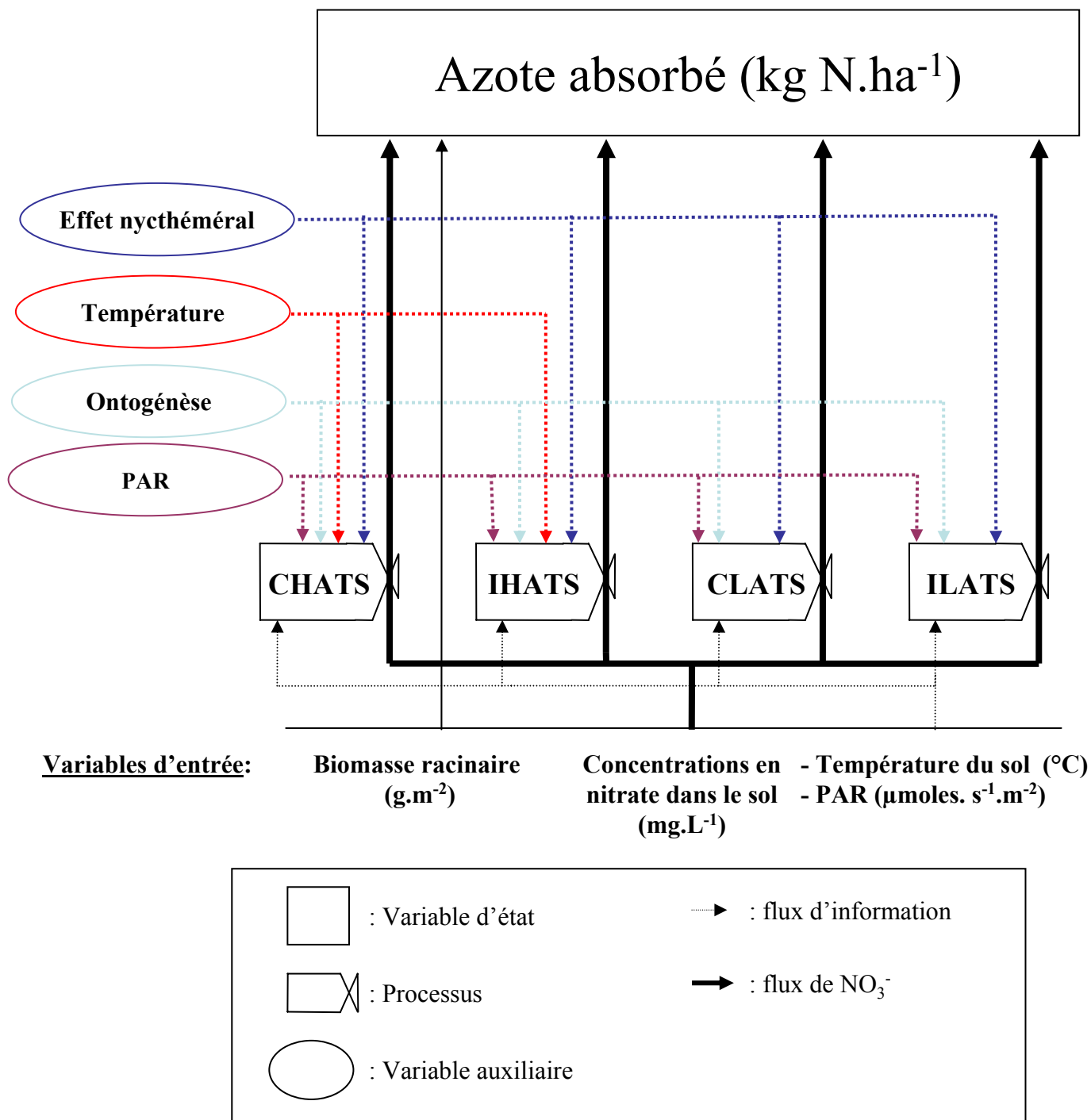


Figure II.6 : Diagramme utilisé pour modéliser l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture chez *Brassica napus* L..

Pour chaque organe et pour les différents rangs de feuilles, plusieurs paramètres caractérisant la dynamique de l'azote ont été calculés:

- la quantité cumulée d'azote issu de l'absorption et issu de la remobilisation allouée à chaque rang de feuille,
- la quantité cumulée d'azote remobilisé à partir d'un rang de feuille,
- la capacité de remobilisation apparente de l'azote total exprimée en pourcentage de la quantité en azote maximale ($= [(N_{max}-N_{min}) \times 100/N_{max}]$ où N_{max} et N_{min} correspondent, respectivement, à la quantité maximale et minimale en azote total),
- la date d'apparition, de chute et de début de remobilisation de l'azote endogène de chaque rang de feuille exprimée en °Cjours.

5. Exploitation statistique

L'ensemble des expérimentations est réalisé systématiquement avec 3 ou 6 répétitions. Les données obtenues sont présentées sous la forme de moyenne. La variabilité des résultats est donnée dans le texte ou les figures sous la forme de la moyenne \pm l'écart type à la moyenne (SE, "standard error") pour $n = 3$ ou 6 .

C. Construction des modèles

1. Modèle d'absorption du NO_3^-

a. Bases du modèle

Le processus d'absorption est décrit par le fonctionnement des systèmes de transport du nitrate (CHATS, IHATS, CLATS et ILATS) (Figure II.6). Les activités de chacun de ces systèmes sont définies par les équations mathématiques descriptives des cinétiques obtenues en conditions contrôlées par Faure-Rabasse *et al.* (2002; Figure I.1). Rappelons que pour des concentrations en nitrate inférieures à $200 \mu\text{M}$ dans la solution nutritive, l'activité des systèmes d'absorption du CHATS et du IHATS suit une cinétique de type Michaelis-Menten: $I = I_m \times [\text{NO}_3^-] / ([\text{NO}_3^-] + K_m)$ avec $I_{max} = 27$ et $135 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS racinaire}$; $K_m = 16$ et $85 \mu\text{M}$, respectivement pour le système CHATS et IHATS. Pour des concentrations supérieures à $900 \mu\text{M}$ et à 1 mM , les activités du CHATS+CLATS et IHATS+ILATS sont proportionnelles à la concentration en nitrate dans la solution nutritive: $I = a \times [\text{NO}_3^-] + b$ (avec $a = 0.007$ et $0.01 \text{ L h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS racinaire}$; $b = 19.54$ et $136.8 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$

racinaire, respectivement pour le système CHATS+CLATS et IHATS+ILATS). L'activité propre du système ILATS est obtenue en retranchant de l'activité du IHATS+ILATS celle du IHATS. De même, en retranchant de l'activité CHATS+CLATS celle du CHATS, il est possible d'en déduire l'activité du CLATS.

b. Intégration des variables environnementales et endogènes

Les effets des facteurs étudiés sur les activités des systèmes de transport sont intégrés dans le modèle afin de prendre en compte les régulations à court terme (cycle nyctéméral) et à long terme (cycle ontogénétique) ainsi que celles exercées par les variables de l'environnement (température et rayonnement) susceptibles d'affecter directement ou indirectement l'absorption du nitrate.

Les courbes de réponse décrivant l'impact de ces différents facteurs sur l'activité de l'influx du HATS et du HATS+LATS ont été ajustées à l'aide d'équations polynomiales. Par ailleurs, une valeur standard (SI) a été déterminée pour chaque facteur étudié: $SI_{\text{cycle nyctéméral}}$, $SI_{\text{ontogénèse}}$, $SI_{\text{température}}$, SI_{PAR} . Ces valeurs ont été obtenues dans des conditions équivalentes à celles utilisées pour la détermination des cinétiques d'absorption par Faure-Rabasse *et al.* (2002). Les valeurs de SI retenues correspondent à un influx mesuré à 12 h pour le cycle nyctéméral, à 20°C pour la température, à 300 $\mu\text{moles}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ pour le PAR (Photosynthetically Active Radiations) et au stade B4 (4 feuilles vraies) pour le cycle ontogénétique. De manière à uniformiser les valeurs de SI obtenues lors des diverses expérimentations, un facteur de correction a été utilisé. L'application de ce facteur, défini par le ratio entre la valeur de l'influx obtenue par l'équation ajustée et la valeur de SI, permet de calculer un influx corrigé (CI) pour chacun des facteurs étudiés.

c. Calcul de l'absorption simulée non régulée et régulée

L'absorption simulée **non régulée** (exprimée en $\text{kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$) est calculée à partir des cinétiques d'absorption des systèmes de transport en ne prenant en compte que la concentration en nitrate du sol, la biomasse racinaire dans les différentes couches du sol et la densité de plantes pendant le cycle de culture. Le transfert d'échelle de temps, de l'heure au jour, est alors obtenu en multipliant la valeur des influx par 24.

L'absorption simulée **régulée** est déterminée en multipliant les valeurs d'influx issues des équations cinétiques par le facteur de correction (CI). L'intégration des facteurs « cycle nyctéméral » et « cycle ontogénétique » ont respectivement permis le changement d'échelle de l'heure au jour puis du jour au cycle de culture. Les changements de la durée de la photopériode ont également été pris en compte avec une durée de photopériode de référence dans le modèle égale à 960 minutes (photopériode longue).

d. Variables d'entrée et de sorties

Les variables d'entrée sont issues de la banque colza de l'INRA construite à partir d'expérimentations menées à Grignon, Châlons, Laon et Dijon. Tous les détails de l'expérimentation peuvent être consultés dans les articles de Gabrielle *et al.* (1998a) et de Gosse *et al.* (1999) ou sur le site internet (<http://www-bioclim.grignon.inra.fr/ecobilan/base/accueil.html>).

Parmi l'ensemble des données mesurées au cours du cycle de culture, la concentration en nitrate du sol, la teneur en eau, la température du sol, le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) et les données relatives à la plante (matières sèches du pivot et des parties aériennes, teneur en azote) ont été utilisées.

La **biomasse racinaire** a été déterminée après extraction manuelle des plantes si bien que celle-ci ne représente que la biomasse du pivot étant donné que la quasi-totalité des racines latérales ont été arrachées lors de la récolte. Des expérimentations réalisées au laboratoire ont montré que le pivot participait peu à l'absorption du nitrate (environ 1 %). Ainsi, l'estimation de la biomasse du chevelu racinaire participant activement à l'absorption du nitrate a constitué l'une des difficultés de ce travail. En effet, aucune donnée n'est disponible dans la littérature. Par conséquent, les données obtenues dans le cadre des différentes expérimentations conduites au laboratoire à partir des plantes de colza prélevées en conditions de plein champ ont été utilisées. Ces plantes, une fois acclimatées en conditions contrôlées (et de ce fait ayant reconstitué leur chevelu racinaire), ont été utilisées pour différentes expérimentations. **La récolte a permis d'estimer un rapport pondéral racines latérales/(pivot racinaire+racines latérales) égale à 43 % et constant au cours du cycle de développement. Cette valeur a été introduite comme un paramètre (p) dans le modèle afin de calculer la biomasse du chevelu racinaire.** La répartition de la biomasse du chevelu racinaire dans les différentes couches de sol a été estimée au champ en utilisant les fréquences

d'occupation racinaire au cours du cycle de culture. **La biomasse du chevelu racinaire présente dans chaque couche de sol à une date donnée est calculée à partir de la biomasse totale du chevelu et du coefficient de répartition de ce chevelu le long du profil racinaire.**

La **concentration en nitrate du sol** a été mesurée tous les 15 jours dans les 4 couches explorées par le système racinaire au cours du cycle de culture (0-28, 28-60, 60-90 et 90-120 cm). L'offre en azote nitrique par le sol a été définie par le stock maximal d'azote nitrique disponible pour la culture à une date donnée du cycle de culture. Ce stock a été calculé tous les 15 jours en prenant en compte la teneur en eau et la concentration en nitrate dans les différentes couches du sol ainsi que la quantité d'azote absorbé par la culture entre deux récoltes. La quantité d'azote nitrique absorbé dans une couche du sol est le produit de l'influx régulé et de la biomasse du chevelu racinaire présent dans cette couche.

La sortie du modèle (*i.e.* l'azote nitrique absorbé par la culture) est la somme de la quantité d'azote absorbé dans chaque couche du sol explorée par le système racinaire. Le modèle d'absorption ainsi élaboré a ensuite été testé grâce à l'utilisation de données issues d'expérimentations ayant reçu trois niveaux de fertilisation (N0: 0 kg N ha⁻¹; N1: 135 kg N ha⁻¹ fractionnés en deux apports [78 kg N.ha⁻¹ le 20 février 1996 et 57 kg N.ha⁻¹ le 15 mars 1996]; N2: 273 kg N ha⁻¹ fractionnés en quatre apports [49 kg N ha⁻¹ le 12 septembre 1995; 78 kg N.ha⁻¹ le 20 février 1996; 107 kg N.ha⁻¹ le 15 mars 1996; 39 kg N.ha⁻¹ le 29 mars 1996]).

e. Hypothèses de fonctionnement du modèle

- Au niveau de l'alimentation azotée des plantes

Bien que de nombreuses espèces végétales puissent utiliser le nitrate et l'ammonium pour leur nutrition azotée, le nitrate est considéré dans le présent modèle comme la seule source d'azote disponible pour la culture de colza d'hiver. En effet, l'ammonium, contrairement à l'ion nitrate est adsorbé par les colloïdes du sol. De plus, l'ammonium est rapidement transformé en nitrate, dans la plupart des sols cultivés, sous l'action des bactéries nitrifiantes du sol. Enfin, c'est la disponibilité en nitrate dans la solution du sol qui est souvent considérée comme le facteur limitant la croissance des végétaux.

- A l'échelle de la racine

Le ratio racines latérales/(racines latérales+pivot) déterminé à partir de données obtenues en conditions contrôlées est considéré ne pas être modifié par les conditions de plein champ au cours du cycle de culture.

Par ailleurs, aucune compétition pour l'acquisition de l'eau et des nutriments n'a été intégrée au niveau racinaire dans le modèle.

- Au niveau des transporteurs

L'efflux de nitrate est considéré comme nul dans le modèle du fait que les concentrations endogènes de nitrate mesurées dans les racines de colza cultivé au champ sont inférieures à celles mesurées dans la solution du sol.

Les valeurs des paramètres cinétiques des équations mathématiques (I_{max} et K_m pour le HATS et a et b pour le HATS+LATS) sont supposées constantes au cours du cycle de culture. Cependant, les valeurs d'influx déterminées après l'intégration des différents facteurs endogènes et environnementaux (susceptibles de modifier l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture) prennent indirectement en considération les changements que subissent ces derniers, bien qu'il soit impossible de quantifier individuellement les effets des différents facteurs sur chacun d'eux.

La distribution des systèmes de transports est considérée homogène le long de la racine.

Chaque système de transport possède une régulation spécifique et indépendante. En revanche, les deux composantes inductible et constitutive de ces systèmes sont régulées de la même façon.

- Au niveau de l'intégration des différentes régulations étudiées

Etant donné que la température du zéro de végétation (correspondant à la température pour laquelle la croissance est nulle) est de 4°C chez le colza, l'influx est considéré comme nul quand la température est inférieure à cette valeur.

L'effet des différents facteurs endogènes (cycle nyctéméral) et environnementaux (température et rayonnement) sur l'activité des systèmes de transport HATS et HATS+LATS, déterminé chez des jeunes plantes de colza au stade B4 est supposé ne pas varier, quel que soit le stade de développement de la culture.

Les différents facteurs étudiés ont été intégrés de manière additive dans le présent modèle.

Notons, de plus, que l'effet du rayonnement a été pris en compte dans le modèle de la reprise de végétation jusqu'au stade « maturité des graines ». En effet, Chapman *et al.* (1984) et Mendham *et al.* (1981) ont mis en évidence une atténuation très importante du PAR (de 60 à 80 %) transmis à l'intérieur du couvert dès l'apparition des premières fleurs et/ou siliques.

2. Modèle de répartition de l'azote absorbé de la reprise de végétation jusqu'au stade maturité des graines

Après avoir construit le modèle "absorption", permettant de simuler le prélèvement d'azote par un peuplement de colza, nous nous sommes intéressés à son devenir au sein de la plante. Dans le but d'appréhender le(s) processus conduisant à une mauvaise efficacité de l'azote chez le colza d'hiver, un second modèle "répartition" a donc été élaboré. Ce modèle permet de simuler la répartition de l'azote au sein des différents organes et plus particulièrement au sein des différents rangs foliaires, en distinguant les flux d'azote issu de l'absorption et de la remobilisation des organes végétatifs de la reprise de végétation (C2) jusqu'au stade "maturité des graines" (G5) en conditions de plein champ. Le lien entre les modèles "absorption" et "répartition" sera assuré à terme par le fait que les sorties du premier constitueront les entrées du second.

a. *Modélisation des flux d'azote dans chaque organe*

- Flux d'azote entrant

☞ Le flux d'azote **issu de l'absorption** alloué à chaque organe est le produit de la quantité d'azote absorbé à l'échelle de la plante entière et du coefficient de répartition de l'azote **marqué** (^{15}N) calculé à partir des données de l'expérimentation 3 :

$$\text{Incoming exogenous N flux} = \text{N uptake} \times \text{N uptake partitionning}$$

Avec incoming exogenous N flux : flux d'azote **issu de l'absorption** alloué à chaque organe (mgN. °Cjours⁻¹),

N uptake : quantité d'azote absorbé par la plante entière (mgN. °Cjours⁻¹),

N uptake partitionning : coefficient de répartition de l'azote absorbé (%).

Ce flux d'azote issu de l'absorption peut être modélisé par une équation logistique :

$$\text{Incoming exogenous N flux} = k_{EXONAI} \times N \times (1 - N/N_{maxEXONAI})$$

Avec k_{EXONAI} : constante de vitesse d'accumulation de l'azote issu de l'absorption ($^{\circ}\text{Cjours}^{-1}$),
 $N_{maxEXONAI}$: quantité maximale accumulée d'azote issu de l'absorption (mg.plante^{-1}).

☞ Le flux d'azote **issu de la remobilisation** alloué à chaque organe est le produit entre le **pool d'azote endogène libre circulant dans la plante entière** et le coefficient de répartition de l'azote **non marqué** calculé à partir des données de l'expérimentation 3:

$$\text{Incoming endogenous N flux} = \text{endogenous N pool at plant level} \times \text{N partitioning coefficient}$$

Avec incoming endogenous N flux : flux d'azote **issu de la remobilisation** alloué à chaque organe ($\text{mgN. } ^{\circ}\text{Cjours}^{-1}$),
 endogenous N pool at plant level : pool d'azote endogène libre circulant dans la plante ($\text{mgN. } ^{\circ}\text{Cjours}^{-1}$),
 N partitioning coefficient : coefficient de répartition de la l'azote absorbé (%).

Quand l'organe a un statut **puits pour l'azote endogène**, le **flux d'azote total est égal à la somme des flux d'azote issu de l'absorption (azote marqué) et de la remobilisation des organes sources (azote non marqué)** à un moment donné:

$$\text{Flux N total} = \text{Incoming exogenous N flux} + \text{Incoming endogenous N flux}$$

- Flux d'azote sortant

Quand l'organe a un statut **source pour l'azote endogène**, le flux d'azote **sortant** correspond à la quantité d'azote **endogène remobilisé** au cours du temps. Ce flux est calculé par la différence entre le flux apparent d'azote total et le flux entrant d'azote issu de l'absorption:

$$\text{Outcoming endogenous N flux} = \text{Flux N total} - \text{Incoming exogenous N flux}$$

Avec **outcoming endogenous** N flux : flux d'azote **endogène remobilisé** ($\text{mgN} \cdot ^\circ\text{Cjours}^{-1}$),
 Flux N total : flux **apparent** d'azote total ($\text{mgN} \cdot ^\circ\text{Cjours}^{-1}$),
 Incoming **exogenous** N flux : flux d'azote **issu de l'absorption** alloué à chaque organe
 ($\text{mgN} \cdot ^\circ\text{Cjours}^{-1}$).

Le flux apparent d'azote (Flux N total) est décrit par des équations mathématiques capables de décrire précisément la dynamique de l'azote dans chaque organe. Lors de la **phase d'accumulation apparente de l'azote** dans l'organe, l'équation logistique a été retenue pour modéliser le flux en azote total:

$$\text{Flux N total} = k_{TNin} \times N \times (1 - N/N_{max})$$

Avec dN/dt : flux d'azote total ($\text{mgN} \cdot ^\circ\text{Cjours}^{-1}$),
 k_{TNin} : constante de vitesse d'accumulation de l'azote total ($^\circ\text{Cjours}^{-1}$),
 N_{max} : quantité maximale d'azote ($\text{mg} \cdot \text{plante}^{-1}$),
 N : quantité d'azote ($\text{mg} \cdot \text{plante}^{-1}$).

Lors de la **phase de remobilisation apparente de l'azote** dans l'organe, le flux d'azote total est modélisé par une équation de type exponentielle:

$$\text{Flux N total} = -k_{TNout} \times N$$

Avec k_{TNout} : constante de remobilisation de l'azote total ($^\circ\text{Cjours}^{-1}$).

Le flux d'azote total est nul quand l'organe disparaît (chute des feuilles et des inflorescences ou récolte finale) avec une quantité résiduelle en azote (N_{min}).

b. Hypothèses de fonctionnement du modèle

◆ A l'exception du pivot et des siliques qui sont considérés respectivement comme des sources et des puits permanents, chaque organe est envisagé comme un compartiment capable d'accumuler et de remobiliser l'azote. Quand l'organe a un **statut puits pour l'azote**, l'allocation de l'azote est sous le contrôle, d'une part, de l'absorption de l'azote à l'échelle de la plante entière et, d'autre part, du pool d'azote endogène libre circulant. Par conséquent, la

quantité d'azote allouée vers un organe puits est limitée par la quantité d'azote disponible dans les sources. Quand l'organe a un **statut source pour l'azote**, la quantité d'azote endogène remobilisée, qui alimente le pool d'azote endogène libre circulant, est contrôlée par le flux d'azote total et la quantité d'azote absorbé allouée vers cet organe. Par conséquent, la **quantité d'azote endogène remobilisée est sous le contrôle de la morphologie (biomasse) et du statut azoté (%N) de l'organe.** En effet, la dynamique de l'azote est définie par des paramètres caractérisant soit **la taille de l'organe** (N_{\max} , N_{\min}) soit **la capacité de l'organe source à remobiliser l'azote** (k_{TNin} , k_{TNout}).

♦ **Aucun processus de transport des assimilats azotés n'est inclus** dans le modèle. Cette hypothèse rejoint les conclusions de Bancal et Soltani (2002), qui suggèrent que la répartition des assimilats peut être modélisée sans prendre en compte les caractéristiques des processus de transport des assimilats (résistances hydrauliques phloémiques).

**CHAPITRE III. MODELING N UPTAKE IN *BRASSICA NAPUS* L. CV
CAPITOL DURING A GROWTH CYCLE USING INFLUX KINETICS
OF ROOT NITRATE TRANSPORT SYSTEMS AND FIELD
EXPERIMENTAL DATA**

III. Modeling N uptake in *Brassica napus* L. cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data

Philippe MALAGOLI¹, Philippe LAINE¹, Erwan LE DEUNFF¹, Laurence ROSSATO¹, Bertrand NEY² and Alain OURRY¹

Plant Physiology, 134: 388-400

1 – UMR INRA-UCBN 950 EVA et nutrition NCS, IRBA, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France

2 – UMR INRA-INA PG Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval Grignon, France

Abstract

The use of kinetic equations of NO_3^- transport systems in *Brassica napus* L., determined by $^{15}\text{NO}_3^-$ labeling under controlled conditions, combined with experimental field data from the INRA-Châlons rape database were used to model NO_3^- uptake during the plant growth cycle. The quantitative effects of different factors such as day/night cycle, ontogenetic stages, root temperature, PAR and soil nitrate availability on different components (Constitutive and Inducible) of the Low- and High-Affinity Transport Systems of nitrate (CLATS, ILATS, CHATS and IHATS, respectively) were then determined in order to improve the model's predictions. Simulated uptake correlated well with measured values of N uptake under field conditions for all N fertilization rates tested.

Model outputs showed that the High-Affinity Transport System (HATS) accounted for about 89% of total NO_3^- uptake (18 and 71% for CHATS and IHATS, respectively) when no fertilizer was applied. The Low-Affinity Transport System (LATS) accounted for a minor proportion of total N uptake and its activity was restricted to the early phase of the growth

cycle. However, N fertilization in spring increased the duration of its contribution to total N uptake. Overall, data show that this mechanistic and environmentally regulated approach is a powerful means to simulate total N uptake in the field with the advantage of taking both physiologically regulated processes at the overall plant level and specific nitrate transport system characteristics into account.

Key-words : uptake, *Brassica napus* L., HATS, LATS, modelling, NO_3^- .

Resumé

Les cinétiques d'absorption liées à l'activité des différents transporteurs du nitrate (faible ou forte affinité, constitutif ou inductible) chez *Brassica napus* L. ont été déterminées en conditions contrôlées grâce à l'utilisation de NO_3^- (Faure-Rabasse *et al.*, 2002). L'utilisation conjointe des équations descriptives de l'activité de ces transporteurs et de la banque de données Colza de l'INRA Grignon/Châlons/Laon/Dijon a ensuite permis d'initier une modélisation de cette absorption sur le cycle de culture. Des expérimentations permettant d'étudier les effets de différents facteurs (basses températures, cycle nyctéméral et variations ontogénétiques et rayonnement) au cours d'un cycle de culture ont également été conduites afin d'intégrer des variables auxiliaires dans le modèle.

Les simulations à l'aide du modèle montrent qu'au cours d'un cycle de culture, le système d'absorption HATS (High Affinity Transport System) participe pour 89 % à l'absorption totale du nitrate (71 et 18 % respectivement pour HATS inductible et constitutif) sans apport d'engrais azoté. Le système d'absorption LATS n'intervient qu'au moment de l'implantation de la culture. Une fertilisation à l'automne augmente sa durée d'action et sa participation à l'absorption de NO_3^- .

Les résultats issus de ce travail de modélisation ont montré que cette approche mécaniste et intégrant des régulations environnementales constituait un outil intéressant pour simuler l'absorption du nitrate à l'échelle de la plante entière et capable de prendre en compte les systèmes de transport racinaire du nitrate ainsi que les régulations s'exerçant sur ces systèmes.

Mots clés : absorption, *Brassica napus* L., HATS, LATS, modélisation, NO_3^- .

A. Introduction

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an important crop in northern Europe because of its varied utilizations (oil, biofuel). However, yields remain highly variable. As a consequence, oilseed rape has been extensively studied in order to identify key components of yield and to improve them by more effective N application with the target of reducing environmental impacts such as N leaching and improving N use efficiency for seed filling (Boelcke *et al.*, 1991; Habekotté, 1993; Schjoerring *et al.*, 1995; Sieling and Christen, 1997; Vos et Van der Putten, 1997). Many mathematical models have been built to simulate crop growth, development and yield (BRASNAP-PH: Habekotté, 1997a; LINTUL BRASNAP: Habekotté, 1997b). Some of these (DAISY: Petersen *et al.*, 1995; CERES-Rape: Gabrielle *et al.*, 1998a) have been mainly devoted to predicting ecological impacts of N losses from winter oilseed rape. When N nutrition has been taken into account, N uptake has usually been based on the balance of demand and supply. In this context, N availability in the soil solution is modeled using mass flow and NO_3^- diffusion equations (CERES N- Rape, DAISY), and N demand is often determined using the critical dilution curve, determined by Colnenne *et al.* (1998) for *Brassica napus* L. (CERES-rape). In these models, the root system is considered as a "black box". Measurements of root systems or nutrient uptake by roots are not required. Moreover, the demand/supply balance relies on the assumption that N demand is mainly regulated by shoot biomass production (Gabrielle *et al.*, 1998a). However, use of the dilution curve leads to an underestimation of N uptake when soil N concentration is high, suggesting that N uptake at the root level is subject to more complex regulation. This limitation highlights the need to adopt a mechanistic approach to predicting the N uptake by roots from the soil solution and, in a more general sense, to develop a better understanding of the regulation of N uptake regulation as proposed in the review of Jeuffroy *et al.* (2002). Because four nitrate uptake transport systems exist in plant roots and are now clearly described, an alternative approach for N uptake modeling based on the activities of N transport systems could be used. Such an approach would also provide a means to link and to extend recent knowledge of molecular and physiological characteristics of nitrate transport systems (Filleur and Daniel-Vedele, 1999; Vidmar *et al.*, 2000; Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001; see Forde, 2002 for a review). For example, although it is well known that these transport systems operate at different ranges of substrate concentrations (Siddiqi *et al.*, 1990) or react differentially to temperature, there have as yet been no efforts to predict how changes in these

two environmental factors will quantitatively affect the relative contribution of each transport system to total N uptake during plant development or at the field scale. In other words, despite numerous state of the art studies on the Low-Affinity nitrate Transport System (Huang *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2000; Fraissier *et al.*, 2001), no study has yet shown how N fertilization rates will modify its contribution, if any, in the field.

In order to model variation of N uptake in plants under field conditions, regulation of N uptake in roots has been taken into account in agronomic approaches by many authors (Kleemola *et al.*, 1996; see review by Le Bot *et al.*, 1998). Thus, potential N uptake of a crop is determined by a relationship between the biomass of roots and N uptake rate. Likewise, physiological mechanisms of N transport systems were included in some models to simulate N uptake from N transport system equations. For example, in STICS-maize (Brisson *et al.*, 1998), N supply was based on the soil N availability and on the activities of the High- and Low-Affinity Transport Systems. Despite the fact that this model was able to run at the field scale, N demand was still defined by the N dilution curve and kinetic parameters of N uptake (K_m : Michaelis-Menten constant and I_m : maximum NO_3^- influx) were assumed to be constant during the growth cycle. Adopting a more complete physiological approach (*i.e.* understanding the role of the regulation of N transport systems), other models built from experiments conducted under controlled conditions have made it possible to establish relationships between NO_3^- influx and its regulation through the negative feedback of endogenous root NO_3^- contents on root N uptake in *Lycopersicon esculentum* Mill. (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1998; 1999) and in *Triticum durum* L. (Cacco *et al.*, 2002). However, these physiological models cannot be used to predict N uptake under field conditions over the whole growth cycle. In addition, none of these models include effects of environmental variables (such as temperature or radiation) or endogenous variables (such as day/night cycle and ontogeny) known to affect plant growth as well as N uptake. Moreover, to our knowledge no physiological model takes into account recent molecular results which indicate that feedback regulations are controlled by N products derived from nitrate assimilation (NH_4^+ , amino acids) instead of directly from nitrate (Touraine *et al.*, 2001; see review by Forde, 2002).

It is well known that the maximum NO_3^- uptake capacity of roots, *i.e.* the maximum influx rate (I_m) expressed in $\mu\text{mole h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, is not constant, but varies with plant species and genotypes (Rodgers and Barneix, 1988), age (Wild and Breeze, 1981) and growth conditions (Jackson *et al.*, 1972; Hallmark and Huffaker, 1978; Lee, 1982). Therefore, I_m is not the absolute maximum uptake capacity per root unit but, rather, the maximum net inflow under

the given growth conditions, plant age and history. Little is known about the magnitude of the Im of nitrate uptake and its changes as a function of growth conditions in rape.

The aim of our experiments was to determine the effect of several environmental factors (low root temperature and PAR) and endogenous factors (day/night cycle and ontogenetic stages) on HATS and LATS activities. Regulation of these transport systems by these factors, which was formalized in a model, made it possible to simulate a regulated nitrate uptake capacity by plants. Moreover, N uptake by a rape crop during the growth cycle was simulated using field experimental data and compared to observed exported N by a rape crop under field conditions. Finally, the mechanistic model made it possible to evaluate by different simulations (i) the contribution of each NO_3^- transport system to N uptake when nitrogen fertilizer was applied at different levels (ii) the impact of each tested variable on N uptake by the crop during the growth cycle and (iii) on the basis of a sensitivity analysis, parameters for which model outputs were sensitive.

B. Materials and methods

1. Physiological experiments

a. *Plant culture*

- Experiments 1, 2 and 4

Seeds of *Brassica napus* L. cv Capitol were germinated and grown in hydroponic solution (25 seedlings per plastic tank) in a greenhouse in 1999. The aerated nutrient solution contained 1mM KNO_3 , 0.40 mM KH_2PO_4 , 1.0 mM K_2SO_4 , 3.0 mM CaCl_2 , 0.50 mM MgSO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 0.20 mM Fe-Na EDTA, 14 μM H_3BO_3 , 5.0 μM MnSO_4 , 3.0 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.1 μM CoCl_2 and was renewed every two days. pH was maintained at 6.5 ± 0.5 by adding CaCO_3 (200 mg L^{-1}). The natural light was supplemented with phytol lamps (150 $\mu\text{moles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation at the height of the canopy) for 16h per day. The thermo-period was $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (day) and 18°C (night).

- Experiment 3

Seeds of *Brassica napus* L. cv Capitol plants were taken from a field plot located in Saint-Aubin d'Arquenay (Normandy, France) when they were vernalized at the 3-4 leaf

stage. Plants with a well-developed taproot were harvested cautiously at the bolting stage (3-4 leaves), taking care not to damage the root system. The roots were gently rinsed with de-ionized water before their transfer to a hydroponic system and plants were then grown in the greenhouse as previously described.

b. Experimental treatments for NO₃⁻ influx measurements

- Experiment 1, light/darkness cycle

Fifteen-day-old seedlings were transferred from the greenhouse to a culture room for one week. Light was provided by high-pressure sodium lamps (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation at the height of the canopy) and the thermoperiod was 20°C (day) and 15°C (night). Before each measurement, plants were acclimated for 1.5 h in a nutrient solution containing either 100 μM or 5 mM KNO₃. NO₃⁻ influx was then determined at t = 3, 6, 9 and 12 h after the beginning of the diurnal period (*i.e.* 9 a.m., 12 a.m., 3 p.m. and 6 p.m.) and at t = 0, 2, 4, 6 and 8 h after the beginning of the dark period (*i.e.* 10 p.m., 12 p.m., 2 a.m., 4 a.m. and 6 a.m.).

- Experiment 2, low root temperatures

Two days before the experiments, fifteen-day-old seedlings were transferred from the greenhouse to a control room under the previously described conditions (Experiment 1). After acclimation for 1.5 h in a nutrient solution containing either 100 μM or 5 mM KNO₃ at different root temperatures (4, 8, 12, 16, 20 and 24°C) maintained with a cryostat, NO₃⁻ influx was measured. All influx measurements lasted about 45 minutes from 12 p.m. Temperatures of the solution used for NO₃⁻ influx measurements were similar to those applied during the pre-treatment.

- Experiment 3, variation during the developmental stage

For each studied developmental stage (C2, D2, E, F2, G2, G4, G5), plants were acclimated for 1.5 h to KNO₃ concentrations (100 μM or 5 mM) as previously described, before influx measurements were made at 12 p.m..

- Experiment 4, photosynthetically-active radiation (PAR)

Fifteen-day-old seedlings were transferred from the greenhouse to a controlled culture room two days before the start of treatment at the tested PAR varying from 0 to 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Different PAR were obtained by varying the height between the top of the canopy and the lamps. After acclimation for 1.5 h in a nutrient solution containing either 100 μM or 5 mM KNO_3 , NO_3^- influx was measured at 12 p.m..

When a factor was tested on NO_3^- uptake, the others remained constant during the experiment, except for the day/night cycle experiment. The thermo-period was 20°C and 15°C during the light and the dark period, respectively. Given temperature had no effect on NO_3^- uptake between 15 and 20°C, it can be assumed that its incidence on NO_3^- uptake was limited during the light/darkness cycle experiment.

c. Measurement of NO_3^- influx and harvest

NO_3^- influx rate was measured from three batches of 25 seedlings (Experiments 1, 2 and 4) or from six plants (Experiment 3). The root system was rinsed twice with 1 mM CaSO_4 solution for 1 min and then placed in a complete nutrient solution for 5 min containing either 100 μM or 5 mM $\text{K}^{15}\text{NO}_3^-$ (^{15}N excess of 99%). The extent of NO_3^- depletion from these solutions during the influx assays was less than 4% in each case. At the end of feeding, roots were given two 1-min washes in 1 mM CaSO_4 at 4°C before being harvested. At harvest, shoots and roots were sampled separately, weighed, dried, ground into a fine powder and kept in a vacuum with CaCl_2 until total nitrogen and isotopic analyses. For Experiment 3, the root system of harvested plants was separated into taproot and lateral roots.

d. Total nitrogen and isotopic analyses

Total nitrogen and ^{15}N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Twenty-twenty, PDZ Europa scientific Ltd., Crewe, UK) linked to a C/N analyzer (Roboprep CN, PDZ Europa scientific Ltd., Crewe, UK). Influx of NO_3^- was calculated from ^{15}N contents of roots and shoots.

e. Statistical analysis

All experiments were performed with three or six replicates. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm SE for $n=3$ or $n=6$.

2. Model description

A mechanistic single root model that explains nitrate uptake of plants mainly based on NO_3^- concentration around the root system was developed. The proposed thermal time step model simulates total NO_3^- uptake by rape crops from the root transport processes formalized by kinetic equations of the different NO_3^- transport systems involved in N uptake.

a. Kinetic equations of nitrate transport systems

Faure-Rabasse *et al.* (2002) have determined the kinetics of the constitutive and inducible components of HATS and HATS+LATS in fifteen-day-old seedlings of rape using ^{15}N labeling experiments. These authors demonstrated that influx rates approximated Michaelis-Menten kinetics below 200 μM (CHATS, IHATS) while at higher NO_3^- concentrations ($> 1 \text{ mM}$), influx rates of CHATS+CLATS and IHATS+ILATS exhibited non-saturable kinetics. Parameters for Michaelis-Menten ($I = I_m \times [\text{NO}_3^-] / ([\text{NO}_3^-] + K_m)$) for HATS components (constitutive and inducible) and linear equations ($I = a \times [\text{NO}_3^-] + b$) for HATS+LATS are described in Table III.I and constitute the basis of the model. Influx values of CLATS and ILATS were estimated in our model by subtracting the I_m value of CHATS and CHATS+CLATS influx and IHATS from IHATS+ILATS influx, respectively. It is noteworthy that LATS is considered to operate when soil NO_3^- concentration is above 900 μM and 1 mM for the CLATS and ILATS, respectively. At lower NO_3^- concentrations, LATS activities were integrated into the functioning of HATS because it is not physiologically possible to distinguish the HATS and LATS activities. Indeed, only the use of LATS mutants would allow quantification of the real contribution of LATS under 1mM of NO_3^- as previously reported (Wang *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999).

Table III. II. Adjusted equations describing variations of influx for HATS or HATS + LATS as a function of time within the light/darkness cycle, root temperature, developmental stage and PAR. Details of the developmental stages (C2, D2, E, G2 and G4) are found in Table 1. t: time of day; θ : root temperature ($^{\circ}\text{C}$); d: thermal time ($^{\circ}\text{Cday}$) after sowing; PAR: photosynthetically-active radiations ($\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

Table III. II. Equations utilisées pour décrire les variations de l'activité du HATS et du HATS+LATS au cours du cycle nyctéméral, du cycle ontogénétique, en fonction de la température racinaire et du PAR. Les dates d'apparition des différents stades de développement sont rappelées dans le tableau III.II.. t: heure du jour; θ : température racinaire ($^{\circ}\text{C}$); d: temps thermique ($^{\circ}\text{Cday}$) après le semis; PAR: rayonnement photosynthétiquement actif ($\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

Effects	Equations	
	HATS	HATS+LATS
Light/darkness cycle	$P_1(t) = -4.44 \cdot 10^{-5} \times t^6 + 0.00304 \times t^5 - 0.0758 \times t^4 + 0.799 \times t^3 - 3.1516 \times t^2 + 5.368 \times t + 53.4821$ $(r^2=0.97)$ $\int_0^{24} P_1(t) \cdot dt$ $= 1884 \mu\text{moles NO}_3^- \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ root DW}$	$P_2(t) = -2.5457 \cdot 10^{-6} \times t^9 + 0.00025 \times t^8 - 0.0108 \times t^7 + 0.2415 \times t^6 - 3.0836 \times t^5 + 22.5684 \times t^4 - 89.6049 \times t^3 + 168.3375 \times t^2 - 96.4182 \times t + 148.61$ $(r^2=1)$ $P_3(t) = 0.075 \times t^4 - 5.564 \times t^3 + 148.704 \times t^2 - 61695.417 \times t + 7168.233$ $(r^2=1)$ $\int_0^{12} P_2(t) \cdot dt + \int_{12}^{24} P_3(t) \cdot dt$ $= 4899 \mu\text{moles NO}_3^- \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ root DW}$
Temperature	$0.0081 \times \theta^4 - 0.4552 \times \theta^3 + 8.6933 \times \theta^2 - 60.0666 \times \theta + 150.98$ $(r^2=0.99)$	$0.0055 \times \theta^4 - 0.2625 \times \theta^3 + 3.7343 \times \theta^2 - 10.1052 \times \theta + 41.2233$ $(r^2=0.99)$
Ontogeny	<u>Sowing <d< E:</u> $-0.049 \times d + 127.434$ $(r^2=0.89)$ <u>E <d< F2:</u> $1.940 \times d - 1673.826$ $(r^2=1)$ <u>F2 <d< G4:</u> $-5.077400521223773 \times 10^{-7} \times t^3 + 2.911502508142226 \times 10^{-3} \times t^2 - 5.103545398986412 \times t + 2852.657341762818$ $(r^2=1)$	<u>Sowing <d< C2:</u> $154.4295429470372 \times d^{0.0647}$ $(r^2=0.89)$ <u>C2 <d< D2:</u> $6.233 \times d - 4703.688$ $(r^2=1)$ <u>D2 <d< E:</u> $6.614485723735082 \times 10^{-4} \times d + 365.7319512732885$ $(r^2=1)$ <u>E <d< G2:</u> $-1.788658200706148 \times d + 1978.497036513341$ $(r^2=0.99)$ <u>G2 <d< G4:</u> $-4.390933585646382 \times 10^{-4} \times d^2 + 1.226621449509313 \times d - 796.8996277255961$ $(r^2=1)$
<u>G4 <d:</u> N uptake is considered null for HATS and LATS		
PAR	From C2 to harvest: $1.0916666666666667 \cdot 10^{-8} \times \text{PAR}^4 - 7.1118518518518518 \cdot 10^{-5} \times \text{PAR}^3 - 8.090277777777776 \cdot 10^{-4} \times \text{PAR}^2 + 1.109485582010582 \times \text{PAR} + 5.01$ $(r^2=0.96)$	From C2 to harvest: $7.38^{-6} \times \text{PAR}^3 - 8.51 \cdot 10^{-3} \times \text{PAR}^2 + 2.96 \times \text{PAR} + 44.34$ $(r^2=0.92)$

b. Response curves of endogenous and environmental effects on HATS and HATS+LATS

The response curves of the effects of different factors such as the light/darkness cycle (16/8 h), ontogeny, application of low temperatures (from 24°C to 4°C) to the root system or variations of photosynthetically active radiation (from 0 to 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on HATS and HATS+LATS activities were obtained by measuring NO_3^- influx at 100 μM and 5 mM K^{15}NO_3 , respectively. This made it possible to calculate HATS (CHATS+IHATS) activities at the initial concentration (100 μM) and LATS (CLATS+ILATS) activities from the difference in uptake rates measured for the two substrate concentrations used. Variations of influx as a function of the studied factors were subsequently fitted with polynomial equations (Table III.II).

c. Introduction of auxiliary variables in the model

Environmental and endogenous factors, introduced into the model as auxiliary variables, allowed integration of regulations by N demand on NO_3^- uptake. Indeed, light/darkness cycle and ontogeny were chosen and incorporated into the model in order to take short- (light/darkness cycle) and long-term (ontogeny) regulations acting on N transport systems into account. Environmental variables such as temperature and radiation were introduced because of their well-known impact on growth and N uptake. Consequently, endogenous factors can be considered as "meta regulation mechanisms", influenced by climatic factors (PAR and temperature) permitting access to a higher level of nitrate uptake regulations by N demand.

In order to integrate the effects of these different factors on HATS and HATS+LATS activities, a standard influx value was determined for each studied factor: $\text{SI}_{\text{lightdarkness}}$, $\text{SI}_{\text{ontogeny}}$, $\text{SI}_{\text{temperature}}$, SI_{PAR} . These values were obtained in the following conditions : 12 a.m. for a light/darkness cycle of 16/8h, 20°C for root temperature, 300 $\mu\text{moles.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ for PAR and B4 stage for ontogeny (*i.e.* 4-leaf stage, source: CETIOM). These conditions were similar to those used by Faure-Rabasse *et al.* (2002) to determine nitrate influx kinetics. Because effects of these factors were measured in different experiments, SI values allowed us to adjust the fluctuations of measured influx between these experiments. Thus, a corrected influx (CI)

was determined for each factor studied by application of a correction factor defined as the ratio between the value of nitrate influx obtained by the adjusted polynomial equations and the Si value. For example, the averaged influx values per day (1884 and 4889 $\mu\text{moles NO}_3^- \text{ d}^{-1} \text{ g}^{-1}$ root DW for HATS and HATS+LATS, Table III.II) obtained by integrating equations $P_1(t)$ for HATS and $P_2(t)$ and $P_3(t)$ for LATS from 0 to 24 hours were divided by respective $SI_{\text{light/darkness}}$ values.

d. Calculation of unregulated and regulated uptake

An unregulated uptake (expressed in $\text{kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$) was calculated from kinetic equations by taking into account soil nitrate concentration and root biomass at different depths, plant densities during all the growth cycle and by operating a change of time scale (from hours to days) by multiplying by 24.

The regulated uptake in the model was determined by multiplying kinetic equations by correction factors. Integration of light/darkness and ontogenetic cycle factors allowed a change of time scale from hours to days and from days to growth cycle, respectively. The last auxiliary variables, temperature and PAR, were then integrated to simulate NO_3^- uptake in environmental field conditions. Changes in day length (minutes) during the year were also taken into account in the model with a day length reference value equal to 960 min.

e. Sources of input variables

Input variables (soil nitrate concentrations and root biomass at different soil depths, temperature and PAR) needed to run the model were obtained from the INRA oilseed rape database of experiments carried out at Grignon/Châlons/Laon/Reims (<http://www-bioclim.inra.grignon.fr>). Details about experiments can be found in Gosse *et al.* (1999).

The main difficulty encountered when running the model was to estimate the lateral root biomass, which was assumed to be the only part of the root system involved in N uptake, this assumption being based on the fact that NO_3^- uptake by the taproot was found to be insignificant (about 1%, unpublished results). Independently of the studied developmental stage, previous experiments carried out under controlled conditions have shown that lateral root biomass represents an approximately constant proportion of 43% of the total root

biomass (taproot + lateral root). This value was introduced as a parameter (p) in the model (Table III.I). To estimate lateral root biomass, a pattern of lateral root biomass distribution among soil layers was estimated from the frequencies of lateral root impact as a function of soil depth available in the database. Using this distribution and the total calculated lateral root biomass, lateral root biomass in each soil layer was assessed. N uptake (kg ha^{-1}) in each soil layer was obtained by multiplying the regulated uptake by the root biomass calculated in each soil layer.

Nitrate concentrations in the different soil layers were determined every 15 days using the Skalar method (Gosse *et al.*, 1999). Soil NO_3^- limitation was defined as the maximum soil nitrate stock available for N uptake. Thus, soil nitrate limitation was calculated every 15 days over the whole growth cycle from the database corresponding to soil NO_3^- concentration and soil water content in the different soil layers and N uptake by plants between two harvest dates. An interpolation was made between these two dates.

Finally, model output (*i.e.* predicted N uptake by the crop) is the sum of N uptake along the root profile. This model was tested to compare observed and predicted N uptake by rape with three levels of N fertilization (N0: 0 kg N ha^{-1} ; N1: 135 kg N ha^{-1} ; N2: 273 kg N ha^{-1}). The highest soil NO_3^- concentrations were found in the first soil layer. The variation scale in this soil layer ranged from 0.23 to 4.1, from 0.15 to 4.1, from 0.24 to 7.0 mM for N0, N1, N2 fertilisation, respectively. The model was built using Model Maker software (Cherwell Scientific).

f. Basic assumptions for model construction

Both NO_3^- and NH_4^+ can be used for N nutrition by many crop species. However, it has been reported that brassicaceae are characterized as NH_4^+ sensitive plants (see review by Britto and Kronzucker, 2002). Even if NH_4NO_3 is used to fertilize plots, ammonium in the soil is readily oxidized to NO_3^- by nitrifying bacteria present in the soil. NO_3^- is the prominent form of N available to most cultivated plants grown under normal field conditions. Moreover, availability of NO_3^- in the soil is often considered as rate limiting for plant growth (Redinbaugh and Campbell, 1991). For these reasons NO_3^- was assumed to be the sole N source used for N nutrition in our work. No NO_3^- efflux was considered under field conditions. Kinetic parameters (K_m and I_m for HATS), a and b for HATS+LATS were

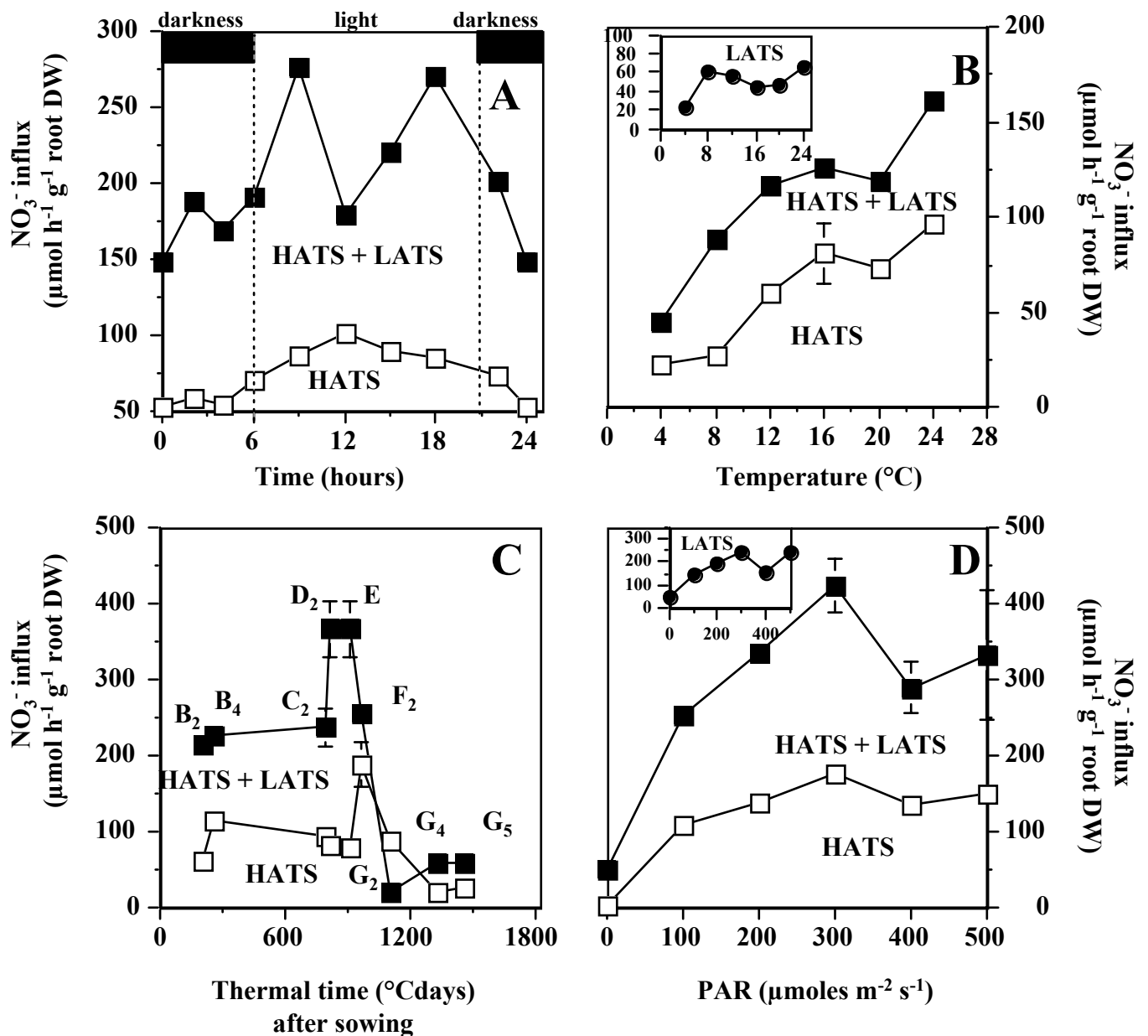


Figure III.1 : Variations of HATS (□) and both HATS and LATS (■) activities during the light/darkness cycle (A), as a function of root temperature (B), during a growth cycle (C) and as a function of PAR ($\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$) (D) in *Brassica napus* L. var. Capitol. Insets in Figure 1B and 1D represent the LATS activity, obtained by subtracting HATS activity from HATS+LATS activity. Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when greater than the symbol.

Figure III.1 : Variations de l'activité du HATS (□) et HATS + LATS (■) au cours du cycle nyctéméral (heures) (A), en fonction de la température de la solution nutritive ($^{\circ}\text{C}$) (B), au cours du cycle ontogénétique (C) et en fonction du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR; $\mu\text{moles s}^{-1} \text{m}^{-2}$), (D) chez *Brassica napus* L. var Capitol. Chaque encart dans les Figures III. 1B et II. 1D représente l'activité du LATS, obtenue en soustrayant l'activité du HATS à celle du HATS + LATS. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

assumed to remain constant during a growth cycle while NO_3^- transporters were assumed to have a homogenous spatial distribution along lateral roots. A minimum temperature of 4°C was assumed to be the lowest temperature at which growth may occur. Consequently, nitrate uptake by transport systems when temperature was below 4°C was considered as negligible.

It was hypothesized that the taproot/lateral root ratio assessed under controlled conditions was similar under field conditions and remained constant throughout growth cycle. No competition for water, light or mineral nutrient acquisition was considered between rape plants.

Concerning auxiliary variables, plants at the vegetative stage (B4) were used to study the effect of root temperature, light/darkness cycle and PAR on NO_3^- uptake. Effects of these factors were formalized by polynomial equations (Table III.II) and assumed to be the same for all developmental stages. Up and down regulations of nitrate transport systems that may occur at the plant level through the effects of different phloem or root compounds issued from nitrate assimilation or photosynthetic activity (amino-acids, organic acids, sugars) were implicitly included through the light/darkness cycle or through ontogeny. The two constitutive and inducible components of each transport system (High- or Low-Affinity) were assumed to be similarly regulated by these compounds. The effect of PAR was taken into account in the model from bolting to harvest according to Chapman *et al.* (1984) and Mendham *et al.* (1981) who have demonstrated a decrease of about 60-80% of PAR transmitted inside the rape canopy at the beginning of flowering. No interaction between climatic factors (temperature and PAR) was taken into account.

C. Results

1. Effect of environmental and endogenous factors on NO_3^- influx

a. *Effect of light/darkness cycle (Experiment 1)*

NO_3^- influx displayed a marked diurnal rhythmicity as shown by minimal and maximal values reported in Figure III.1A. From the start of the light period (6 a.m.), HATS activity increased about 1.5-fold to reach a maximum value (about $100 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ root DW) at 12 a.m. HATS influx then decreased progressively until the end of the light

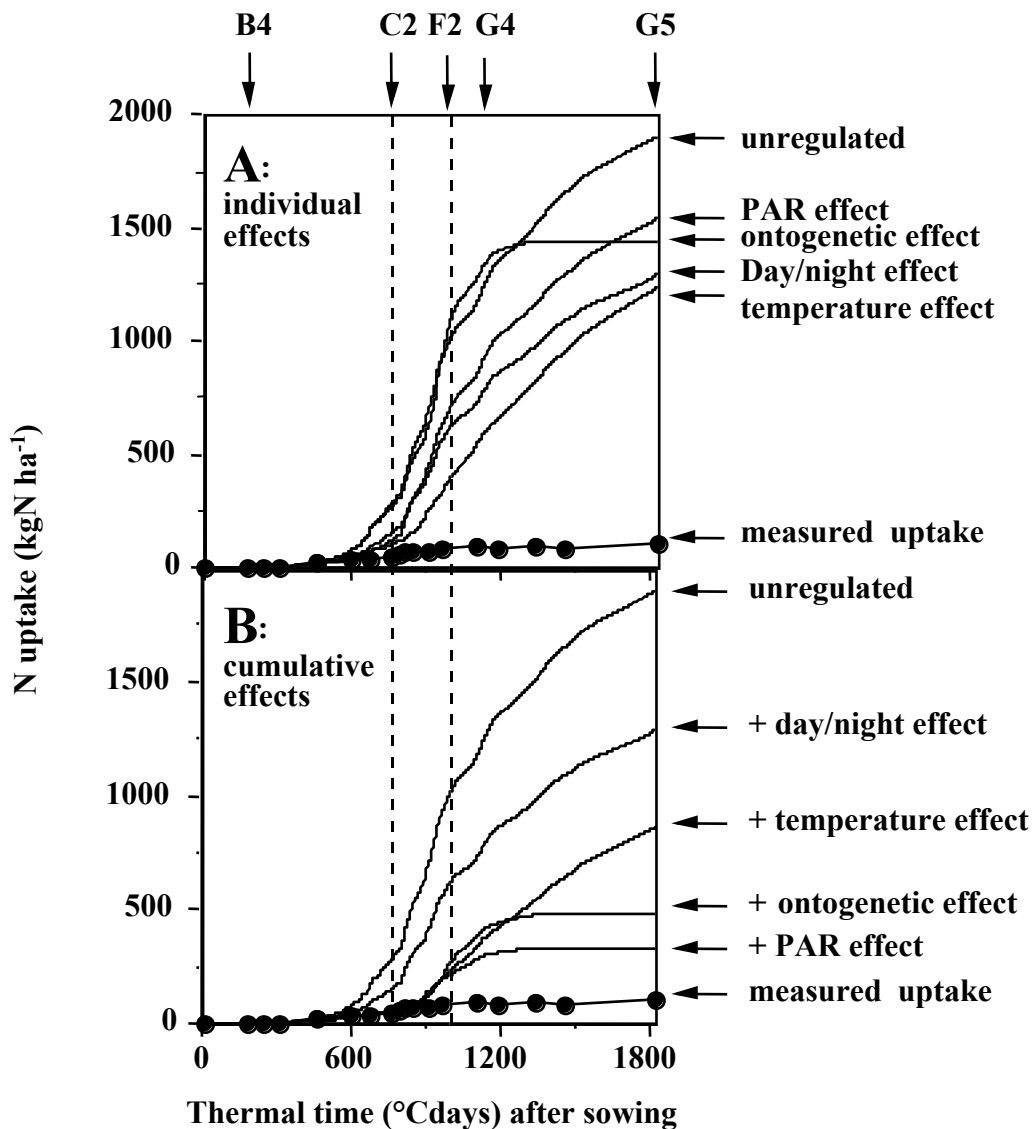


Figure III. 2 : Simulation of N uptake by an oilseed rape crop (*Brassica napus* L. var. Capitol) with no fertilizer when introducing the impact of the light/darkness cycle, root temperature, ontogeny and PAR effects on NO_3^- uptake during the growth cycle, either individually or cumulatively.

Figure III.2 : Simulation de la quantité d'azote nitrique ($\text{kgN} \cdot \text{ha}^{-1}$) prélevée par une culture de colza (*Brassica napus* L. var. Capitol) sur une parcelle non fertilisée (traitement N0) en ne tenant compte d'aucune regulation et en considérant de façon individuelle ou cumulée les effets du cycle nyctéméral, de la température racinaire, de l'ontogénèse et du PAR sur l'absorption.

period and attained a similar value to that observed at the start of the light period ($70 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$). During the dark period, HATS influx decreased to a nearly constant value of about $50 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$. The pattern of HATS+LATS influx exhibited two peaks (about $266 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$) at 9 a.m. and 6 p.m. The average influx by HATS+LATS was about $170 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$ during the dark period. It can be noted that HATS+LATS activity strongly decreased (-21%) during the light/darkness transition (from 6 p.m. to 9 p.m.) compared to HATS activity (-12%).

b. Effect of root temperature (Experiment 2)

The time course of the NO_3^- influx of HATS and HATS+LATS showed a similar pattern for the range of tested temperatures (from 4°C to 24°C ; Figure III.1B). However, LATS influx (obtained by subtracting HATS activity from HATS+LATS activity) was only slightly altered by low root temperature, except at 4°C (Inset in Figure III.1B). In addition, decreasing the root temperature from 24 to 4°C resulted in a strong reduction of HATS activity (from 100 to $25 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$).

c. Effect of ontogeny (Experiment 3)

The time course of the NO_3^- influx of HATS and HATS+LATS was followed for different developmental stages (Figure III.1C). NO_3^- influx of both transport systems was more or less unchanged from the two-leaf stage (B2) to the bolting stage (C2) (about 130 and $240 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$ for HATS and HATS+LATS, respectively). From the bolting stage (C2) to the initiation of bud development (E), HATS+LATS activity increased 1.4-fold while HATS activity remained constant (about $80 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$; Figure III.1C). A drastic increase of HATS influx was observed from the E stage ($81.27 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$) to the F2 (flowering) stage ($187.71 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$) whereas HATS + LATS influx dropped abruptly from 366 to $250 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$. Both HATS and HATS+LATS activity decreased thereafter to reach a minimal value ($30 \mu\text{moles NO}_3^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ root DW}$).

d. Effect of photosynthetically-active radiation (Experiment 4)

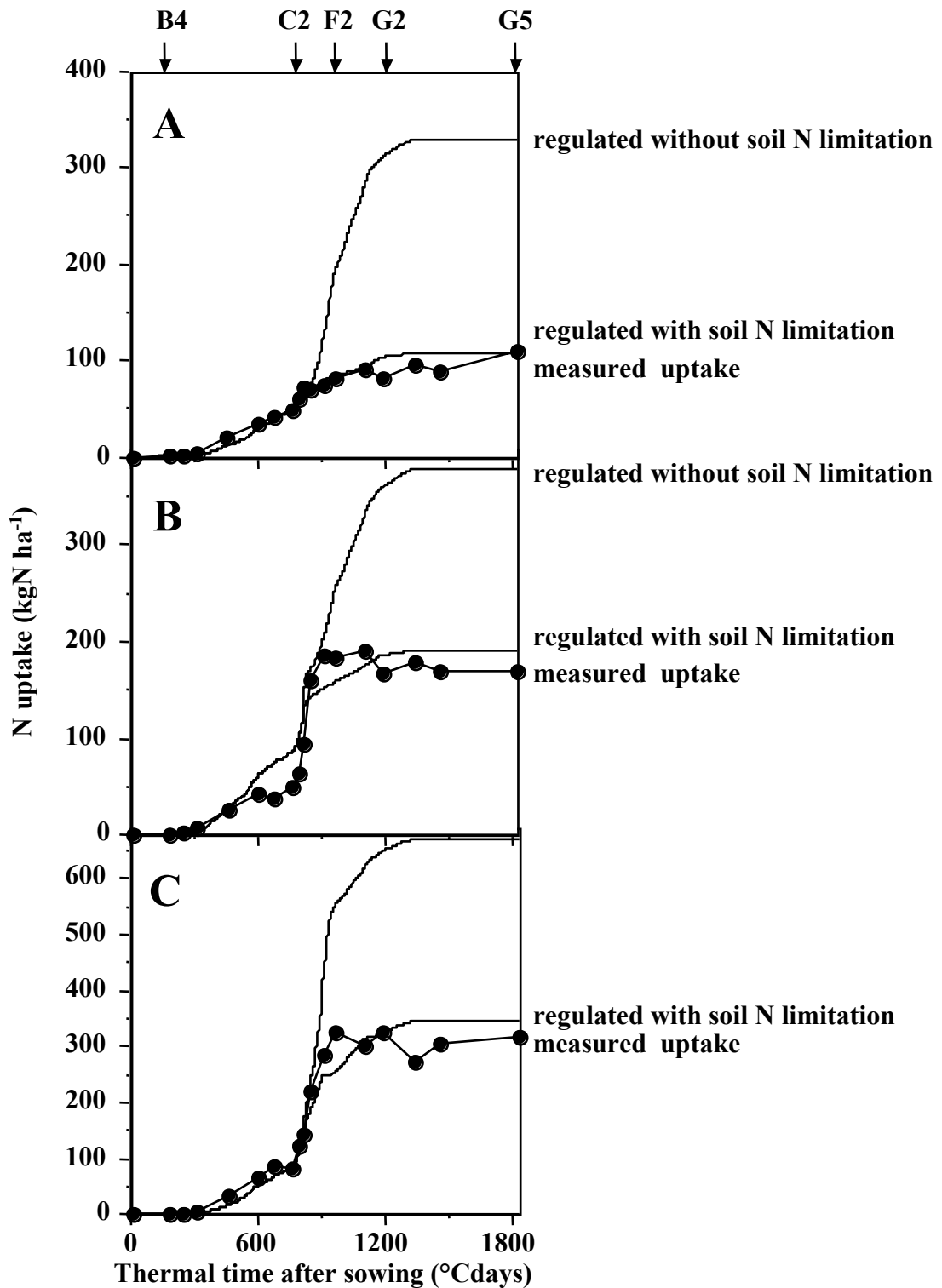


Figure III.3 : Simulation of N uptake by an oilseed rape crop (*Brassica napus* L. var. Capitol) with or without the N soil limitation during a growth cycle as a function of three N fertilizer levels [A: 0 kg N ha⁻¹ (treatment N0); B: 135 kg N ha⁻¹ (treatment N1); C: 273 kg N ha⁻¹ (treatment N2)].

Figure III.3 : Comparaison entre la quantité d'azote nitrique absorbée simulée en prenant en compte ou pas la limite d'offre en azote minéral par le sol (kgN. ha⁻¹) et la quantité d'azote total prélevée par une culture de colza (*Brassica napus* L. var. Capitol) en fonction des niveaux de fertilisation appliquées [A: 0 kg N ha⁻¹ (treatment N0); B: 135 kg N ha⁻¹ (treatment N1); C: 273 kg N ha⁻¹ (treatment N2)].

Changes of HATS and HATS+LATS activities were determined in young plants as a function of PAR values ranging from 0 to 500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figure III.1D). Both HATS and HATS+LATS activities increased with PAR up to 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (from 3.7 to 177 $\mu\text{moles NO}_3^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ root DW and from 50 to 450 $\mu\text{moles NO}_3^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ root DW for HATS and HATS+LATS, respectively). LATS activity followed the same pattern with a saturation point (250 $\mu\text{moles NO}_3^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ root DW) at 300 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2. Modeling N uptake during the growth cycle

a. *Individual effects*

When total N uptake was only controlled by soil NO_3^- concentrations (*i.e.* unregulated uptake), model outputs were largely overestimated (17 times higher), compared with the measured data (Figure III.2A). Individual introduction of the effect of the environmental and endogenous factors made it possible to quantify the weight of each of them on NO_3^- uptake. When no fertilization was applied (N0 treatment), temperature, day/night cycle and PAR factors decreased the amount of the predicted total N uptake during the plant growth cycle by 36, 32 and 19%, respectively (Figure III.2A). The effects of these three auxiliary variables were more pronounced during the autumn and winter seasons (from sowing to the C2 stage). Moreover, it was observed that the temperature factor decreased the simulated N uptake (-80%) more than the PAR and light/darkness cycle (-50%) during this period. An ontogenetic effect was only observed at the end of the growth cycle (-24%; Figure III.2A) when plants were at the grain filling stage (G2 to G5). Effects of all of these factors on simulated N uptake were not modified by N fertilizer treatments (data not shown).

b. *Cumulative effect and the effect of N fertilization levels on NO_3^- uptake*

Both light/darkness and temperature effects were responsible for 66% of the overall decrease, emphasizing the major role played by these variables on NO_3^- uptake by plants when no fertilizer (N0 treatment) was applied (Figure III.2B). Integration of the four factors in the model reduced the estimation of the total N uptake by rape crop by a factor of 5.8 compared with unregulated uptake (Figure III.2B). Comparison of the amounts of the

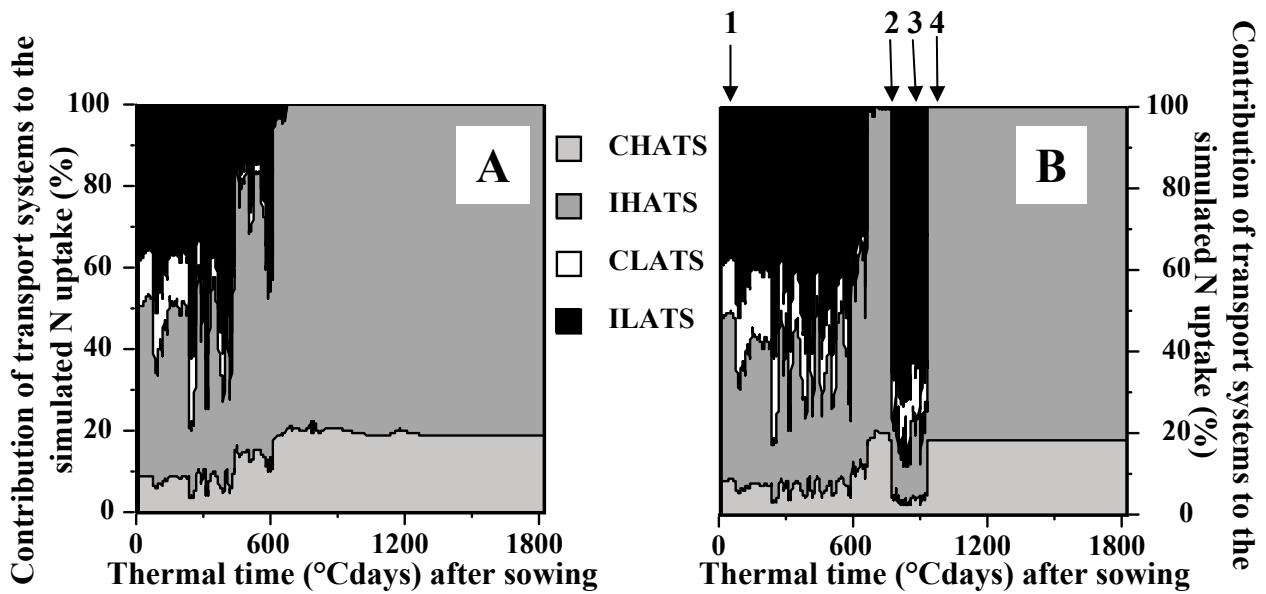


Figure III.4 : Contribution of the constitutive (C) and inducible (I) components of HATS and LATS to the simulated N uptake by *Brassica napus* L. var. Capitol during the growth cycle as a function of two N fertilization levels (A: 0 kg N ha⁻¹; B: 273 kg N ha⁻¹). 1, 2, 3 and 4 indicate the times of N fertilization application for N2 treatment (1: 49 kg N ha⁻¹; 2: 78 kg N ha⁻¹; 3: 107 kg N ha⁻¹; 4: 39 kg N ha⁻¹).

Figure III.4 : Contribution (%) des composantes constitutives (C) et inductibles (I) des systèmes de transport HATS et LATS au prélèvement d'azote nitrique simulé par une culture de colza (*Brassica napus* L. var. Capitol) en fonction des deux niveaux de fertilisation appliquées (A: 0 kg N ha⁻¹; B: 273 kg N ha⁻¹). 1, 2, 3 et 4 correspondent aux dates d'application des intrants azotes pour le traitement N2 (1: 49 kg N ha⁻¹; 2: 78 kg N ha⁻¹; 3: 107 kg N ha⁻¹; 4: 39 kg N ha⁻¹).

Table III.III. Simulation of total N uptake during the growth cycle of rape by each of the four transporters (CHATS, IHATS, CLATS, ILATS) and their activity time for an unfertilized rape culture (N0) or one receiving 273 kg N ha⁻¹ (N2).

Table III.III. Quantité d'azote nitrique absorbé (kgN. ha⁻¹) par chacune des composantes des systèmes de transport (IHATS, CHATS, ILATS, CLATS) et leur durée d'intervention (°Cdays) en fonction du niveau de fertilisation en azote (N0 : 0 kg N.ha⁻¹; N2 : 270 kg N.ha⁻¹) au cours d'un cycle de culture chez *Brassica napus* L..

	N exported (kg N ha ⁻¹)		Duration (°Cdays)	
	N0	N2	N0	N2
IHATS	75	147	1254	1254
CHATS	19	32	1254	1254
ILATS	10	138	663	863
CLATS	2	28	663	863
Total	106	345	-	-

measured and the predicted N uptake at harvest shows that the simulated N uptake, defined as the regulated uptake without soil N limitation, was still three times higher than the observed regulated uptake with soil nitrate availability (Figure III.2B). When the model was run with inputs from N1 and N2 treatments, outputs showed that the model was responsive to the N application compared to the N0 treatment (Figure III.3). The simulated total N uptake increased by 6% and 21% for N1 and N2 treatments, respectively, when total N uptake was only controlled by soil NO_3^- concentrations (data not shown). Integration of the four factors decreased the amount of simulated total N uptake by about a factor of 5.5 for N0 and N1 treatments and 3.5 for the N2 treatment (Figure III.3). However, an overestimation of the modeled N uptake after the flowering stage was observed for all N treatments. When soil N supply was limited by the soil N available for N uptake, the model more accurately matched the measured data for N0, N1 and N2 (comparison of regulated uptake with and without soil N limitation; Figure III.3). Indeed, in spite of the high potential activity of the N transport system described in the model (*i.e.* regulated uptake without soil N limitation), soil N supply from the start of the flowering (F2) to the pod filling (G2) stage was not sufficient to meet the N requirement of the plant.

c. Simulation of the relative contribution of each transport system to total N uptake

The realistic modeling of N uptake based on a mechanistic description of root N uptake, regulated by internal and environmental factors, provided a useful means to estimate the putative contribution of each NO_3^- uptake system to total N nutrition of the plants grown under field conditions (Figure III.4). For the N0 treatment, model outputs showed that the inducible and the constitutive components of HATS were predominantly involved in N uptake (71 and 18% of the simulated total N uptake by IHATS and CHATS, respectively; Figure III.4A). Given that LATS is only operative at nitrate concentrations above 1 mM, which are rarely found in cultivated soil, its contribution to N acquisition by plants was small (about 11%) throughout the growth cycle (Figure III.4A). However, its contribution represented approximately 50% over the first 300 °Cdays after sowing and probably resulted from the increase of NO_3^- concentrations linked to the mineralization process of organic matter in autumn and to the fact that this uptake system is less sensitive to low temperatures relative to HATS (Figure III.1B). Despite the fact that the simulated N taken up by HATS was increased by a high fertilization level (N2), the contributions of IHATS and CHATS were decreased by about 29 and 9%, respectively. On the contrary, high fertilization induced an increase of NO_3^-

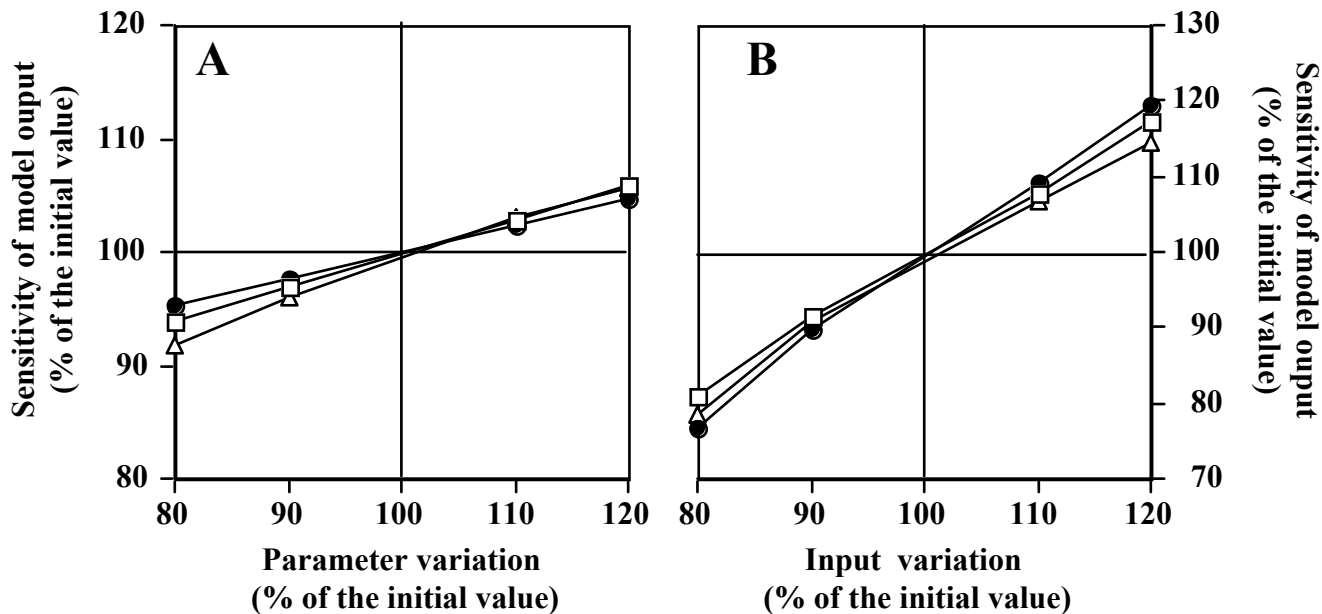


Figure III.5 : Sensitivity analysis of the simulated N uptake by *Brassica napus* L. var. Capitol with a +/- 20% variation of the Im IHATS (A) and the root temperature (B) as a function of three N fertilization levels [□: 0 kg N ha⁻¹ (treatment N0); ●: 135 kg N ha⁻¹ (treatment N1); △: 273 kg N ha⁻¹ (treatment N2)].

Figure III.5 : Analyse de sensibilité de la quantité d'azote nitrique absorbé simulée par une variation de +/- 20% de la valeur du paramètre Im IHATS (A) et de la variable d'entrée température racinaire (B) en fonction de trois niveaux de fertilisation [□: 0 kg N ha⁻¹ (treatment N0); ●: 135 kg N ha⁻¹ (treatment N1); △: 273 kg N ha⁻¹ (treatment N2)].

uptake by LATS from 12 to 166 kg Nha⁻¹ (Table III.III). This increase is a consequence of the extended length of time (from 663 to 863 °Cdays; Table III.III) of LATS activity and a higher contribution (Figure 4B) of the LATS components in N uptake.

d. Sensitivity analysis

A sensitivity analysis was performed to quantify the impact of plant parameters and input variables on N uptake (Figure III.5). Simulations of NO₃⁻ influx were conducted by varying the measured value of each parameter between -20% to +20%. For each test, only the value of the studied parameter was modified whereas the remaining parameters and input variables were maintained at their initial values. Among all the tested parameters, sensitivity analysis results showed that model outputs were only sensitive to variations of the Im of IHATS (Figure III.5A). There was no difference between the N fertilization treatments. Variations of the Im of CHATS, Km of IHATS or CHATS and the slope (a) of ILATS had no significant effect on the simulated N uptake (data not shown). Concerning environmental factors, N uptake was strongly reduced (about -20%) by a 20% decrease in the temperature variable during the growth cycle, regardless of the N fertilization level (Figure III.5B). Otherwise, varying root biomass involved in N uptake (p) by 20% leads to a variation of N uptake of about 12%.

D. Discussion

The aim of these experiments was to build a mechanistic N uptake model based only on the functioning (kinetic equations) and the regulation of nitrate transport systems (HATS, LATS). In contrast to other N uptake models (Brisson *et al.*, 1998), N demand in our model was not estimated by a N dilution curve, but by the effects of endogenous and exogenous factors on NO₃⁻ uptake.

1. Effect of endogenous and environmental factors on NO₃⁻ influx

Our results have shown that NO₃⁻ influx of HATS and HATS+LATS decreased by approximately 1.5-fold between the light and dark periods (Figure III.1A). These results are in agreement with those of Dehlon *et al.* (1995) who reported a 45-50% decrease of NO₃⁻ influx

at the end of the dark period relative to the NO_3^- influx measured during the light period in the soybean (*Glycine max* L.). Moreover, our results demonstrated that HATS activity reached a plateau (Figure 1D) when the net assimilation of CO_2 was at a maximum (data not shown). This result suggests that HATS and HATS+LATS influx could be regulated by the current photosynthetic activity and supports the hypothesis that the effect of light on NO_3^- influx is mediated by the availability of photosynthetates in roots. In *Glycine max* L., NO_3^- influx decreased sharply (-75%) in response to a reduction in the ambient CO_2 concentration, the shading of shoots (-45%) and by the girdling of the stem (inhibiting the phloemic flux from the shoot to the root, -85%). Conversely, the supply of sucrose in the nutrient solution during these treatments prevented these decreases (Dehlon *et al.*, 1996). This regulation may act, at least partly, at the molecular level. Indeed, it has also been demonstrated that genes (*AtNRT1.1* and *AtNRT2.1*) encoding nitrate transporters (HATS, LATS) in *Arabidopsis thaliana* L. were positively regulated by sucrose supply (Lam *et al.*, 1996) and light (Lejay *et al.*, 1999). Moreover, Lejay *et al.* (1999) and Matt *et al.* (2001) suggested that diurnal decrease of *NRT2* expression could result from changes in the root carbohydrate content in *Nicotiana tabacum* L. and in *Arabidopsis thaliana* L..

NO_3^- influx during the growth cycle showed an increase of N uptake from the bolting (C2) to the flowering (F2) stage since HATS+LATS is mainly involved until bud development (E) and HATS from the E to the F2 stage (Figure III.1C). This strong increase of N uptake can be related to an increase in N demand due to the growth of the stem and the leaves during the bolting period. A similar up-regulation of total N uptake preceding the development of reproductive tissues was previously described in *Hordeum vulgare* (Mattson *et al.*, 1992) and *Arabidopsis thaliana* (Nazon *et al.*, 2003). The transition between the vegetative and the reproductive phase is characterized by a drastic decrease of HATS and HATS+LATS activities. Rossato *et al.* (2001) have already shown using ^{15}N labeling in *Brassica napus* L. grown under controlled conditions that there was an inhibition of N uptake at flowering and that the seed filling was mainly achieved by remobilization of N from the leaves and the stem. Our results were in agreement with these conclusions and demonstrated that the near-cessation of N uptake is due to a drastic reduction of HATS and HATS+LATS activities in *Brassica napus* L. Consequently, the drop in the N uptake at flowering could not be only explained by a water stress as proposed by Merrien *et al.* (1988). This decrease of HATS and HATS+LATS activities could result from a modification in the allocation of N and C allocation from shoot to root. For example, carbon partitioned between vegetative organs during the vegetative period, was preferentially allocated to the newly appearing sink tissues

during the reproductive period it as has already been reported by many authors (Quill  r   and Triboï-Blondel, 1988; Rode, 1988). Naoza *et al.* (2003) have also reported that *AtNRT2.1* was developmentally controlled and was down regulated from flowering to pods bearing plants.

Cooper and Clarkson (1989) also suggested that cycling of the free amino acid pool between the shoot and the root could regulate NO_3^- uptake. Increased cycling of the free amino acid pool resulting from an increase of the proteolysis in senescing foliar tissues, especially at flowering, could repress HATS and LATS activities. It is well known that NO_3^- uptake is feedback-regulated by free amino acid compounds in many species at physiological and molecular levels (Forde and Clarkson, 1999, Zhuo *et al.*, 1999). For example, Vidmar *et al.* (2000) demonstrated that treatment of root tissue with an inhibitor of glutamate synthase led to an increase of root glutamine concentration and a concomitant decrease of the *HvNRT2* transcript level of 97% in *Hordeum vulgare*.

In rape grown under field conditions PAR transmitted through the canopy to 50 cm above ground level (approximate base of inflorescence) was reduced by 76, 93, and 94 % at early flowering, late flowering and pod filling stages, respectively (Chapman *et al.*, 1984). Mendham *et al.* (1981) have also reported similar results. These results were confirmed using an apetalous flower line (Rao *et al.*, 1991). This line allowed 30% more short wave radiation to reach the base of the inflorescence, leaves at this level having a longer life-span. Therefore, it was assumed that the lack of light was probably an important cause of initiation of senescence of lower leaves (Chapman *et al.*, 1984; Daniels *et al.*, 1986). Moreover, Rossato *et al.* (2002) suggested that decrease of N uptake could be a result of Methyl Jasmonate (a phytohormone) production in senescing tissues during flowering. Thus, a foliar application of Methyl Jasmonate during the vegetative period induced leaf senescence and was associated with a drastic decrease of NO_3^- uptake. NO_3^- uptake may also be inhibited by an external supply of Methyl Jasmonate to roots. From these combined results, it can be hypothesized that NO_3^- uptake by ontogenetic and PAR effects takes indirectly into account the relationships between N assimilation and C fixation during the growth cycle. However, the nature of the signal molecules (carbohydrates, amino acid compounds, phytohormones) that controll NO_3^- uptake remains to be elucidated, a task which will require the application of physiological and molecular approaches around the flowering period.

To study the effect of root temperature on NO_3^- influx, measurements of NO_3^- influx were conducted after a 1.5 h period of acclimation of the root system to the tested temperatures. Consequently, it can be suggested that the modification of NO_3^- influx by HATS and HATS+LATS was only due to a change in the activity of NO_3^- transport systems. A consistent

decrease of HATS activity was observed when root temperature decreased (from 24 to 4 °C; Figure III.1B). These results are in agreement with previous studies on *Brassica napus* L. (MacDuff *et al.*, 1987; Lainé *et al.*, 1993). For example, Lainé *et al.* (1993) reported that cooling the roots from 25°C to 9°C for five days, with shoot temperature maintained at 25°C, resulted in a 62% decrease of maximum net nitrate uptake while the Michaelis-Menten constant (K_m) was unaltered. The response of HATS to the application of low root temperatures may be explained by the putative enzymatic nature of the HATS which suggests a subsequent ATP driven mechanism as proposed by Rao and Rains (1976) and Glass *et al.* (1992). LATS is less sensitive to a decrease of root temperature suggesting that it might be an ionic canal through which NO_3^- enters showing a low sensitivity to cold temperatures and to metabolic inhibitors (Glass *et al.*, 1990).

2. Modeling of N uptake by an oilseed rape crop

The model satisfactorily simulates the N uptake by an oilseed rape crop, regardless of the N fertilizer application. Our original mechanistic approach was based on the functioning of NO_3^- transport systems (kinetic equations) regulated by soil nitrate concentrations, auxiliary variables defined as endogenous and exogenous factors (light/darkness and ontogenetic cycles, temperature and PAR) and also soil NO_3^- limitation. The physiological description of effects of these factors on NO_3^- influx has been taken into account in the model by using response curves. With this approach, we can predict NO_3^- influx variations induced by endogenous factors under given environmental conditions. For example, from a physiological point of view, description of influx response curves during light/darkness and ontogenetic cycles of the NO_3^- transport systems (HATS, HATS+LATS) takes into account their internal regulations, regardless of their complexity and the putative signals involved (amino acids, organic acids, sugars; see review by Forde, 2002). It follows that both conditions are relevant in order to focus on some specific up and down regulations. From the modeling point of view, integration of light/darkness and ontogenetic response curves permits alteration of the time scale from hours to a growth cycle. This change of time scale was essential to determine NO_3^- uptake at the crop level. The effects of environmental factors (temperature and PAR) were then integrated by a multiplying approach to simulate NO_3^- uptake variations induced by climatic conditions in the field. However, it must be stressed that this integrated approach might lead to an overestimation of the effects of endogenous and exogenous factors on NO_3^- uptake during the growth cycle. This approach was adopted due to difficulties in determining

experimentally the interactions and combined effects of these factors on HATS and LATS activities.

The simulation of NO_3^- uptake by the model showed that predicted exported N is slightly underestimated from the sowing to the bolting stage (C2) for N0 ($0 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$) and N2 ($273 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$) fertilization during the autumn-winter period (Figure III.3A, B). This underestimation related to the assumption that influx rates of HATS and LATS were null when root temperature was under 4°C . In the same period, an overestimation of simulated N uptake was observed after an application of $135 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ (N1 treatment; Figure III.3B). This could result from the fact that the model was running with root biomass data of the N2 treatment since no data on root length density corresponding to the N1 treatment was available in the oilseed database. From bolting (C2) to flowering (F2), the pattern of N exported was correctly simulated and increased with the increasing N fertilization levels (Figure III.3). This result could be explained by the model responses to N fertilization levels mainly due to increase of the LATS activity and its duration of functioning (Figure III.4). At the beginning of flowering, simulated exported N estimated after the introduction of auxiliary variables (N uptake regulated by N demand) markedly increased when soil NO_3^- limitation was not considered (Figure III.3). The regulation of N demand by soil NO_3^- stock (see below Materials and Methods) allowed satisfactory simulation of N exportation by a rape crop during this period. From flowering to the harvest, simulated N uptake was over-predicted. On the one hand, the difference between simulated and observed data could be linked to a significant fall of seeds to the soil at the end of the growth cycle, which led to an underestimation of the observed N exported by the crop. It is well known that pod opening at seed maturity is sensitive to mechanical actions (wind or agricultural apparatus used for the harvest, for example). On the other hand, the difficulty of precisely determining the date of flowering could also lead to an overestimation of N exported. A delay of one month was often observed under field conditions between the beginning and the full flowering.

Model outputs showed that HATS was dominating N uptake over the whole growth cycle, even if its participation decreased with the increase of N fertilization level (Figure III.4). When soil NO_3^- limitation was not taken into account, the final amount of potential simulated N uptake by the HATS was not modified by the N fertilization level (data not shown). Indeed, soil nitrate concentrations were always above $100 \mu\text{M}$ which implies that HATS operates always at its maximum influx (I_m) over the whole growth cycle. Consequently, with or without N fertilization, corrected influx of HATS (see Materials and Methods) already operates at its maximum required influx to satisfy the N demand at a given developmental

stage under particular environmental conditions. This conclusion is in close agreement with results from the lettuce nitrate uptake model of Steingrobe and Schenk (1997). Moreover, it has been shown that N uptake by HATS was limited by the soil N supply when soil N limitation was included (Figure III.4). Conversely, the part of N uptake by LATS during the growth cycle is small (Table III.III). However, its contribution is strongly increased by N fertilization. The low activity of LATS can be explained by a soil NO_3^- concentration often under the threshold of the NO_3^- concentration of LATS activity (1mM). Indeed, this value is attained either at the beginning of the growth cycle (mineralization peak) or when N fertilizer is applied. Thus, the low amount of N uptake by LATS is a consequence of a restricted period of activity. Model outputs showed that the model was responsive to N fertilization mainly *via* an increase in the contribution of LATS.

As the model was moderately sensitive to variations in root biomass, potential errors due to our method of root biomass approximation are negligible. It also shows that an under- or over-estimation (+/- 20%) of root biomass would have a limited impact on the simulated N uptake. Consequently, it can be hypothesized that simulation of N uptake was mainly controlled by the studied factors and that they represent “meta mechanisms” of nitrate uptake regulations. Indeed, sensitivity analysis shows that the model was responsive to a variation of I_m IHATS and environmental variables such as temperature. Nevertheless, it should be noted that each factor was studied individually and integrated in a cumulative way into the model. As a result, further experiments should be undertaken to simultaneously study interactions between endogenous and environmental factors on NO_3^- uptake in order to avoid pitfalls due to this mode of calculation. Furthermore, NH_4^+ uptake must be considered in order to improve the model. Indeed, NH_4^+ is the most abundant form of available N in waterlogged and acid soils or during cold periods, conditions under which nitrification is restricted. The uptake of both forms, NH_4^+ and NO_3^- , can be affected by internal plant factors such as nitrogen or carbohydrate status and by external factors such as temperature, O_2 level and rhizosphere pH. Developmental stage can also influence N uptake. Moreover, concentrations of NH_4^+ and NO_3^- in soil do not reflect the uptake ratio. Many studies have shown that the presence of NH_4^+ in the nutrient solution down regulates NO_3^- uptake (Clarkson *et al.*, 1986; Macduff *et al.*, 1987; Macduff and Jackson, 1991). Consequently, interaction between NH_4^+ and NO_3^- uptake should also be taken into account in our model.

The model has been tested with a new set of data from another experiment conducted in field conditions under high N fertilization (225 Kg N ha⁻¹). The results presented in figure

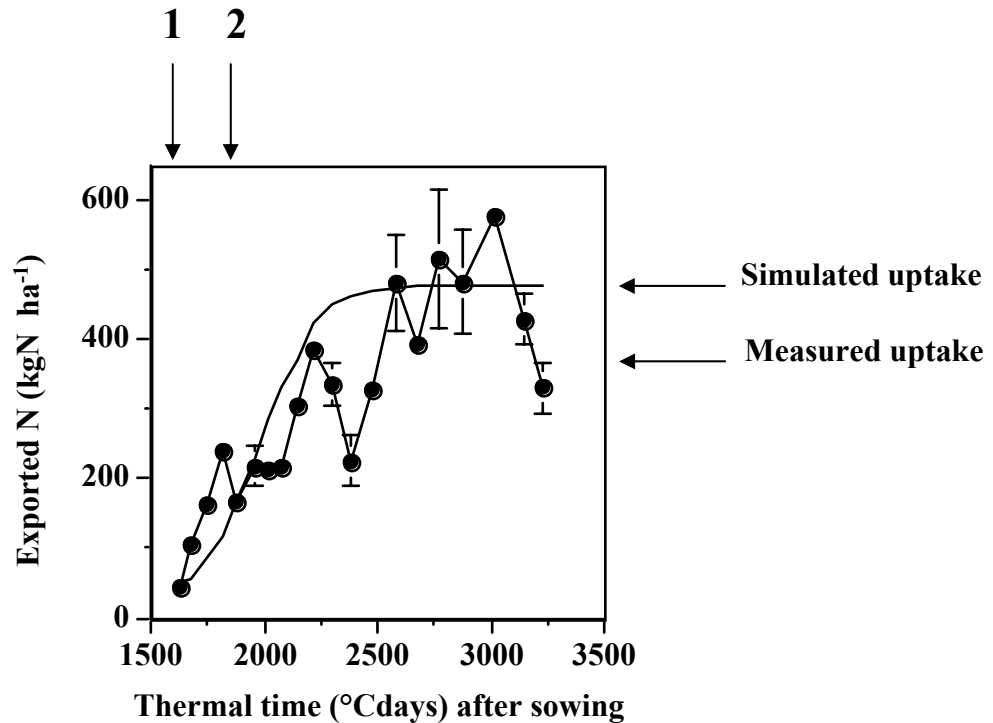


Figure III.6 : Simulation of N uptake by an oilseed rape crop (*Brassica napus* L. var Capitol) from bolting to harvest with a different data set collected from an experiment conducted under field conditions. Oilseed rape was sown on a clayey loamy soil in autumn at Hérouvillette (49°10' north, 00°27' west), France. N fertilizer was applied at the start of the bolting stage and during the stem elongation. 1 and 2 indicate the times of N fertilization application (1; 75 kg N ha⁻¹; 2; 150 kg N ha⁻¹).

Figure III.6 : Simulation de la quantité d'azote nitrique (kgN. ha⁻¹) prélevée par une culture de colza (*Brassica napus* L. var. Capitol) de la reprise de végétation au stade maturité des graines avec un jeu de données provenant d'une expérimentation conduite en conditions de plein champ. Le colza d'hiver a été semé en automne sur un sol argilo-calcaire à Hérouvillette (49°10' nord, 00°27' ouest), France. Les doses d'intrants azotés ont été apportées à la reprise de végétation et pendant l'élongation de la hampe. 1 et 2 indiquent les dates des apports (1; 75 kg N ha⁻¹; 2; 150 kg N ha⁻¹).

III.6 show that these experimental data fitted well with the exported N simulated by our model.

In conclusion, the satisfactory predicted values for all N fertilization treatments in the model indicates that this mechanistic approach is a powerful tool for modeling NO_3^- over the whole growth cycle. The mechanistic concepts of this model allow prediction of the nitrogen requirements of crops and provide a context within which the different scales and approaches of plant physiologists and agronomists can be reconciled. The present model of N uptake will be extended in the future to other plant species and will allow to predict the best period where N fertilizer should be applied in order to improve yield production. On another hand, the availability of transporter gene NRT mutants of HATS and LATS in *Arabidopsis* will allow the study and validation of hypotheses used to built this model. Furthermore, this model will be useful as a component of a mechanistic description of N allocation within plant tissues with emphasis on the origin of N used for pod filling (from current uptake or derived from N recycled from senescing leaves).

CHAPITRE IV. DYNAMICS OF NITROGEN UPTAKE AND
MOBILIZATION IN FIELD-GROWN WINTER OILSEED RAPE
FROM BOLTING TO HARVEST I. GLOBAL N FLUXES
BETWEEN VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE TISSUES IN
RELATION WITH LEAF FALL AND THEIR RESIDUAL N

IV. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest I. Global N fluxes between vegetative and reproductive tissues in relation with leaf fall and their residual N

Running title: N dynamics in winter oilseed rape

P. MALAGOLI, P. LAINE, L. ROSSATO & A. OURRY

Soumis à Annals of Botany.

UMR INRA-UCBN 950 EVA, Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S. Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse Normandie, 14032 Caen Cedex, France

Abstract

Despite its high capacity to take up nitrate from the soil, the winter oilseed rape crop (*Brassica napus* L.) is characterized by a very low N recovery in reproductive tissues under field conditions. A significant part of the N taken up by plants is released to the soil by dead leaves during the growth cycle. For a better understanding of factors that may affect the nitrogen harvest index in *Brassica napus* L., an experiment was conducted in field conditions to follow N uptake, partitioning and mobilization using sequential weekly ¹⁵N labelling. Data obtained will form the basis of a model of N allocation within the plant during the growth cycle. Nitrogen labelling (2.5 kg N.ha⁻¹; 10 % excess) was performed each week (from bolting to harvest) to discriminate between uptake of new N (labelled) and N mobilized (unlabelled) in the different plant components.

In our conditions, N requirements for seed filling were mainly satisfied by N mobilized from vegetative parts (about 73 % of total N in pods). The determination of

endogenous N flux showed that N in pods was derived from leaves (36%), stem (34%), inflorescences (22%) and taproot (8%). More precisely, the study of N flux in the different leaf ranks enabled the identification of two main groups of leaves as a function of their apparent N mobilization capacity: 30-60 % and 70-80 % of maximal N content falling during flowering and during pod filling, respectively. Moreover, the latter group was found to be the main endogenous N source within the leaf compartment. The mobilisation of endogenous N from these leaf ranks resulted from a long mobilization duration, which was concomitant with N accumulation in pods. Results also revealed a complex mobilization pattern of N from leaves which can be allocated either to vegetative or reproductive tissues. The results will be used to model N partitioning during the growth cycle.

Key-words: *Brassica napus* L.; leaf rank; N labelling; uptake; partitioning

Résumé

Malgré sa forte capacité d'absorption du nitrate, le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) se caractérise par un faible recouvrement de l'azote absorbé au niveau des organes reproducteurs à la récolte en conditions de plein champ. En effet, une quantité importante de l'azote absorbé est restituée au sol *via* la chute des feuilles mortes au cours du cycle de culture. Afin d'identifier les facteurs qui affectent potentiellement l'indice de récolte azoté chez *Brassica napus* L., une expérimentation, conduite en conditions de plein champ, a permis, tout d'abord, de suivre la dynamique de l'azote au sein du végétal et, ensuite, de poser les bases d'un modèle de répartition de l'azote. L'application du marqueur ^{15}N (2,5 kg.ha⁻¹; excès isotopique à 10 %) a permis de différencier les flux d'azote issu de l'absorption (azote marqué) et de la remobilisation (azote non marqué) entre les différents compartiments de la plante de la reprise de végétation (stade C1) à la récolte (stade G5). Dans nos conditions, l'azote issu de la remobilisation à partir des organes végétatifs représente la principale source pour le remplissage en azote des siliques (73 % de l'azote total dans les siliques à la récolte). Le suivi des flux d'azote non marqué (*i.e.* endogène) a montré que les feuilles, la hampe, les inflorescences et le pivot contribuent respectivement pour 36, 34, 22 et 8 % à la quantité d'azote endogène remobilisé au profit des siliques. L'étude précise de la dynamique de l'azote entre les rangs de feuilles a permis de distinguer deux groupes de feuilles en fonction de leur capacité de remobilisation apparente: 30-60 % et 70-80 % de la quantité maximale en azote total. Le deuxième groupe de feuilles participe majoritairement à fourniture en azote

endogène au sein du compartiment foliaire. Nos résultats ont mis en évidence une dynamique complexe de la remobilisation de l'azote à partir des feuilles qui peut être alloué vers des tissus végétatifs ou reproducteurs. L'ensemble de ces données sera utilisé pour construire un modèle de répartition de l'azote du stade "rosette" (C1) au stade "maturité des graines" (G5).

Mots-clés : *Brassica napus* L.; rangs de feuilles; marquage avec l'isotope ^{15}N ; absorption; répartition

A. Introduction

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an important agricultural crop cultivated for its oil which can be used as an edible product or for industrial application. As reported by Diepenbrock (2000), oilseed crops have been of great interest in Europe for economical reasons for several years. Winter oilseed rape can be used as a catch crop species to reduce N leaching during the autumn-winter period because of its high capacity to take up nitrate from the soil. Lainé *et al.* (1993) have reported that the maximal rate of nitrate uptake in brassicaceae roots is higher than for many other catch crop plants (poaceae and legumineae, for example). Other work on oilseed rape grown hydroponically or in field conditions has shown that NO_3^- uptake increased from bolting to the start of the flowering, whereas little NO_3^- uptake was observed during pod filling (Merrien *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1997; Rossato *et al.*, 2001). Consequently, N supply to the pod is mainly achieved by N mobilization from vegetative parts (stem, leaves, taproot), whatever the soil NO_3^- concentration after flowering. However, N fluxes between N uptake on internal recycling have been estimated by ^{15}N labelling with plant grown in hydroponic conditions; the magnitude of remobilization to supply reproductive tissue still have to be estimated with plants grown in field conditions.

In spite of a very high capacity to take up NO_3^- , many authors have reported a very low N-use recovery under field conditions in oilseed rape crops. This N-use recovery, calculated as the ratio of plant N content to the nitrogen supplied, does not exceed 50-60 % whatever the level of N fertilizer applied (Augustinussen, 1987; Smith *et al.*, 1989; Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1997; Leleu *et al.*, 2000; Chamorro *et al.*, 2002). A large amount of N taken up is released to the soil by the drop of leaves during the growth cycle, particularly during the winter when temperature and light intensity are low (Diepenbrock *et al.* 1981; Colnenne *et al.* 1998; Dejoux, 1999). Otherwise, leaves dropped before pod filling have high values of total N content (2-2.5 % of dry weight; Triboï-Blondel, 1988; Rossato *et al.*, 2001). This result suggests a low ability of the vegetative parts (leaves, stem, taproot) to mobilize N toward pods during the reproductive period. Lack of synchrony between the start of N leaf mobilization, induced by early senescence, and development of pods may be responsible for the low N mobilization ability and the subsequent high N amounts in dropped leaves (Diepenbrock, 2000; Rossato *et al.*, 2001). Using ^{15}N labelling, Rossato *et al.* (2001) have identified transient N storage tissues

(stem, taproot). These authors have proposed that these buffer organs could be developed in order to increase the sink force for N at the whole plant level during the floral transition and store the N coming from leaves. A study of N flux in leaf ranks demonstrated that leaf ranks emerging during autumn and winter had a smaller life duration than those emerging during spring (Triboï-Blondel, 1988). This indicates a differential pattern of leaf drop during the growth cycle and an early senescence of "autumn and winter" leaves, even if N content patterns in each leaf rank were similar with a nearly constant final N content of 2 %. Triboï-Blondel (1988) has pointed out different patterns of leaf span-life, but apart from self shading effect, no determinism based on the fine physiological key processes involved in the early leaf drop has been proposed at the plant or at the organ level. It is well known that leaf drop during flowering and start of pods growth coincides with flowers and pods development and subsequent shading effect. Indeed, Chapman *et al.* (1984) have reported that 80 % of incoming radiation was reflected or absorbed by reproductive tissues, resulting in a strong shading effect on leaves from the top of the canopy. Consequently, shading effect is commonly assumed to be responsible for the drop of the leaves at the canopy level from the early flowering. In the same way, it could be hypothesized that a self-shading of leaves might be responsible for the leaf drop during the bolting, especially when a N fertilizer application is practiced as reported by Kappen *et al.* (1998). Indeed, leaves from an oilseed rape crop grown in an unfertilized plot tend to perform like "sun" leaves compared to leaves from a crop grown in a fertilized plot, with an increased LAI and a subsequent obvious self-shading effect.

A pertinent use of N fertilization combined with a genetic improvement of N harvest index are probably the most readily available tools to improve the yield of this culture while minimizing the release of N in the environment. However, a better understanding of N uptake, N partitioning and the contribution of these key physiological processes to biomass and yield formation is required as a basis for genetic improvement. The modelling of N uptake by oilseed rape using field data and controlled condition based kinetic description of nitrate transporter activity down regulated by local nitrate availability to the roots, temperature, light availability within the canopy and further controlled by plant ontogenic development has been satisfactorily obtained (Malagoli *et al.*, 2004a). On the other hand, data on the allocation pattern of N taken up within the plant remains relatively scarce, and the complexity of these processes relies on the fact that many tissues are involved with probably different behaviour in terms of allocation priority or remobilization capacity. For example, it is not known how a given leaf rank behaves in terms of dependence to newly N uptake and subsequent allocation or to remobilized N from other tissues and how these processes are affected by leaf position

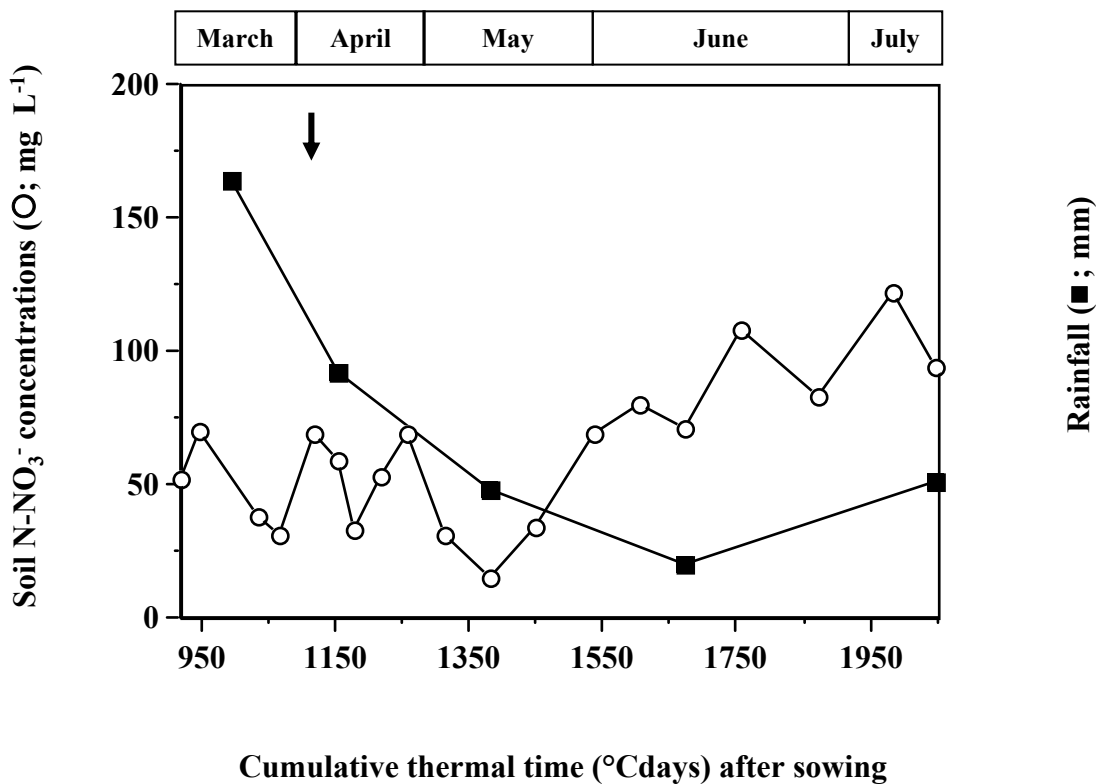


Figure IV.1 : Monthly rainfall (■; mm) and soil N-NO₃⁻ concentrations (○; mg L⁻¹) at Hérouvillette (2000) from bolting to harvest.

Figure IV.1 : Précipitations mensuelles (■; mm) et concentrations en azote nitrique dans le sol (○; mg L⁻¹) à Hérouvillette (2000) de la reprise de végétations au stade maturité des graines.

within the canopy, *i.e.* its trophic position (insertion in source/sink network) as well as the resulting environment (light and temperature).

Therefore, the aim of this study was to investigate the dynamics of N uptake and N partitioning in a winter oilseed rape crop from bolting to harvest by using an original sequential and weekly ^{15}N labelling technique in field conditions to follow the translocation of N coming from root uptake or mobilization from vegetative parts to N filling of various organs. The present paper investigates N fluxes between tissues in order to describe sink/source transitions and the main characteristics of the different leaf ranks (minimal and maximal N content, extent and duration of remobilization, life span) while a companion paper described a model of N fluxes which gives access to pertinent parameters that were subsequently manipulated to test different hypothesis that may increase N harvest index. The final objective of this work is to obtain enough knowledge in the near future to discriminate experimentally the weight of environmental and genetic determinism of these processes and therefore, to provide the background needed for an efficient genotypic improvement of oilseed rape.

B. Materials and methods

1. Crop culture

A winter oilseed rape crop (*Brassica napus* L. cv. Capitol) was sown on a clayey loamy soil in autumn on 10 September 2000 at Hérouvillette, 10 km north of Caen (49°10' north, 00°27' west), France. N fertilizer was applied at the start of bolting stage (C2) (CETIOM source; 75 kg N ha⁻¹) and at the bud visible stage (E; 150 kg N ha⁻¹) as NH₄NO₃. Monthly rainfall, soil N content and date of N fertilizer application are shown in figure IV.1. Soil N was in excess and no specific water stress was observed during the experiment period due to constant rainfall during spring. Plant density was approximately from 37 to 40 plants m⁻² during the period of experiment (from bolting to harvest).

2. Experimental treatment, labelling and harvest

The ^{15}N labelling experiment was performed from bolting (at the beginning of March) to seed maturity (at the beginning of July). Seven days before each weekly harvest date, twelve

plants at the same developmental stage were selected inside the canopy. The bottom of the petiole of the senescing leaves was attached to the stem by a nylon thread in order to collect the dropped leaves later on. Then, 750 ml of labelled nitrogen (1mM K¹⁵NO₃, ¹⁵N excess=10%) was applied around each plant, at the soil surface (about 400 cm²). Seven days after ¹⁵N labelling, plants were harvested with careful sampling of the root system in the top 30 cm layer of the soil. The twelve plants were pooled in three sets of four plants. At each harvest, plants were sampled into lateral roots, taproot, green and dead leaves, stem, flowers and pods. However, because evaluation of lateral roots in field conditions was quantitatively difficult, this tissue was omitted for further analysis. After being numbered, green leaves were sampled individually as a function of their rank along the stem. The number of the first leaf was determined from the number of the scars on the collar and on the stem under the first leaf position, corresponding to previously fallen leaves. Nitrogen data collected for individual leaf ranks were pooled as green leaves in the present paper, while these individual values are analysed in a companion paper.

3. Chemical analysis and calculation of N fluxes

At each harvest, plants fractions were weighed, lyophilized, weighed again for dry matter determination and then ground to a fine powder for isotopic analysis.

The total N and ¹⁵N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Twenty-twenty, PDZ Europa Scientific Ltd, Crewe, UK) linked to a C/N analyser (Roboprep C/N, PDZ Europa Scientific Ltd, Crewe, UK).

Experimental data of dry weight and N content in each tissue were submitted to polynomial regression to minimize variation between each harvest date. Then, N uptake was estimated by the difference of the plant N content between two harvest times, based on the polynomial regression obtained. Excess ¹⁵N in each tissue combined with total plant N uptake calculated previously, allowed to calculate the partitioning of N taken up. Based on the assumption that unlabelled N from the soil was taken up and allocated in different plant tissues similarly to labelled N, then real N allocation in each tissue from N uptake was calculated as:

$$\frac{(N_{t+7\text{days}} - N_t) \times \text{¹⁵N excess in each tissue}}{\text{total ¹⁵N excess in plant}} = \text{N uptake}$$

with N_t : total nitrogen in plant (mg) at day t when ¹⁵N fertilizer was applied

$N_{t+7\text{days}}$: total nitrogen in plant (mg) at time t +7 days after ¹⁵N fertilizer was applied

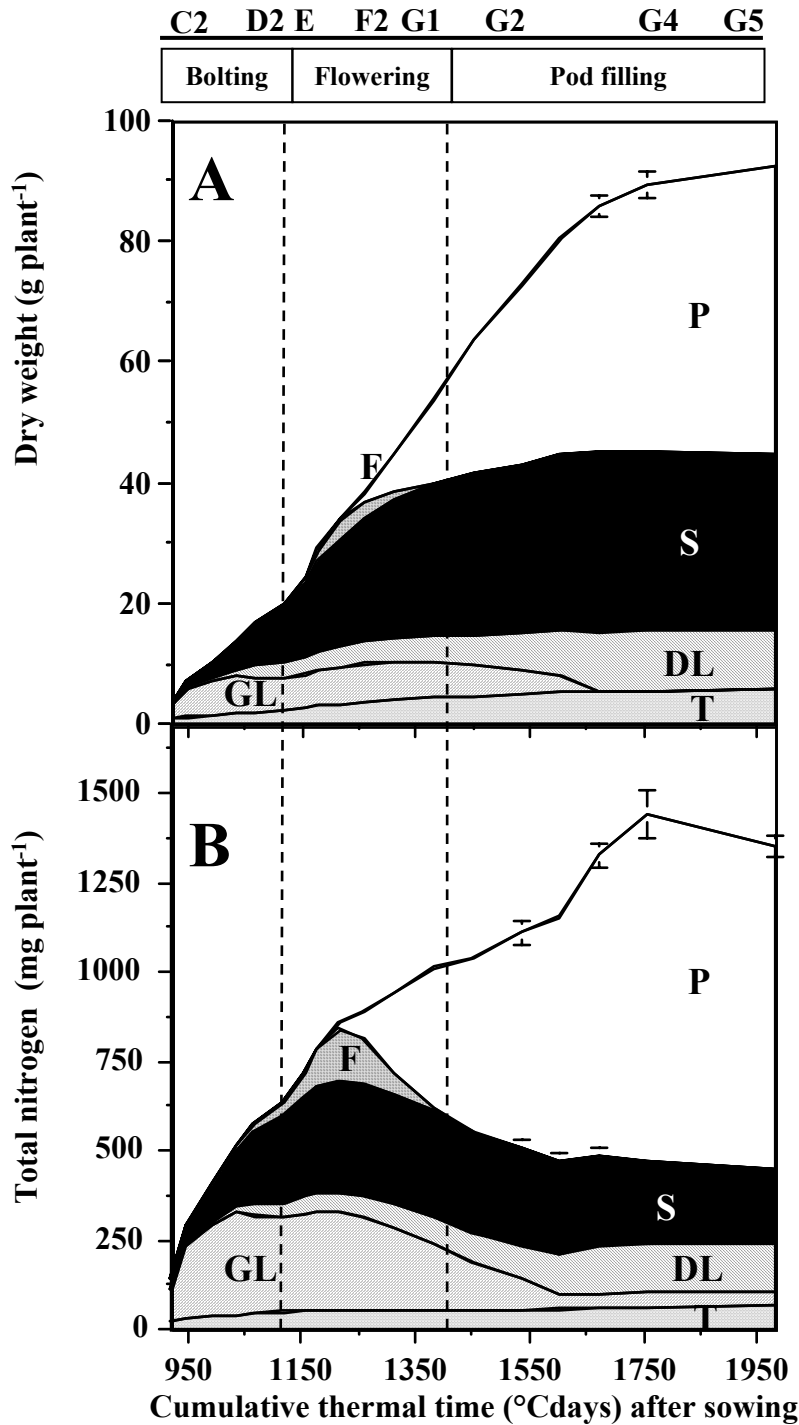


Figure IV.2 : Biomass (A) and total nitrogen (B) changes in *Brassica napus* L. plants further separated into taproot (T), green leaves (GL), dead leaves (DL), stem (S), flowers (F) and the pods (P). Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.2 : Evolution de la biomasse sèche (g. plante⁻¹) (A) et de la quantité en azote total (mg. plante⁻¹) (B) des différents tissus (pivot, feuilles vertes, feuilles mortes, hampe florale, inflorescences, siliques) chez *Brassica napus* L. var. Capitot de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Chaque barre représentent l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

After calculating the N coming from uptake in each organ, the pattern of net translocation of endogenous unlabelled N (N absorbed prior to the beginning of labelling) between plant parts could be used to estimate N mobilization within the plant. At each harvest, the amount of N mobilized from or to each tissue (N mob) was calculated by subtracting the total N amount ($N_{t+7days}$) from (i) the N derived from uptake (N uptake) and (ii) the previous N amount found in this tissue seven days before (N_t). With such equation:

$$N \text{ mob} = N_{t+7days} - N_t - N \text{ uptake}$$

Therefore, positive values of N mob represent nitrogen which mobilized to this tissue, while negative values correspond to a net mobilization of N from this tissue. For each leaf rank, the following values were calculated: (i) both cumulative amounts of N derived from N taken up and endogenous N mobilized from source tissues, (ii) percentage of apparent N mobilization = $(N_{max} - N_{min}) \times 100 / N_{max}$ where N_{max} and N_{min} correspond to maximal and minimal total nitrogen (mg), respectively, (iii) dates of appearance, drop and start of endogenous N mobilization (calculated when N mobilization reaches negative values) expressed in cumulated thermal time ($^{\circ}\text{Cdays}$).

Time was expressed in cumulative degree-days since sowing, using 4°C as the base temperature. The number of cumulative degree-days was calculated as the sum of the mean daily temperature.

4. Statistical analysis

All experiments were performed with 3 sets of 4 plants. The resulting variation in the measurements was expressed as the mean \pm SD for $n=3$.

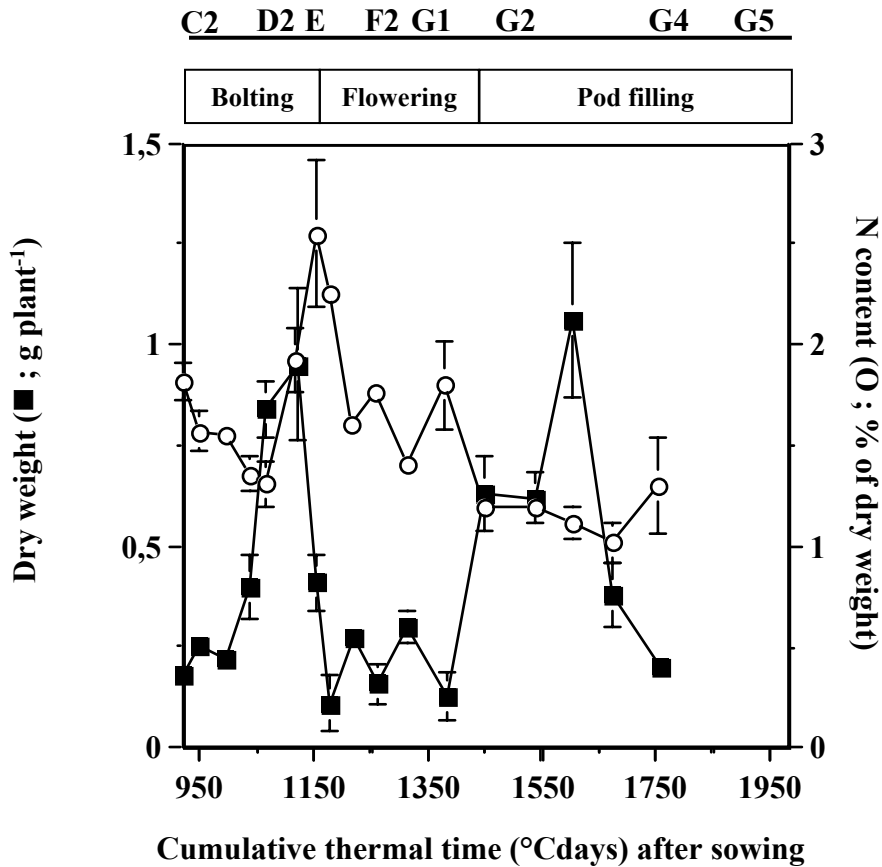


Figure IV.3 : Biomass (■; g. plante⁻¹) and total nitrogen (○; % of dry matter) changes in dead leaves in *Brassica napus* L. var. Capitot plants. Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.3 : Evolution de la biomasse sèche (g. plante⁻¹) (■) et de la teneur en azote total (% de la matière sèche) (○) dans les feuilles mortes chez *Brassica napus* L. var. Capitot de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Chaque barre représentent l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

C. Results

1. Dry matter production

Our experiment conducted under field conditions shows that plant growth was significant and continuous during all the growth cycle (Figure IV.2A). From bolting (C2) to visible bud stage (D2), green leaves and stem constituted the greatest proportion of the plant dry matter (about 80 %). Then, rapid increase of stem biomass (from 5 to 29 g DW.plant⁻¹) occurred from the appearance of buds (E) to the start of pod filling (G1). This increase could be explained by the growth of branches along the principal stem during flowering. Despite an increase in the dry weight of dead leaves, photosynthetic leaf biomass hardly varied during this period (E-G1) because the drop of leaves was compensated by the appearance of new photosynthetic leaves. At mid-flowering, dry matter of flowers reached a maximum value of 3.14 g DW. plant⁻¹, before declining as pods formed. Taproot and pod dry matters increased until harvest, whereas stem and photosynthetic leaf dry matters were maximum at the start of pod filling (G1; 29 and 8 g.plant⁻¹, respectively). All the leaves dropped before the end of seed maturity (1673.2°Cdays). At harvest, pods represented the major part of the dry matter (60 %).

2. Apparent N accumulation/mobilization

At the start of bolting (C2), leaves represented the major sink for N (Figure IV.2B) (from 921.9 to 1067.1°Cdays). Total nitrogen in leaves plateaued at 329 mg N, whereas N allocated to stem increased dramatically until mid-flowering to attain a maximum value of 310 mg. plant⁻¹. Before the start of pod filling, N was mainly shared between leaves, stem and flowers which constituted 35, 35 and 15 % of total N within the plant, respectively. Apparent N mobilization from N sources (leaves, stem, and flowers) was concomitant with the development and filling of pods. Apparent N mobilization from leaves averaged 66 %. In contrast, it seems that apparent N mobilization capacity of stem was only 30 %. Finally, total N uptake plateaued late, at 1673.2°Cdays (Figure IV.2B) in this field experiment, which can be related to a high N availability in the soil without any water deficiency (Figure IV.1).

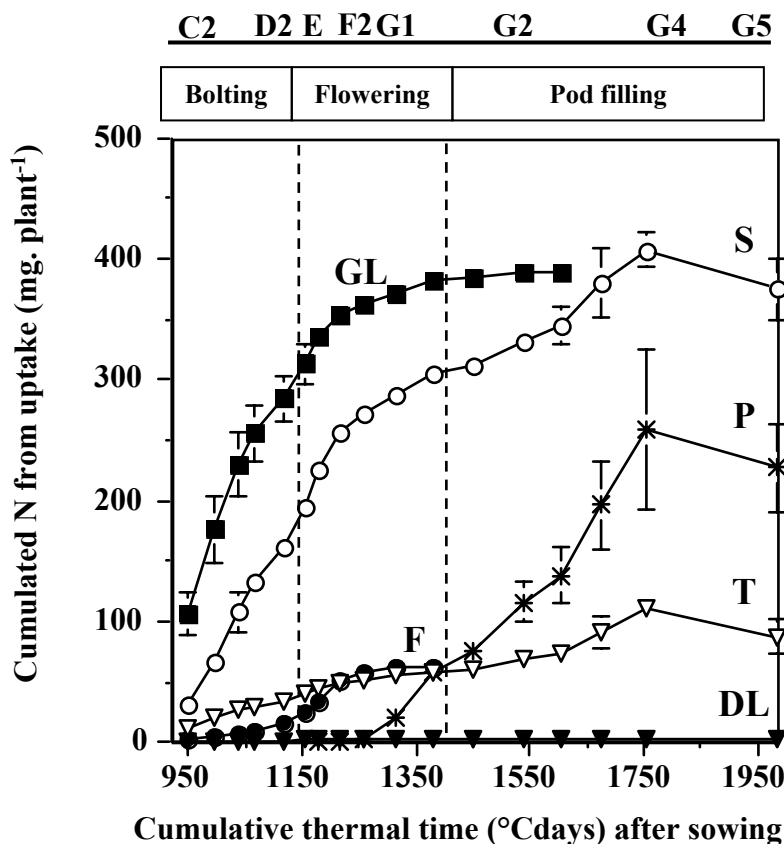


Figure IV.4 : Cumulative N uptake estimated by ¹⁵N labelling in *Brassica napus* L. plants further separated into taproot (T), green leaves (GL), dead leaves (DL), stem (S), flowers (F) and the pods (P). Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.4 : Accumulation de la quantité d'azote issu de l'absorption, estimée par un marquage ¹⁵N, allouée dans les différents tissus (pivot, feuilles vertes, feuilles mortes, hampe florale, inflorescences, siliques) chez *Brassica napus* L. var. Capitoul de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

3. Dry matter and total N content patterns in dead leaves

The sampling procedure used at each harvest allowed to follow the precised dry matter and N content patterns in dropped leaves under field conditions. Dry matter pattern is marked by two peaks of leaf drop (Figure IV.3). The first one occurs at the end of bolting (D2-E stage) and is characterized by high values of total N content (averaging 2-2.5%). During the flowering and the pod filling, total N content in dropped leaves decreased. Consequently, the second peak, occurring during pod filling, was characterized by “low” N content (reaching 1% at G4 stage). N loss by the drop of leaves during the experiment (from bolting to harvest) reached 45 kg N. ha⁻¹.

4. Partitioning of N taken up

¹⁵N labelling each week during the experiment allowed the quantification of cumulative N uptake and allocation to each plant part (Figure IV.4). ¹⁵N amounts increased in green leaves, stem, taproots and flowers until the end of the flowering (F2). Whereas N uptake and further allocation (Figure IV.4) in taproot and flowers reflects growth, relative mass and N content as indicated in figure IV.2, green leaf compartment showed a constant increased of N allocation until the end of flowering while its biomass remained to a nearly steady state value from 948.9 to 1382 °Cday (Figure IV.2B) probably reflecting a high N turnover in green leaves and subsequently a high re-export of N. A similar conclusion can be made for stem after flowering: a continuous increase of allocation of N derived from uptake (Figure IV.4) while its biomass remained the same (Figure IV.2B). From G1 stage, pods became the main organs where ¹⁵N taken up was allocated while no significant increase was observed in green leaves, although ¹⁵N continued to accumulate in stem and taproot until 1673.2°Cdays.

Labelled N flux in each organ (expressed in $\mu\text{g N. plant}^{-1}. (\text{°Cdays})^{-1}$), *i.e.* the slope of the different straight lines defined between the inflexion points composing each curve, was calculated to determine the rate of ¹⁵N allocation associated to each compartment. From the start of bolting (C2) to the start of pod filling (G1), organs can be classed as a function of their decreasing force: leaves, stem, taproot and flowers. ¹⁵N amount allocated to the stem was relatively constant ($879.3 \pm 22.2 \mu\text{gN. plant}^{-1}. (\text{°Cdays})^{-1}$). By contrast, sink strength of leaves and flowers varied during bolting and flowering. From D2/E to G1, ¹⁵N amount allocated to

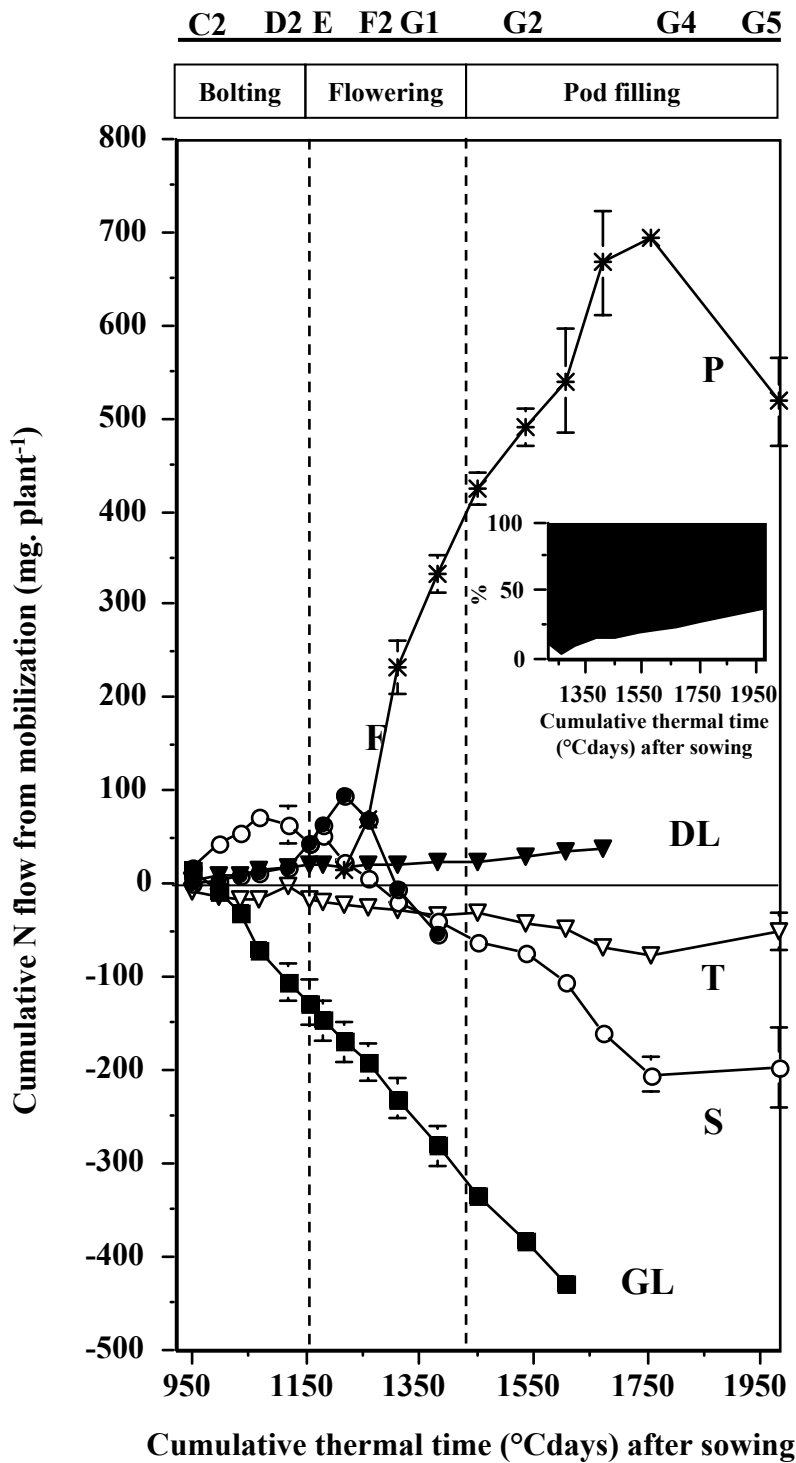


Figure IV.5 : Cumulative endogenous N flow in the different *Brassica napus* L. plant parts: taproot (T), green leaves (GL), dead leaves (DL), stem (S), flowers (F) and the pods (P). Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.5 : Flux d'azote endogène cumulé dans les différents tissus (pivot (T), feuilles vertes (GL), feuilles mortes (DL), hampe florale (S), inflorescences (F), siliques (P)) chez *Brassica napus* L. var. Capitot de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

green leaves declined (from 1999.6 ± 225.2 during C2/D2 to $688 \pm 115.2 \mu\text{g N. plant}^{-1}(\text{°Cdays})^{-1}$ during D2/G1)) and increased in flowers (from 68.1 ± 7.2 during C2/D2 to $282.7 \pm 16.6 \mu\text{g N. plant}^{-1}(\text{°Cdays})^{-1}$ during D2/G1), reflecting the change in ^{15}N allocation to the benefit of the new growing sinks. During pod filling (from G1 to G5), N uptake was maintained at a significant level (30 % of the total N taken up by the crop). Consequently, pods became the main sink for ^{15}N (Figure IV.4).

5. Partitioning of mobilized N

All the previous data taken together were used to determine endogenous N flows before and during pod filling (Figure IV.5). An overview of source-sink relationships for N was obtained by summing endogenous N influx (positive values of N mobilized) and efflux (negative value of N mobilized) for each tissue, so that a sink organ for N had an increasing cumulated N flow whereas a source organ had a decreasing cumulated endogenous N flow. Figure IV.5 illustrates the transition from sink to source behaviour of a tissue when the maximal cumulative flow from remobilization is reached and declined thereafter. This demonstrates that the leaves and the taproot, to a lesser extent, were permanent sources of endogenous N during the studied period. From the start of bolting (C2) to the visible buds stage (E), endogenous N coming from leaves and taproot were mainly allocated to the stem (86 %) and later to the inflorescences (14 %), although a portion remained in dead leaves. The status of stem changed from sink to source during floral transition at 1067.1 °Cdays . During the flowering period (from E to F2), flowers became the only sink for endogenous N, supplied by the leaves (57 %), the stem (38 %) and the taproot (5 %), before behaving as a source at 1217.9 °Cdays . During pod filling, all vegetative tissues behave as sources for endogenous N. Indeed, about 690 mg of endogenous N were mobilized to the pods: 36, 34, 22 and 8 % being mobilized from leaves, stems, inflorescences and taproot, respectively.

The contribution of labelled and unlabelled N flows to each tissue could be determined. Exogenous N derived from concurrent uptake is the only source of N for a source tissue while a sink organ will get N from concurrent uptake as well as from mobilization of N from source tissues. Endogenous N represented 35, 64 and 73 % of the total N allocated to the stem, the flowers and the pods (Inset in figure IV.5), respectively. Leaves were the most important source organ for endogenous N mobilization throughout the experiment, although contributions from stem and taproot increased between G3 and G4.

Mobilization of endogenous N mainly occurred during the pod filling. Overall, only 18, 34 and 35 % of endogenous N mobilization occurred before pod filling from stem, taproot and leaves, respectively. Endogenous N mobilization rate was strongly increased during pod filling: in the stem (by 2.7 fold), taproot (by 2.5 fold) and to a lesser extent in the leaves (1.4 fold). Comparison of data for pods in figures IV.5 and IV.6 shows that 73 % of N in these reproductive tissues was derived from internal recycling (inset in Figure IV.5). However, it should be kept in mind that during the experiment, rainfalls and mineral N in the soil (Figure IV.1) remained relatively high and this would probably minimize the role of internal recycling.

6. N dynamics in each leaf rank (LR)

Because of the number of leaf ranks (26), only data relevant to N contents will be described. Parameters describing N content pattern, dates of appearance, drop and start of endogenous N mobilization and also N flux provide an overview of each leaf rank behaviour (Figures IV.6, 7, 8). Leaf ranks already in place at the beginning of the experiment (from LR 11 to 21) were characterized by high values of minimal N content (ranks 11 to 21 varying from 2.5 and 3.5 %; Figure IV.6A) and wide ranging efficiencies of apparent N mobilization ranging from 30 to 60 % (except for LR 11; Figure IV.6B). The start of N mobilization in the younger leaves (LR 22-36) was concomitant with flowering and the subsequent development of strong sink tissues for N such as flowers and pods (Figure IV.7). The N pattern in these leaf ranks were marked by a minimal N content averaging a nearly constant value of 2 % (Figure IV.6A). However, for LR 22-27, this resulted from a high values of apparent N mobilization (70 %; Figure 6B) with a high maximal N content (above 7 % of DW; Figure IV.6A), while for LR 33-36 for example, it was the result of a lower maximal N content (about 6 % of DW; Figure IV. 6A), combined with a lower apparent mobilization capacity (lower than 60 %; Figure IV.6B).

The duration of endogenous N mobilization (Figure IV.7; °Cdays between the start of N mobilization and the leaf drop) increased from LR 16 (about 230°C days) to LR 22 (about 530°C days) and this may be related to the onset of flowering and the start of pod filling (Figure IV.7). Thereafter, the duration of mobilization decreased again progressively from LR26 (495°Cdays) to LR36 (370°Cdays). Life span (°Cdays between leaf appearance and

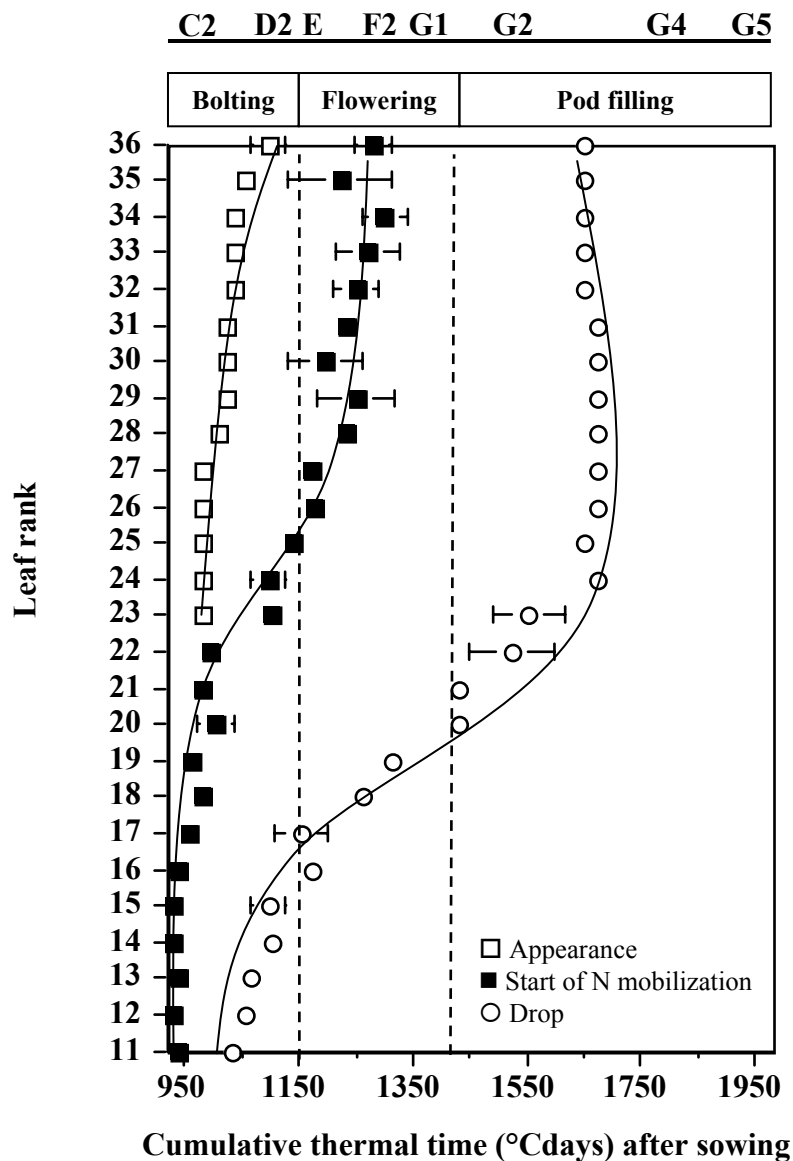


Figure IV.7 : Dates of appearance (□), drop (○) and start of endogenous N remobilisation (■) of the different leaf ranks. Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.7 : Dates d'apparition (□), de chute (○) et de début de remobilisation de l'azote endogène (■) dans chaque rang de feuilles chez *Brassica napus* L. var. Capitot de la reprise de végétation au stade maturité des graines. dans chaque rang de feuilles chez *Brassica napus* L. var. Capitot. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

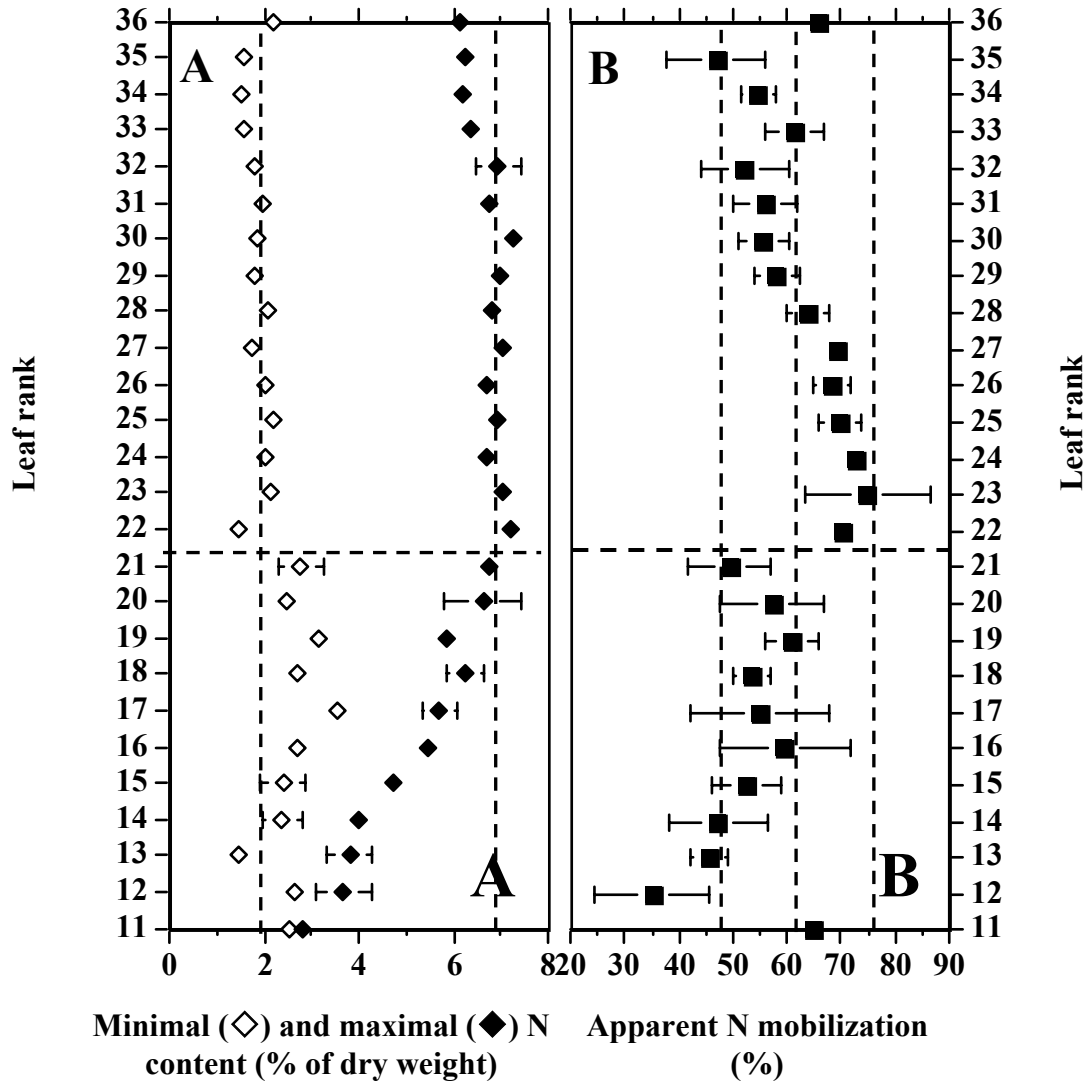


Figure IV.6 : Changes in the distribution of the minimal and the maximal N contents (A) and of the capacity of apparent N mobilization (B) in each leaf rank from the bottom (LR11) to the top (LR 36) of the canopy in *Brassica napus* L. var. Capitot. Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.6 : Evolution de la teneur en azote (% de la matière sèche) minimale et maximale (A) et de la capacité de remobilisation apparente de l'azote (% de la quantité en azote maximale) dans chaque rang de feuille orientés du bas (LR11) vers le haut du couvert (LR36) chez *Brassica napus* L. var. Capitot. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

drop, Figure 7) could be estimated for LR 23 to LR 36 and appeared to be relatively constant: $637.6 \pm 10.1^{\circ}\text{Cdays}$.

Before the appearance of flowers and pods, endogenous N mobilized from the leaves at the bottom of the canopy was mainly allocated to the stem and to the growing upper leaves (Figure IV.7; *i.e.* mobilization from and to vegetative tissue). Indeed, endogenous N coming from these vegetative parts was significantly involved (from 10 to 50 %) in the N filling of the LR 24 to 36 (Figure IV.8). It is interesting to note that N allocation to LR11-22 was strictly (for LR11-15) or mainly (for LR 16-22) achieved by N coming from uptake (Figure IV.8). The durations of N mobilization from LR 23-28 were 1.5-3 fold higher than in lower leaves (LR11-22). The contribution of younger leaves (LR30-36) remained low, mostly due to their low biomass, and therefore their low N content (Figure IV.8). It follows that when N was taken up early in the growing cycle, it was re-used probably several times by different leaf ranks before being finally remobilized at least partly to reproductive tissues.

D. Discussion

This ^{15}N labelling experiment undertaken in field conditions was designed to follow the seasonal course of current N uptake and N allocation by weekly ^{15}N labelling in different plant components focusing on leaf ranks. In our experiment, 36 leaf ranks were numbered. Nanda *et al.* (1995) and Tottonel *et al.* (1988) found 26 and 37 leaf ranks for a later (October 19th) or an equivalent sowing date (September 5th) comparatively to our sowing date (September 10th), respectively. Given our leaf ranks number was included in this range, it showed that our numbering technique and our sampling procedure were reliable enough.

In our conditions, N uptake remained quite important after the start of pod filling (G1) in contrast to previous reports by many authors (Gabrielle *et al.*, 1998a; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004a). Indeed, in spite of a drastic reduction of N uptake at G4 stage, 30 % of N was taken up during pod filling (Figure IV.2). Nevertheless, Hocking *et al.* (1997) have found that 33 and 11 % of N was accumulated in canola (*Brassica napus* L.) during and after flowering, respectively. Moreover, Schjoerring *et al.* (1995) reported that shoot N content may increase after flowering particularly at sub-optimal N supplies if N availability during the vegetative growth has been limited by a water deficiency. In our experiment, soil N was

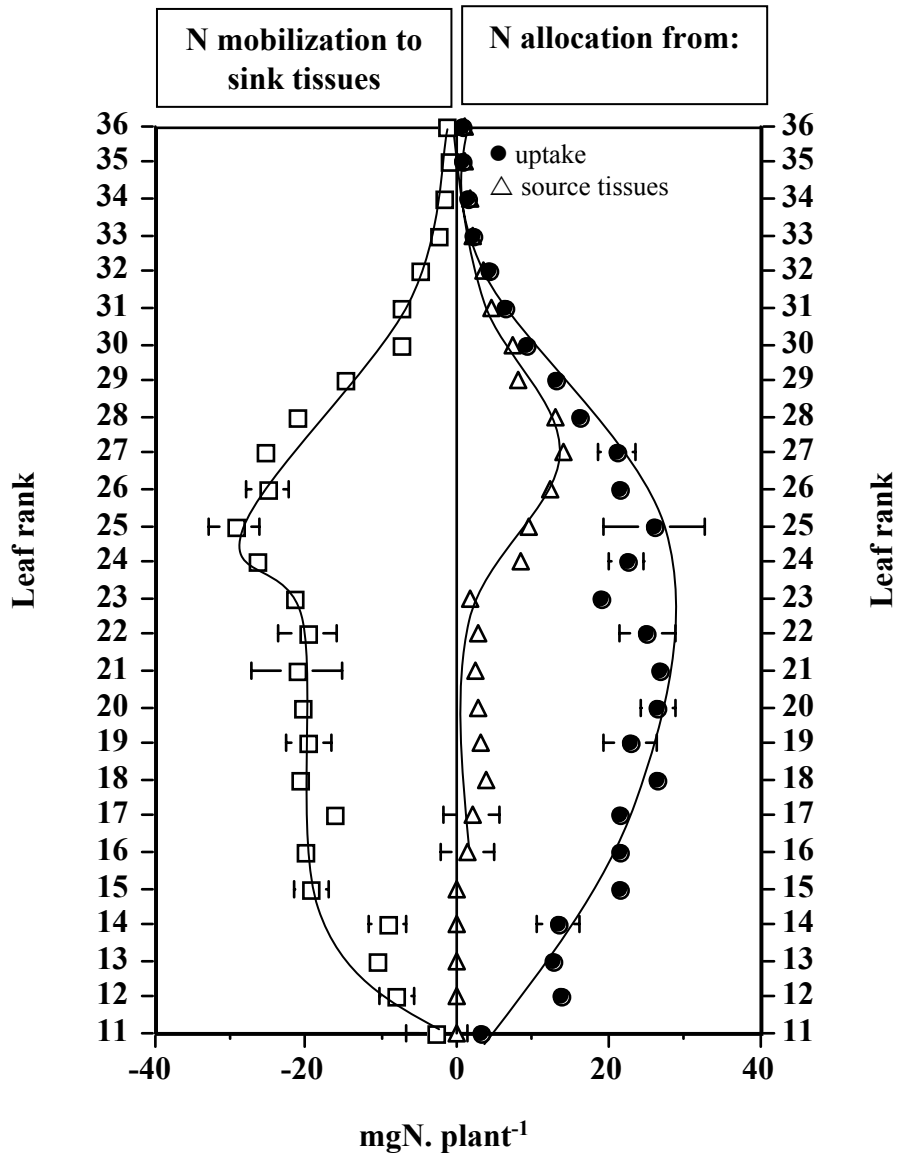


Figure IV.8 : Balance of N flows in each leaf rank: derived from N uptake (●: positive values), or from mobilization of other source tissues (△: positive values) and flows of N mobilized through internal cycling (□; negative values) to sink tissues. Vertical bars indicate \pm SD for $n=3$ when larger than the symbol.

Figure IV.8 : Flux d'azote entrant issu de l'absorption (●: valeurs positives) ou de la remobilisation d'organes sources pour l'azote (△: valeurs positives) et flux d'azote remobilisé (□; valeurs négatives) vers les tissus puits pour l'azote dans chaque rang de feuilles chez *Brassica napus* L. var. Capitot. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour $n=3$, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

plentiful and water deficiency was not supposed to be a limiting factor (Figure IV.1), both factors that may explain the maintenance of N uptake after flowering (Figure IV.2B).

Allocation of N taken up paralleled the appearance and the growth of the shoot components during the studied period. N taken up was preferentially partitioned to leaves and stem during bolting and flowering (Figure IV.4). Large amounts of N were allocated to leaves and stem to support growth and the high level of photosynthesis, and this is important for later pod filling (Habekotté, 1993). Lower leaves senesced before the onset of the flowering and the formation of pods (Figure IV.7). Given that there was no strong reproductive sinks for N during bolting, N mobilized from the lower LR was allocated to the new vegetative growing tissues such as the stem (Figure IV.5) and the leaf ranks located at the middle and top of the canopy (from LR 24 to LR 36; Figure IV.8). The contribution of endogenous N coming from bottom leaves and stem to N allocated to middle and top leaves increased and represented up to 50 % of N content in these leaves (Figure IV.8). On one hand, these results corroborate those of Schjoerring *et al.* (1995) obtained in *Brassica napus* L.. Indeed, they observed that the contribution of ^{15}N labelled (fertilizer derived) N to the total N content was all the more low that the leaves were located at the top of the canopy. For example, the proportion of ^{15}N labelled N in the upper leaves represented about 40 % of the total N content. More generally, they concluded that the contribution of fertilizer derived N to total N content was higher in vegetative than in reproductive tissues. On the other hand, our results are in good agreement with those of one of the scarce studies dedicated to leaf ranks in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) (Sanetra *et al.*, 1998). Indeed, by studying N remobilization in senescing leaves, they suggested that the decrease in total N content in leaf layers located at the bottom of the canopy before the beginning of the seed development as well as the lower N concentration of abscised leaves indicated the redistribution of N to other sink organs than the seed which would be the top leaf layers. In our experiment, these bottom leaves located leaves (LR 11 to LR 21, Figure IV.6A) dropped with high N contents (2.5-3.5 %) during bolting, indicating that a significant N fraction was not mobilized before leaf abscission as shown by Schjoerring *et al.* (1995), Hocking *et al.* (1997) and Dreccer *et al.* (2000) in *Brassica napus* L.. Indeed, the lower LR were characterized by lower apparent N mobilization values ranging from 30 to 60 % compared to those of upper LR 22-27 (averaging 70 %; Figure IV.6B). The high efficiency of the latter leaves may be linked to the development of reproductive sink-organs, which could represent stronger sinks. However, the critical factor affecting efficiency of mobilization appears to be the duration over which it occurred (Figure 7), which suggests that the N mobilisation from leaves would be source- rather than sink-limited, as already

suggested by Schjoerring *et al.* (1995) and Dreccer *et al.* (2000). This short mobilization duration in early leaves could be the result of an environmental factor such as the extinction of the light penetration in the canopy. In our experiment, the leaf drop occurred when the LAI reached about 4 (data not shown) during bolting. Habbekotté (1997c) have shown by a simulation that a crop with a LAI of about 3 could increase yield by limiting the self-shading of leaves and therefore improved the penetration and the interception of light. Otherwise, this LAI value is commonly accepted to correspond to the optimal LAI able to capture 90 % of incoming PAR (see review of Lawlor, 2002). Thus, in our experiment, self-shading by middle and top leaf ranks may induce the observed early leaf senescence and the rapid abscission of lower leaves before their N content reached a minimal value.

From flowering to harvest, although N uptake rate was maintained at a significant level (Figure IV.2B) and that 30 % of N taken up was allocated to pods, it only represented 27 % of final pod N content. N taken up was also partitioned to the stem and, to a lesser extent to the taproot. This sink strength for N taken up is probably a result of growth rates of stem and taproot (Figure IV.2A). Moreover, Leleu *et al.* (2000) showed that early leaf fall deprived the plant of many nitrate reducing sites. As a consequence, they demonstrated that the stem and the pods were able to increase the nitrate reductase activity to limit the harmful effect of leaf fall, provide that N uptake was sufficient to sustain nitrate reductase activity. Given reduced N is necessary to support pod growth, it can be suggested that N taken up is preferentially partitioned towards stem to maintain amino acids production when early drop of leaves occurs. Maximum height of the canopy was reached at flowering and the increase of stem biomass occurring later was due to the development of branches along the principal stem. Consequently, N filling in flowers and pods was mainly achieved by endogenous N representing 64 and 73 % of the total N content in these tissues, respectively. Endogenous N was essentially mobilized from the leaves (36 %) and the stem (34 %). These data obtained with plants grown in field conditions agree with those reported for plants grown in hydroponic culture by Rossato *et al.* (2001). It further shows that two peaks of leaf fall occurred either before or after flowering with different residual N contents (Figure IV.3). More precisely, our data demonstrated that middle and top LR were principally involved in N pod filling because this was synchronised with N mobilization from these LR (*i.e.* from LR 24 to 36). As a consequence, all the upper leaves fell with relatively low N contents (approximately 2 %) compared to leaves dropped during bolting (2.5 to 3.5 %), suggesting a better N mobilization to the benefit of pods. Indeed, middle and top leaves were characterized by a high N mobilization capacity (55-70 %; Figure IV.4B). Given Dreccer *et al.* (2000)

found that leaf shading was responsible for a drastic reduction of LAI by the end of flowering (especially for high N fertilization levels), it can be suggested that the drop of these leaves was induced by the light extinction in the canopy, due to shading, initially from the refraction of light by the flowers and later by the pods (Backx *et al.*, 1984; Chapman *et al.*, 1984, Gabrielle *et al.*, 1998a). Although Sanetra *et al.* (1998) concluded that upper leaves in the canopy have longer life span than leaves at low positions in the canopy due to shading in the bottom area, they observed an opposite pattern of total N content in leaf ranks before abscission. Indeed, leaf ranks at the bottom of the canopy were found more efficiently depleted in N (abscised with averaging 3 %) than the upper leaf ranks (4 %). It is noteworthy to remind that seed N filling in pigeonpea is mainly achieved by exogenous N, *i.e.* N uptake and N₂ fixation. Consequently, as reported by these authors, prolonged photosynthesis capacity of the upper leaves combined with functional nodules would improve N acquisition during pod filling. Given oilseed rape is not a legume and that N uptake is usually decreased after flowering stage, N supply from vegetative tissues is the preponderant N source to match N requirement during pod filling. However, even these younger leaves, for which N mobilization was the highest, still returned a larger proportion of N compared to other cultivated crops such as wheat or maize, for which residual N in leaf is usually lower than 1 % of dry weight. Stem can also be considered as a buffer organ where endogenous N mobilized from sink organs (bottom leaves, taproot) is stored during the vegetative period and then used for pod filling.

In conclusion, our study indicated that different leaf ranks differed with respect to their ability to mobilize N. Moreover, N from early leaves appeared to be re-cycled to younger leaves and stem, before again being re-cycled for incorporation into pods. This conclusion is in good agreement with the work of Rossato *et al.* (2001) which have found the occurrence of vegetative storage proteins (VSP) in taproot and leaves. Consequently, given that oilseed rape has a low N harvest index (0.67 in our experiment) compared to wheat, for instance (0.76; Dreccer *et al.*, 2000), genetic improvement related to morphology may be proposed to increase the size of this endogenous N pool and/or by an optimized transfer of N toward the pods. In fact, an ideal genotype would have an early flowering in order to synchronize N mobilization and N demand of pods. Otherwise, it appeared that N mobilization toward the middle and the top LR was limited by the early leaf abscission. Consequently, increasing life span, *i.e.* LAD (Leaf Area Duration), of lower LR would improve this N cycling pool. Given the fact that the middle and the top LR are able to mobilize N satisfactorily to the benefit of pod N filling, optimizing the LAI of these LR may increase the amount of endogenous N

allocated firstly to these LR and secondly to the pods. All these hypotheses may be tested with a modelling approach using the previously reported data as described in a companion paper. Parameters, defining N dynamics in plant compartments, will be used to test scenarios able to optimize pod N filling. In the long term, this model tested with various genotypes will aid the selection of the most appropriate proposed improvements to increase the N use efficiency in winter oilseed rape.

Acknowledgments

The authors thank Marie-Paule Henry for her excellent technical assistance with mass spectrometry and her involvement during unfinishable harvests and Dr Anthony Gordon (IGER Aberystwyth) with helpful and constructive comments on this manuscript.

CHAPITRE V. DYNAMICS OF NITROGEN UPTAKE
AND MOBILIZATION IN FIELD-GROWN WINTER
OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) FROM
BOLTING TO HARVEST II. A ¹⁵N LABELLING BASED
SIMULATION MODEL OF N PARTITIONING
BETWEEN VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE
TISSUES

V. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) from bolting to harvest II. A ^{15}N labelling based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues.

Running title: Modelling N dynamics in winter oilseed rape

P. MALAGOLI, P.LAINE, L. ROSSATO & A. OURRY

Soumis à Annals of Botany

UMR INRA-UCBN 950 EVA, Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S. Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université de Caen Basse Normandie, 14032 Caen Cedex, France

Abstract

Oilseed rape (*Brassica napus* L.) has often been used as a catch crop to deal with issue of N leaching, but for this to be effective, a predictive capability of N uptake and N partitioning by the crop is required. The aim of this work was to build a dynamic compartmental model of oilseed rape, based on the kinetic description of N uptake, partitioning and remobilization in each organ. In this study, logistic and exponential equations were fitted to each compartment, especially each leaf rank. Data, previously obtained from a ^{15}N labelling field experiment, allowed the precise quantification of the partitioning of total N content, the allocation of N taken up and the subsequent changes in the sink/source status for endogenous N in each tissue, during the growth cycle. This modelling approach constitutes a unique tool to quantitatively estimate the cycling of endogenous N pool in relation to changes in N uptake at the whole plant level. Furthermore, as oilseed rape crop is known to release high N amount to environment during the spring period by leaf drop, this model was used to identify potential methods to improve the N harvest index of this crop. Thus, values of

potential key parameters, corresponding to an optimal remobilization from these leaves, were tested aiming at improving N transfer from vegetative tissue to reproductive one as well as limiting %N DW in fallen leaves.

Key words: *Brassica napus* L., field conditions, ^{15}N labelling, N uptake, N dynamics, remobilization, cycling N pool, modelling

Résumé

Afin d'optimiser sa capacité de culture « piège à nitrate » ainsi que la remobilisation de l'azote au profit des siliques, une meilleure capacité à simuler l'absorption ainsi que le devenir de l'azote absorbé dans le végétal est indispensable. L'objectif de ce travail a été d'élaborer un modèle dynamique compartimental reposant sur la description des cinétiques des flux d'azote issu de l'absorption et de la remobilisation dans les différents organes chez le colza. Dans cette perspective, des équations logistiques et exponentielles ont été utilisées pour décrire de façon optimale la dynamique de l'azote dans l'ensemble des compartiments étudiés, notamment les rangs de feuilles. Les données recueillies dans une expérimentation antérieures ont permis de suivre précisément l'allocation de l'azote total, de l'azote absorbé ainsi que la chronologie exacte de transitions puits/source dans chaque organe. Le choix de cette approche modélisatrice a fourni un outil capable d'appréhender en conditions de plein champ le pool d'azote endogène circulant dans la plante entière. Par ailleurs, comme la culture de colza restitue des quantités importantes d'azote en particulier par voie foliaire à l'environnement pendant le printemps, ce modèle a été utilisé afin de définir des méthodes qui pourraient améliorer l'indice de récolte azoté de cette culture. Dans cette optique, des scénarios basés sur l'optimisation de la valeur de paramètres clés permettant, entre autres, une meilleure remobilisation à partir des feuilles *via* une réduction de la teneur en azote au moment de leur chute ou une synchronisation optimale entre le début de la remobilisation de l'azote et le début de remplissage en azote des organes reproducteurs lors de la transition florale ont été testés.

Mots-clé: *Brassica napus* L., champ, marquage ^{15}N , absorption N, dynamique de l'azote, remobilisation, pool N endogène, modélisation

A. Introduction

Brassicaceae species, and in particular oilseed rape (*Brassica napus* L.) are characterized by a high capacity of NO_3^- uptake (Lainé *et al.*, 1993), which makes them suitable as catch crop species to limit N leaching in the aquifer during the autumn-winter season. In winter oilseed rape, N uptake is very high from bolting to flowering, in order to satisfy the N demand of the shoot (Wright *et al.*, 1988; Schjoerring *et al.*, 1995; Gabrielle *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004a). However, after flowering, N uptake is dramatically decreased (Malagoli *et al.*, 2004a) or stopped (Merrien *et al.*, 1988; Wright *et al.*, 1988; Gabrielle *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001; Chamorro *et al.*, 2002). Moreover, winter oilseed rape is characterized by both a low N use efficiency (Schjoerring *et al.*, 1995; Hocking *et al.*, 1997) and a low N harvest index (NHI) of approximately 70 % (Schjoerring *et al.*, 1995). This is mainly due to an important leaf drop occurring during winter and spring which allows a significant amount of N to return to the environment. Thus, up to $100 \text{ kgN}\cdot\text{ha}^{-1}$ can be released during winter (Dejoux *et al.*, 2000) versus 20 to $60 \text{ kgN}\cdot\text{ha}^{-1}$ during spring depending on the fertilizer level (Gabrielle *et al.*, 1998; Hocking *et al.*, 1997; Gosse *et al.*, 1999). Whereas leaf nitrogen released to the environment during winter is partially recovered as mineral N during bolting to supply stem growth ($52 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ taken up by the crop; Dejoux *et al.*, 2000), the amount of N returned to the soil by the drop of senescing leaves during spring is not further taken up by the crop.

The N% of dropped dead leaves of winter oilseed rape can reach 1.2-4.5 % of DW in winter (Dejoux, 1999), and 2-2.5 % of DW in spring (Wright *et al.*, 1988; Hocking *et al.*, 1997). This is considerable higher than the N% of 1 % of dead leaves in other crops, which is supposed to correspond to the structural N%. To our knowledge, very few studies have been undertaken to explain the high N% of dropped leaves in rape. During plant development, N compounds are translocated from senescing tissues to other plant part (*i.e.* sink tissue) either for storage or for new growth. Leaf senescence in higher plants may be induced prematurely by environmental factors (shading, temperature, water or nutrients deficiency) as reported by several authors (Smart *et al.*, 1994; Gan et Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). For example, in winter oilseed rape, shading of lower leaves under the canopy could trigger senescence. It is well known that the distribution of N, based on the specific leaf nitrogen ($\text{g N}\cdot\text{m}^{-2}$), parallels the light penetration profile into the canopy (Charles-Edwards *et al.*, 1987) in order to maximize the photosynthetic activity at the whole plant level. Thus, Grindlay *et al.*

(1997) has reported that this strategy can improve the photosynthetic gain from 15 to 20%, as compared to a uniform N distribution. Moreover, the expression of specific senescence-associated genes (SAGs) can be regulated by sugar concentrations in the leaves. For example, it has been shown in *Arabidopsis thaliana* that expression of dark-inducible genes associated with leaf senescence can be induced by sugar starvation (Fujiki *et al.*, 2001). N remobilization from the shaded leaves toward the lighted leaves is mostly the result of protein hydrolysis (mainly Rubisco), chlorophyll degradation, and a subsequent decrease of photosynthesis that triggers an increase of the leaf senescence under natural conditions (Okada *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993; Matile *et al.*, 1996; Ono and Watanabe, 1997).

Although some of the individual genes encoding enzymes or proteins induced for the remobilization of nitrogen during leaf senescence are well characterized at the biochemical and molecular levels (Feller and Fischer, 1994, Buchanan-Wollaston, 2003), few integrated approaches have been developed to study the various events related to nitrogen remobilization at the whole plant level during the growth cycle. One exception is the study by Masclaux *et al.* (2000), who developed a conceptual model describing the source/sink relationships existing between the different leaf ranks, based on a study of the metabolic, biochemical and molecular events occurring during leaf ageing in *Nicotiana tabacum*. At the physiological level, N uptake and N flows between roots and shoots were quantified using ^{15}N labelling. However, experiments were usually restricted to a short period of the plant life span (Peuke and Jescke, 1993; Peuke *et al.*, 1996), or conducted in controlled conditions (Rossato *et al.*, 2001). Furthermore, most of these experiments did not distinguish the origin of the N used for plant development, namely from N uptake or from vegetative tissue remobilization.

The N harvest index (NHI), in winter oilseed rape, could be improved by maximizing the N pod filling, coupled with a limited supply of N fertilizer to reduce N release in the environment. Because of the complex processes involved (large number of leaves with potentially different source/sink dynamics), a simulation model appears to be a useful tool to capture and integrate the dynamics of the N flows within the plant, and to identify targets that may improve the NHI in oilseed rape. Most existing models predict crop yield in response to environmental factors such as N availability, water stress or disease levels. For example, the DAISY crop model (Hansen *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 1995), simulates the daily potential N demand in shoots and roots by calculating the difference between the potential amount of nitrogen (assumed to be a function of the temperature sum) and the actual nitrogen supply. This empirical model of N partitioning was improved by the establishment of the N dilution curve for rapeseed (Colnenne *et al.* 1998) and in the CERES-N rape model (Gabrielle *et al.*,

1998a), daily N demand for each compartment (leaves, stem, roots) was defined by the N dilution curve. Consequently, N partitioning was proportional to the respective N demand until flowering. During the reproductive phase, pods were considered as the only sinks for N. As a consequence, N translocated to these tissues was calculated from the decrease in N content in each tissue and all leaves were considered globally. Nevertheless, in spite of more detailed spatial partitioning of N, there was no parameter able to characterize the N dynamics within the plant and the subsequent sink/source relationships. To our knowledge, there are no dynamic models for N partitioning and translocation, although comparable models for photoassimilate partitioning have been documented. Minchin *et al.* (1993) developed a model based on the mass flow theory, in which the source/sink relationships are assumed to be governed by concentration differences of C assimilates between the source and the sink organs and by the sink activity. However, this concept has been criticized by Bancal and Soltani (2002) who argued that the input parameters for the model (phloemic hydraulic resistance and assimilate concentration in the source tissue) were difficult to assess precisely. Hence, a supply-demand model of carbon and nitrogen partitioning applied to defoliated grass (MecaNiCal, Tabourel-Tayot and Gastal, 1998a, b) was built. In this model, assimilate partitioning is based on the acquisition and the utilization of C and N in each compartment. No transport processes were included and N partitioning was deduced from C partitioning through C/N ratios. In spite of this mechanistic approach, N dynamics was not directly modelled and could not be estimated by kinetic parameters characterizing N allocation and N mobilization in the different organs.

The aim of the present study was to propose a model describing the partitioning of exogenous ^{15}N coming from uptake and the remobilization of endogenous N coming from vegetative tissue, using experimental data obtained in field conditions from bolting to harvest (Malagoli *et al.*, 2004b). Patterns of exogenous and endogenous N dynamics of all plant parts, including the different leaf ranks, were established by a ^{15}N labelling and were subsequently used to determine parameters, which may play a key role in the N pod filling in oilseed rape. The compartmental analysis allowed the dynamic quantification of a circulating endogenous N pool at the whole plant level which usually cannot be accurately analysed (for example, through the assessment of the qualitative composition of the phloem sap) and the evaluation of its putative role in the long distance regulation of N uptake. Finally, the model was used to identify potential methods to improve the NHI of winter oilseed rape.

B. Material and methods

1. Experiment design

A field experiment was conducted to study dynamics of N allocation and mobilization within winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) from bolting to harvest. Details about experiment can be found in Malagoli *et al.* (2004b). Nevertheless, few details can be briefly remained. Labelled K^{15}NO_3 (1mM, ^{15}N excess=10 %, volume per plant: 750 ml) was applied weekly around one individual plant (12 replicates) at the same developmental stage in field conditions. Seven days later, each plant was harvested and separated into the following compartments: taproot+roots, stem, green leaves, dead leaves, inflorescences and pods. Green leaves were sampled individually as a function of their rank along the stem. The real number of the first leaf was determined from the number of the scars on the collar and on the stem under the first leaf position, corresponding to previously fallen leaves. At each harvest, plants fractions were weighed, lyophilized, weighed again for dry matter determination and then ground to a fine powder for isotopic analysis. The total N and ^{15}N in the plant samples were determined with a continuous flow isotope mass spectrometer (Twenty-twenty, PDZ Europa Scientific Ltd, Crewe, UK) linked to a C/N analyser (Roboprep C/N, PDZ Europa Scientific Ltd, Crewe, UK). This process allowed the calculation of N flows coming from N uptake or from N mobilization in the different organs.

2. Model description

Data coming from the field experiment were used to elaborate a thermal time (base 4°C) step model able to simulate dynamics of N allocation and mobilization at the whole plant level on the basis of the contribution of exogenous N taken up (^{15}N labelled) and the endogenous N remobilized from the vegetative parts in *Brassica napus* L.. Briefly, data used for this modelling approach were at a given thermal time: total N content, N content derived from uptake during seven days of labelling and unlabelled N content that was derived from either previous N uptake or internal N cycling. The labelling method used under field conditions allowed an accurate assessment of the relative allocation of ^{15}N within the plant (*i.e.* ^{15}N amount in one given tissue/ ^{15}N amount in plant). However, because of $^{15}\text{NO}_3^-$ can be diluted to variable extent in soil N, N uptake cannot be estimated directly. Therefore, total N

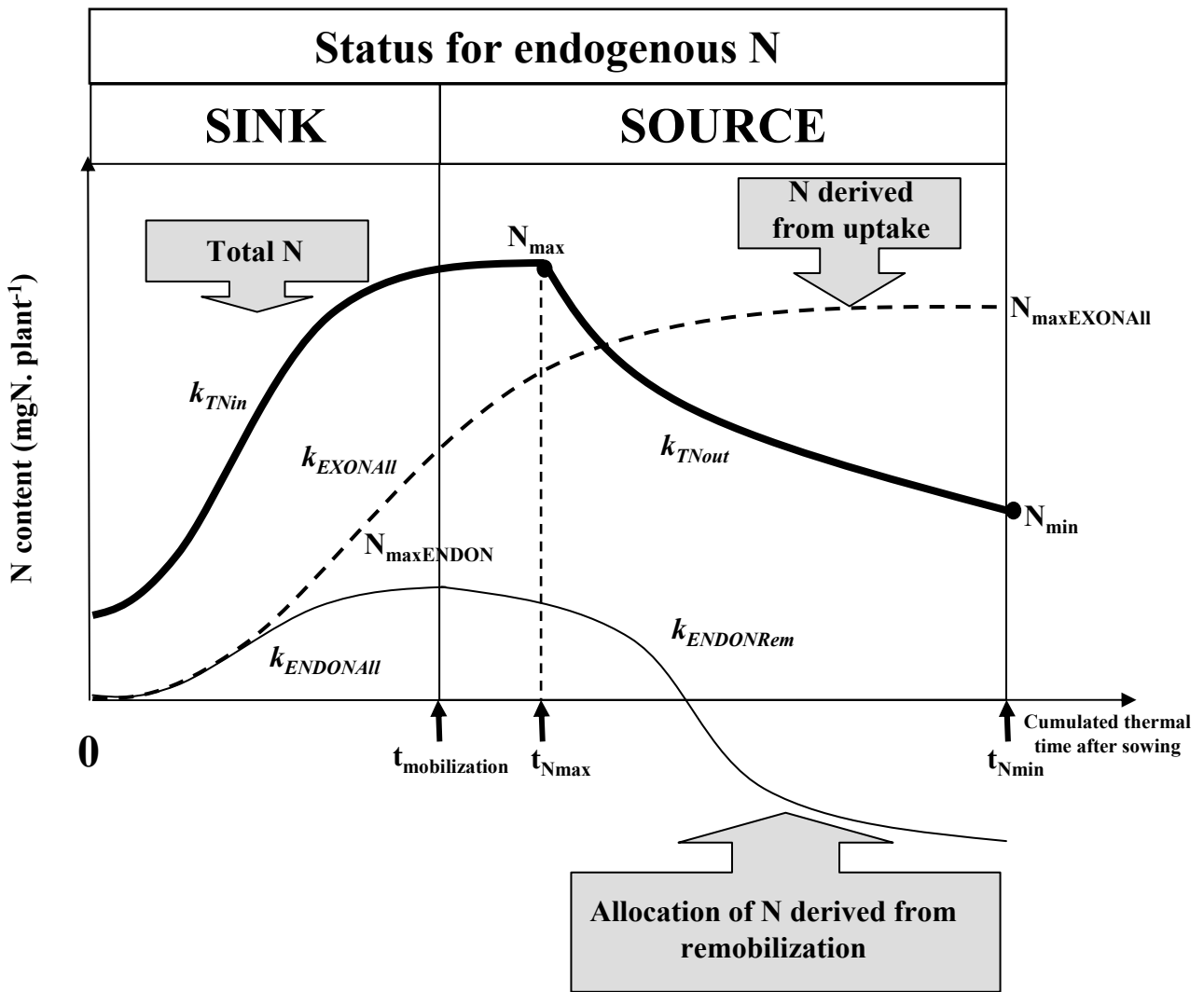


Figure V. 1 : Description of N dynamics in each organ during source/sink transition by parameters characterizing N allocation and N mobilization. $t_{N_{\text{max}}}$ and $t_{N_{\text{min}}}$: time when total N content ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$) is maximal and minimal, respectively; N_{max} and N_{min} : maximal and minimal total N content value ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$); $k_{TN_{\text{in}}}$ and $k_{TN_{\text{out}}}$: slope of equations characterizing N allocation and N mobilization ($^{\circ}\text{Cdays}^{-1}$); k_{EXONAI} , $k_{ENDONAI}$ and $k_{ENDONRem}$: slope of equations characterizing ^{15}N allocation, endogenous N allocation and mobilization, respectively; $N_{\text{maxEXONAI}}$: maximal N content derived from N uptake; N_{maxENDON} : maximal N content derived from mobilization; $t_{\text{mobilization}}$: time when endogenous N mobilization starts.

Figure V. 1 : Description de la dynamique de l'azote pendant la transition puits/source par des paramètres caractérisant l'allocation et la remobilisation de l'azote dans chaque organe. $t_{N_{\text{max}}}$ et $t_{N_{\text{min}}}$: date pour laquelle la quantité en azote totale est respectivement maximale et minimale ($^{\circ}\text{Cjours}$); N_{max} et N_{min} : quantité maximale et minimale en azote total ($\text{mg} \cdot \text{plante}^{-1}$); $k_{TN_{\text{in}}}$ et $k_{TN_{\text{out}}}$: constantes de vitesse d'allocation et de remobilisation de l'azote total dans les divers organes ($\times 10^{-3}^{\circ}\text{Cdays}^{-1}$); k_{EXONAI} , $k_{ENDONAI}$ et $k_{ENDONRem}$: constantes de vitesse caractérisant respectivement l'allocation de l'azote absorbé (^{15}N), l'allocation et la remobilisation de l'azote endogène dans les divers organes ($\times 10^{-3}^{\circ}\text{Cdays}^{-1}$); $N_{\text{maxEXONAI}}$: quantité maximale d'azote issu de l'absorption accumulée ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$); N_{maxENDON} : quantité maximale d'azote issu de la remobilisation accumulée ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$); $t_{\text{mobilization}}$: Date à partir de laquelle la remobilisation de l'azote endogène commence.

in plant , resulting from N accumulation in all the tissues, could be fitted to a logistic equation ($dN/dt=6.38.10^{-3} \times N \times (1-N/1258.41)$; $n=18$; $r^2=0,92$), and this allowed the calculation of total N taken up at weekly interval. Then, the allocation of total N derived from uptake to a given tissue was calculated as the product of N taken up weekly by the allocation of N derived from uptake to this given tissue. Finally, the remobilization of N from or to a given tissue can be calculated as the difference between changes in total N content minus the amount of N allocated from uptake.

3. Modelling total N in each tissue (Figure V.1)

Experimental data collected in field conditions allowed to describe the total N pattern in each organ as a succession of two phases: apparent accumulation, when the organ was a sink, and remobilization of total N, when the organ was a source. The following logistic equation ($dN/dt= k_{TNin} \times N \times (1-N/N_{max})$) (Eqn 1) where k_{TNin} and N_{max} are the allocation rate constant ($^{\circ}Cdays^{-1}$) and the maximal total N (mg. plant⁻¹), respectively) was fitted to experimental data during increase of N content in one tissue, until it reached N_{max} . When N content progressively decreased (tissues that act at a given time with source behaviour such as leaves, taproots, stems, flowers), data were fitted to an exponential equation ($dN/dt=-k_{TNout} \times N$) (Eqn 2) where k_{TNout} is the remobilization rate constant ($^{\circ}Cdays^{-1}$). It must keep in mind, that this decrease of N, for example, in leaves represents apparent N mobilization (*i.e.* balance between allocation of N from uptake or from mobilization of N from other tissues minus mobilization of N to other tissues). N accumulation started when organ appeared and stopped when total N content reached the maximal N value (t_{Nmax} , $^{\circ}Cdays$). Apparent remobilization of total N started from t_{Nmax} and stopped when organ disappeared (t_{Nmin} , $^{\circ}Cdays$; leaf drop or final harvest).

4. Allocation of N derived from uptake (Figure V.1)

Experimental data of dry weight and N content in each tissue were submitted to polynomial regression to minimize variation between each harvest date. Then, N uptake was estimated by the difference of the plant N content between two harvest times, based on the logistic equation obtained. ¹⁵N labelling allowed to determine the partitioning of N taken up between the different organs. Consequently, cumulated N flow derived from uptake in each organ could be fitted with a logistic equation ($dN/dt= k_{EXONAll} \times N \times (1-N/N_{maxEXONAll})$) (Eqn

Cumulative thermal time after sowing (°Cdays)	Dynamic of N flow from uptake and mobilisation in each organ	Status for endogenous N
$t \leq t_{\text{mobilization}}$	<p>N derived from uptake →</p> <p>N mobilized →</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> N_{tot} </div>	sink
$t_{\text{mobilization}} < t \leq t_{\text{Nmax}}$	<p>N derived from uptake →</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> N_{tot} </div> <p style="text-align: center;">N taken up > N mobilized</p> <p>N mobilized →</p>	source
$t_{\text{Nmax}} < t$	<p>N derived from uptake →</p> <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> N_{tot} </div> <p style="text-align: center;">N taken up < N mobilized</p> <p>N mobilized →</p>	source

Figure V. 2: Timing of changes in source-sink relationships in different tissues in *Brassica napus* L. during its growth cycle and balance of associated N flows.

Figure V. 2: Chronologie de la modification du statut source/puits pour l'azote (et des flux associés) dans les différents organes chez *Brassica napus* L..

3) where $k_{EXONAll}$ is the allocation rate constant of N taken up ($^{\circ}Cday^{-1}$) and $N_{maxEXONAll}$ is the maximum N taken up allocated to each organ ($mg\ N.\ plant^{-1}$).

5. Allocation of N flow derived from endogenous mobilization (Figure V.1)

The endogenous N flow was calculated as the difference between the N from the total N flow and the N from ^{15}N labelling. The transition from sink to source of each organ was determined as the start of endogenous N remobilization ($t_{mobilization}$, $^{\circ}Cdays$) (Figure V.2).

The cumulative incoming endogenous N flows was fitted with a logistic equation ($dN/dt = k_{ENDONAll} \times N \times (1 - N/N_{maxENDON})$) (Eqn 4) where $k_{ENDONAll}$ ($^{\circ}Cday^{-1}$) is the allocation rate constant ($^{\circ}Cdays^{-1}$) for incoming endogenous N flows and $N_{maxENDON}$ is the maximum N remobilized from sources tissues allocated to each organ ($mg\ N.\ plant^{-1}$). Endogenous N remobilization started at $t_{mobilization}$ ($^{\circ}Cdays$). As cumulative outgoing endogenous N flows reached negative values, these flows were positively cumulated from the $N_{maxENDON}$ and a logistic equation was fitted $dN/dt = k_{ENDONMob} \times N \times (1 - N/N_{maxENDON} + |Cumulative\ endogenous\ outgoing\ N\ flow|)$ (Eqn 5) where $k_{ENDONMob}$ ($^{\circ}Cday^{-1}$) is a remobilization rate constant ($^{\circ}Cdays^{-1}$) for outgoing endogenous N flows.

When organ (i) had a source status, the outgoing endogenous N flow (i) supplied an endogenous N pool circulating at the whole plant level (Figure V.3). From simple calculations of N derived from mobilization, this pool can be dynamically evaluated and can be considered as amino-acids transported through phloem vessels. However, some N taken up can be reduced in the roots, and the resulting amino acids can be loaded in xylem vessels. As xylem-phloem exchange of amino-acids may occur, the total amount of amino acids cycling in the plant was also calculated on the basis of either 20 or 40 % of N taken up being reduced in the roots. This provides two extra hypotheses that can be tested for down regulation of nitrate uptake by cycling amino-acids.

This pool of circulating amino acids was partitioned between sink organs as a function of the partitioning coefficient defined below:

$$N\ partitioning\ coefficient\ (\%) = \frac{\text{Incoming endogenous N flow in organ (i)}}{\sum_{i=1}^n \text{outcoming N flow from source organ (i)}} \times 100$$

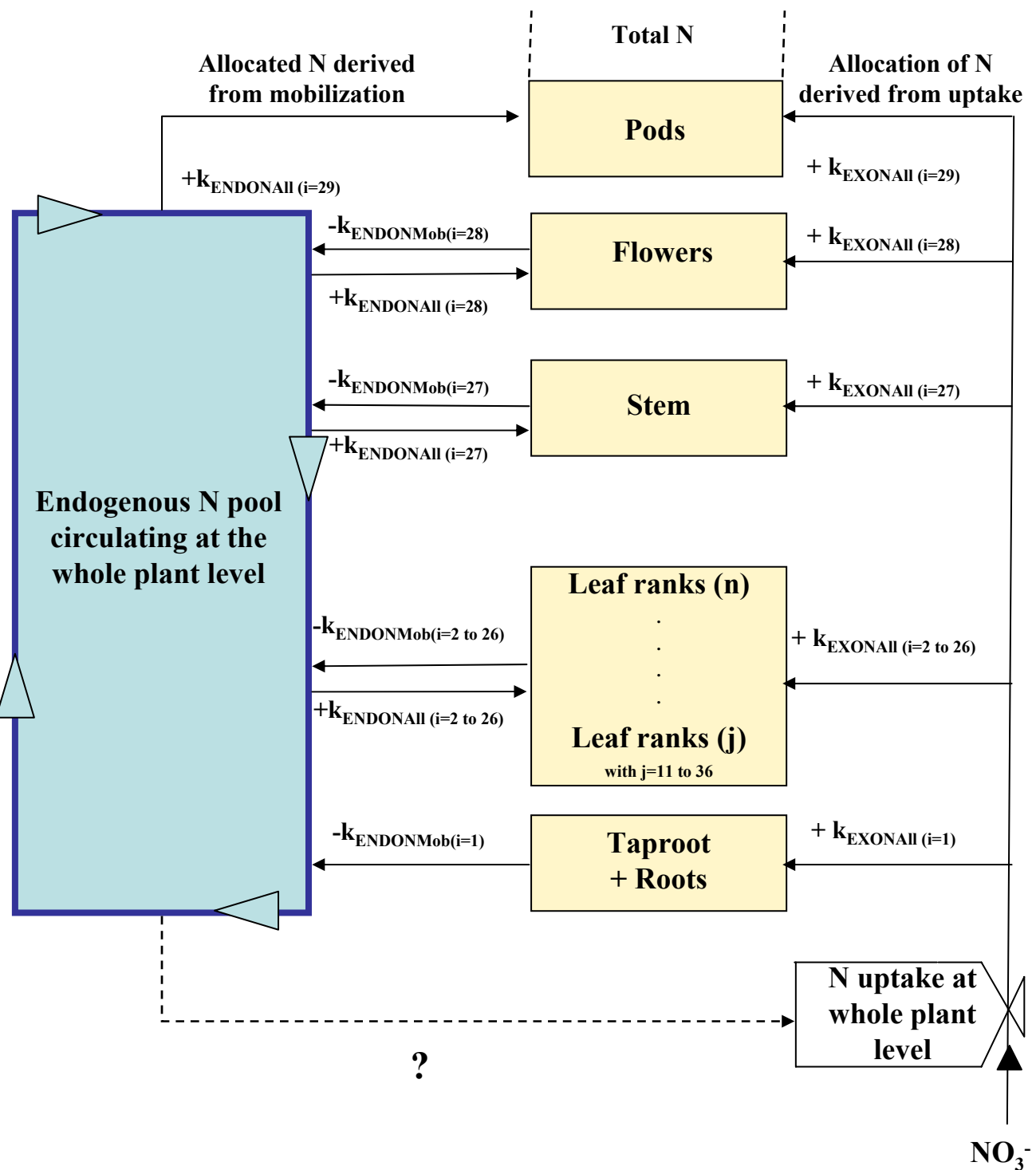


Figure V. 3 : Conceptual overview of the proposed compartmental model used for dynamic calculation of N flows during the growth cycle of *Brassica napus* L.. Model is made up of i organs (ranging from 1 to 29) and j leaf ranks (numbered from 11 to 36).

Figure V. 3 : Synoptique conceptuel du modèle compartimental utilisé pour simuler la dynamique de l'azote chez *Brassica napus* L. de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Le modèle est constitué de i organes (numérotés de 1 à 29) et de j rangs foliaires (numérotés de 11 à 36).

6. Assumptions of the model

It was assumed that each organ acts as a compartment able to store and mobilize N, therefore acting successively as a source and as a sink (except for pods, which have a permanent sink status). In sink organs, N accumulation was controlled by both N uptake and endogenous N coming from source tissues (Figure V.2). During N mobilization, mobilized endogenous N was calculated as the difference between the allocated N taken up and the pattern of total N (Figure V.1). Therefore, the amount of mobilized endogenous N was controlled by crop morphology (biomass) and N status (N%) and hence, total N dynamics was defined by parameters characterizing either organ size and N status (N_{\max} , N_{\min}) or source's ability to mobilize N (k_{TNout}).

In this model, no transport process was taken into account. This assumption is in good agreement with the conclusion of Bancal and Soltani (2002) that assimilate partitioning may be modelled without taking hydraulic resistances into account.

The model was built using Model Maker software (Cherwell Scientific).

7. Description of simulations

To investigate pathways to improve N use efficiency and, subsequently, to increase amount of N allocated to the pods, different parameter values were used to improve N recycling within the plant. In particular, we looked at the key parameters N_{\min} and $t_{N\min}$ which could lead to an increase of N mobilization from source tissues and/or of N accumulation in sink tissues, in order to identify physiological key processes that may be improved genetically or optimized by adapted agronomic practices. The compartmental analysis of N flows provides for a given simulation the quantitative consequences for other tissues, according to their current source or sink status. Leaves at the bottom of the canopy (LR11-21) were characterized by high values of total N content (averaging 2.5-3 %) at the drop and a short duration of N mobilization. Consequently, simulations were elaborated and tested using the model in order to reduce N loss by leaf drop. The 3 reported simulations correspond to:

- Simulation 0 (S0): model output obtained from field data.
- Simulation 1 (S1): The parameter N_{\min} in LR11-21 was integrated in the model such as the final N content was equal to 1 % DW at the drop of the leaves because this N

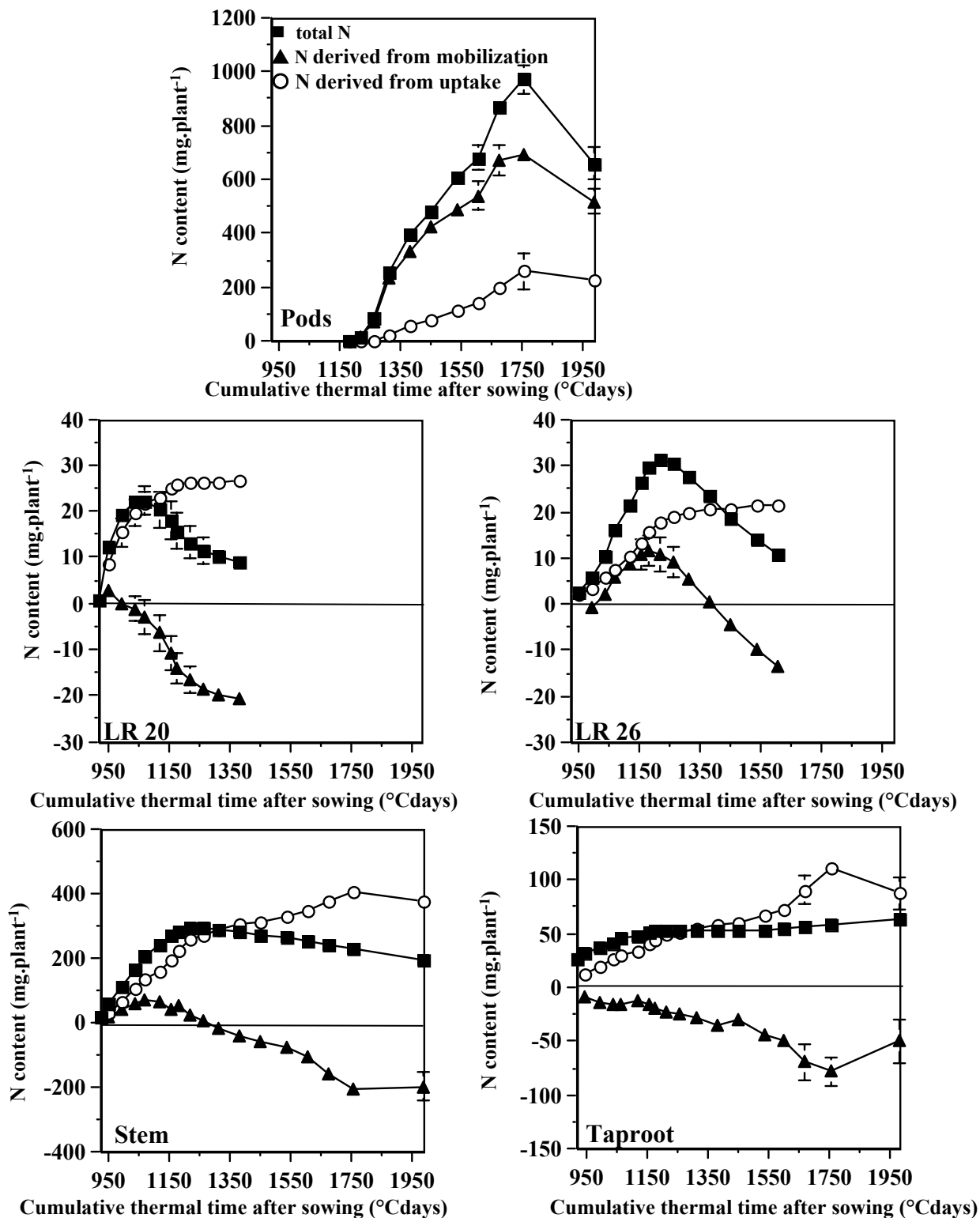


Figure V. 4 : Cumulated total N contents in different tissues of *Brassica napus* L. (pods, Leaf Rank 20, Leaf Rank 26, stem and taproot), and N content derived from uptake or from mobilization. Vertical bars indicate \pm SE of the mean for n=3, when larger than the symbol.

Figure V. 4 : Evolution cumulée de la quantité en azote total, en azote issu de l'absorption et de la remobilisation dans les siliques, les rangs de feuilles 20 et 26, dans la hampe et dans le pivot chez *Brassica napus* L. Chaque barre représente l'écart-type à la moyenne pour n=3, lorsqu'elle est plus grande que le symbole.

- concentration value corresponds to the common value found in fallen leaves of the most cultivated crop species.
- Simulation 2 (S2): The duration of the N mobilization in these leaves was increased such that all leaves dropped simultaneously (*i.e.* at 1604.3°Cdays: Malagoli *et al.* 2004b). In this case, the value of N_{\min} was modified as in S1.
- Simulation 3 (S3): N_{\min} values were set for all leaf ranks to 1 % DW with a leaf drop at 1064.3°Cdays, while N_{\min} value for stem was set to 0.7 % DW. In these different simulations, N uptake was considered as unchanged from bolting to harvest. Consequently, dynamics of endogenous N was only investigated. Several authors suggested that N transfer to the pods can be improved by increasing endogenous N allocation in the transient storage tissues (*i.e.* LR22-36, stem and flowers) and by a better synchronization between the period of source N mobilization and the pod N filling. Consequently, N_{\max} values of the source tissues were increased for the different simulations, according to the balance of N for each tissue.

C. Results

1. Nitrogen flows in different tissues and deduced parameters

Experimental data for N flows, obtained by the distribution of ^{15}N in different tissues showed that up to 70% of N in pods (about 700 mg N per plant) was derived from internal cycling of N, the rest being directly derived from concurrent N uptake (Figure V.4).

Stems were showing a source behaviour from 1119.5 °Cdays onwards, and accounted for about 300 mg mobilized N per plant at maturity. The sink /source transition of taproot, occurred previously but it accounted for less than 75 mg. Moreover, it must be pointed out for these two organs, that while their contribution to endogenous N mobilization was highly significant, as they accounted for nearly 50% of endogenous N allocated directly or indirectly to pods, their total N content (reflecting apparent N mobilization) either slightly decreased (stem) or remained stable (taproot) after 1150 °Cdays (Figure V.4).

All leaf ranks subsequently accounted for nearly half of N that was mobilized to reproductive tissues. However, the kinetics, and the amplitude of their contributions varied according to leaf ranks (Figure V.4). For example, N allocated to LR 20 was mostly derived from N uptake, while for LR 26, nearly half of its maximum N content was derived from the

allocation of N mobilized from lower leaf ranks and/or from the stem. In both leaf ranks, total N content decreased significantly, illustrating an apparent mobilization of N. However, mobilization of N from these leaves, as estimated by ^{15}N labelling, occurred slightly before N reached its maximum value. (*i.e.* $t_{\text{mobilization}} < t_{\text{Nmax}}$, Figures V.1 and V.4).

The results for LR 20 and LR 26 support the fitting of a logistic regression up to N_{max} and of a negative exponential curve from N_{max} to N_{min} , as proposed in figure V.1. Kinetic parameters which describe N flows in all compartments are given in Table V.I for total N, and in Table V.II for N derived from uptake or from remobilization.

The slope of total N allocation in each leaf rank (k_{TNin} , Table V.I) decreased with leaf rank, being in the range of $42.15\text{-}78.58 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$ for LR11-17, and then follows a more progressive nearly linear decline from LR 18 ($31.18 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$) to LR 36 ($20.05 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$). In the meantime, the N_{max} values, corresponding to the maximum N content per leaf expressed in mg.plant^{-1} , were more variable, and this was due mostly to differences in leaf size. However, if N content was calculated per cm^2 , mostly two groups of leaves behave differently. LR13-22 contained about 0.45 mgN.cm^{-2} , while LR 23-31 reached only $0.25 \text{ mg N.cm}^{-2}$. The slope of apparent N mobilization (k_{TNout} , Table V.I) decreased with increasing leaf rank. The minimal N content in leaves, that corresponded to N that remained in the leaves when they dropped, was also highly variable, depending on the leaf size, but also on the ability of the leaf to remobilize nitrogen. Expressed per cm^2 , or per g DW, it appeared again that two groups of leaves behave differently. The minimum leaf N% was approximately 2.5 % DW for LR 11-21, but only 1.8 % DW for LR 22-36.

N mobilization accounted for 73% and 60% of N contents in pods and flowers, respectively (Table V.II). Similarly, all leaf ranks received N from either direct uptake or from endogenous N mobilization, but their respective contributions depended on leaf rank. Lowerleaf ranks had a higher contribution of N derived from direct uptake. If the ratio $N_{\text{maxENDON}}/(N_{\text{maxENDON}}+N_{\text{maxEXONall}})$ is taken as the relative contribution of remobilized N to total N content, the contribution of remobilization increased from 8-9 % in LR 21-23 to 40 % in LR 27, with a maximum of 48-63 % in LR 33-36. Similarly, the slope of the logistic curve describing the allocation of exogenous N (k_{EXONall} , Table V.II) decreased with leaf rank, whereas k_{ENDONall} remained relatively constant between 29.81 to $25.09 \times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$ for LR 21 and LR 35, respectively.

Table V. I. Mathematical description of total N fluxes in different organs. k_{TNin} and k_{TNout} : slope of equations characterizing N allocation and N apparent mobilization in the different organs ($\times 10^{-3} \text{Cdays}^{-1}$); N_{max} and N_{min} : maximal and minimal N content in organ (mg.plant^{-1}); t_{Nmax} and t_{Nmin} : time when organ reaches N_{max} and N_{min} , respectively ($^{\circ}\text{Cdays}$). Number between brackets corresponds to the cited equations below [Eqn (1)]: $dN/dt = k_{TNin} \times N \times (1 - N/N_{max})$; [Eqn (2)]: $dN/dt = -k_{TNout} \times N$.

Table V. I. Description mathématique des flux apparents d'azote total. k_{TNin} et k_{TNout} : constantes de vitesse d'allocation et de remobilisation de l'azote total dans les divers organes ($\times 10^{-3} \text{Cdays}^{-1}$); N_{max} et N_{min} : quantité maximale et minimale d'azote dans chaque organe (mg.plant^{-1}); t_{Nmax} and t_{Nmin} : date pour laquelle la quantité en azote total est respectivement maximale (N_{max}) et minimale (N_{min}) ($^{\circ}\text{Cdays}$). Les chiffres entre parenthèses désignent les équations suivantes: [Eqn (1)]: $dN/dt = k_{TNin} \times N \times (1 - N/N_{max})$; [Eqn (2)]: $dN/dt = -k_{TNout} \times N$.

	k_{TNin}	N_{max}	k_{TNout}	N_{min}	t_{Nmax}	t_{Nmin}
Pods	14.25 ⁽¹⁾	970.45	-	-	-	-
Flowers	24.09 ⁽¹⁾	147.24	11.17 ⁽²⁾	10.8	1217.3	1382
Stem	27.88 ⁽¹⁾	292.7	0.57 ⁽²⁾	193.31	1260.1	1982.6
Taproot	9.26 ⁽¹⁾	53.72	-	-	1982.6	-
LR 36	20.05 ⁽¹⁾	1.67	4.42 ⁽²⁾	0.46	1312.4	1604.3
LR 35	20.66 ⁽¹⁾	1.8	1.87 ⁽²⁾	1.04	1312.4	1604.3
LR 34	18.69 ⁽¹⁾	3.36	1.77 ⁽²⁾	2	1312.4	1604.3
LR 33	19.41 ⁽¹⁾	4.34	2.51 ⁽²⁾	2.08	1312.4	1604.3
LR 32	19.87 ⁽¹⁾	8.55	2.74 ⁽²⁾	3.84	1312.4	1604.3
LR 31	20.68 ⁽¹⁾	10.88	2.23 ⁽²⁾	5.04	1260.1	1604.3
LR 30	18.03 ⁽¹⁾	14.82	2.10 ⁽²⁾	7.19	1260.1	1604.3
LR 29	19.50 ⁽¹⁾	22.27	2.43 ⁽²⁾	9.63	1260.1	1604.3
LR 28	19.49 ⁽¹⁾	28.63	2.81 ⁽²⁾	10.85	1260.1	1604.3
LR 27	20.31 ⁽¹⁾	30.88	2.81 ⁽²⁾	10.4	1217.3	1604.3
LR 26	20.52 ⁽¹⁾	31.37	2.80 ⁽²⁾	10.6	1217.3	1604.3
LR 25	20.83 ⁽¹⁾	30.69	2.96 ⁽²⁾	9.74	1217.3	1604.3
LR 24	25.77 ⁽¹⁾	26.73	2.67 ⁽²⁾	8.04	1155.9	1604.3
LR 23	22.86 ⁽¹⁾	21.44	2.63 ⁽²⁾	6.57	1155.9	1604.3
LR 22	26.98 ⁽¹⁾	19.47	2.26 ⁽²⁾	5.82	1119.5	1604.3
LR 21	20.68 ⁽¹⁾	20.08	2.26 ⁽²⁾	9.85	1067.1	1382
LR 20	22.86 ⁽¹⁾	22.2	2.82 ⁽²⁾	9.13	1067.1	1382
LR 19	28.60 ⁽¹⁾	18.98	3.29 ⁽²⁾	7.92	995.1	1217.3
LR 18	31.18 ⁽¹⁾	24.32	6.45 ⁽²⁾	12.36	1037	1217.3
LR 17	42.15 ⁽¹⁾	21.72	7.06 ⁽²⁾	5.97	995.1	1178
LR 16	42.99 ⁽¹⁾	24.52	5.42 ⁽²⁾	10.26	995.1	1155.9
LR 15	43.49 ⁽¹⁾	23.08	8.97 ⁽²⁾	6.05	995.1	1119.5
LR 14	43.53 ⁽¹⁾	21.23	7.26 ⁽²⁾	12.59	995.1	1067.1
LR 13	78.58 ⁽¹⁾	23.61	16.59 ⁽²⁾	7.15	948.9	1067.1
LR 12	78.50 ⁽¹⁾	24.3	19.66 ⁽²⁾	10.66	948.9	1037
LR 11	43.53 ⁽¹⁾	9.79	7.40 ⁽²⁾	7.18	995.1	1037

2. Endogenous amino-acids pool circulating at the whole plant level and relationships with current N uptake

One of the main outputs of the compartmental analysis of N flows was an estimate of the cycling pool of amino-acids derived from mobilization (Figure V.5). Because of reduction of mineral N in the roots, this pool can be incremented by amino-acids that are synthesized in the roots and can be transported N by the phloem in shoots. Because xylem-phloem amino-acids exchange can occur, two simulations were performed assuming that either 20 % or 40 % of N taken up could be reduced and further assimilated into amino-acids, before being loaded into xylem vessels. This modification of the amino-acids circulating pool, together with changes in root mineral N uptake is shown in figure V.5. The highest amounts of amino-acids recycled in the plant were found around 1325°Cdays (after flowering), without any effect of amino-acids derived from root assimilation of mineral N. Although at this time N uptake was at its lowest level, no clear relationship between the amount of cycling amino-acids and regulation of N uptake was found. However, during vegetative growth (before 1100°Cdays), the root N uptake remained to relatively high level, but remobilization of N was very low, although amino-acids cycling could be increased with increasing contribution of the roots to amino-acids synthesis and transport. From bolting to flowering, N uptake decreased from 5.5 to 0.9 mg N. °Cdays⁻¹.plant⁻¹ whereas endogenous N flow remobilized from vegetative tissues slightly increased (from 0.4 to 3.1 mg N. °Cdays⁻¹.plant⁻¹). The start of N pod filling was marked by an increased remobilization from the source tissues before decreasing until harvest. N uptake only increased from the pod mid-filling. No correlation was found between N uptake and the cycling endogenous N pool at the whole plant level, and this may be due to other regulations that may have occurred simultaneously.

3. Which processes to improve in order to increase pod N filling?

Different values for input parameters were used to simulate their effects on improved N recycling within the plant by increasing the amount of N allocated to pods while reducing the amount of N left in fallen leaves. Hence, values of potential key parameters (N_{\min} and $t_{N\min}$) likely to increase N mobilization from source tissues and/or N accumulation in sink tissues, were modified. Leaves at the bottom of the canopy (LR 11-21) were characterized by high N concentrations (averaging 2.5-3 % DW) at the drop and a short duration of N mobilization

Table V. II. Mathematical description of N fluxes from uptake and remobilization in different organs. k_{EXONAI} , $k_{ENDONAI}$ and $k_{ENDONMOB}$: slope of equations characterizing ^{15}N allocation, endogenous N allocation and mobilization in the different organs ($\times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$), respectively; $N_{\max EXONAI}$: maximal N content derived from N uptake (mg.plant^{-1}); $N_{\max ENDON}$: maximal N content derived from mobilization in each organ (mg.plant^{-1}). Number between brackets corresponds to the cited equations below : [Eqn (3)] $dN/dt = k_{EXONAI} \times N \times (1 - N/N_{\max EXONAI})$; [Eqn (4)] $dN/dt = k_{ENDONAI} \times N \times (1 - N/N_{\max ENDON})$; [Eqn (5)] $dN/dt = -k_{ENDONMOB} \times N \times (1 - N/(N_{\max ENDON} + \text{Cumulated endogenous outcoming N flow}))$.

Table V. II. Description mathématique des flux d'azote associés à l'absorption ou issus de la remobilisation des différents organes. k_{EXONAI} , $k_{ENDONAI}$ et $k_{ENDONMOB}$: constantes de vitesse caractérisant respectivement l'allocation de l'azote absorbé (^{15}N), l'allocation et la remobilisation de l'azote endogène dans les divers organes ($\times 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{Cdays}^{-1}$); $N_{\max EXONAI}$: quantité maximale d'azote issu de l'absorption accumulée (mg.plant^{-1}); $N_{\max ENDON}$: quantité maximale d'azote issu de la remobilisation accumulée (mg.plant^{-1}). Les chiffres entre parenthèses désignent les équations suivantes: [Eqn (3)] $dN/dt = k_{EXONAI} \times N \times (1 - N/N_{\max EXONAI})$; [Eqn (4)] $dN/dt = k_{ENDONAI} \times N \times (1 - N/N_{\max ENDON})$; [Eqn (5)] $dN/dt = -k_{ENDONMOB} \times N \times (1 - N/(N_{\max ENDON} + \text{Cumulated endogenous outcoming N flow}))$.

	N derived from uptake		N derived from mobilization		
	k_{EXONAI}	$N_{\max EXONAI}$	$k_{ENDONAI}$	$N_{\max ENDON}$	$k_{ENDONMOB}$
Pods	12.45 ⁽³⁾	259.3	7.53 ⁽⁴⁾	694.69	-
Flowers	19.31 ⁽³⁾	62.3	10.13 ⁽⁴⁾	93.99	3.82 ⁽⁵⁾
Stem	9.12 ⁽³⁾	375.09	22.35 ⁽⁴⁾	72.35	15.56 ⁽⁵⁾
Taproot	7.70 ⁽³⁾	87.66	-	-	0.89 ⁽⁵⁾
LR 36	18.37 ⁽³⁾	0.53	10.33 ⁽⁴⁾	0.91	16.44 ⁽⁵⁾
LR 35	19.14 ⁽³⁾	0.806	25.09 ⁽⁴⁾	1.11	16.59 ⁽⁵⁾
LR 34	12.25 ⁽³⁾	1.29	23.22 ⁽⁴⁾	1.57	16.65 ⁽⁵⁾
LR 33	12.41 ⁽³⁾	2.09	24.17 ⁽⁴⁾	1.98	10.56 ⁽⁵⁾
LR 32	13.09 ⁽³⁾	4.34	24.17 ⁽⁴⁾	3.50	18.02 ⁽⁵⁾
LR 31	13.48 ⁽³⁾	6.25	25.14 ⁽⁴⁾	4.63	9.75 ⁽⁵⁾
LR 30	13.97 ⁽³⁾	9.3	24.07 ⁽⁴⁾	2.17	16.47 ⁽⁵⁾
LR 29	14.32 ⁽³⁾	13.05	25.91 ⁽⁴⁾	8.08	11.57 ⁽⁵⁾
LR 28	14.50 ⁽³⁾	16.26	26.01 ⁽⁴⁾	13.12	12.41 ⁽⁵⁾
LR 27	14.96 ⁽³⁾	21.06	27.34 ⁽⁴⁾	14.14	7.19 ⁽⁵⁾
LR 26	15.17 ⁽³⁾	21.42	27.15 ⁽⁴⁾	12.26	10.81 ⁽⁵⁾
LR 25	15.07 ⁽³⁾	21.82	27.36 ⁽⁴⁾	9.31	12.43 ⁽⁵⁾
LR 24	15.80 ⁽³⁾	22.49	28.66 ⁽⁴⁾	8.46	13.04 ⁽⁵⁾
LR 23	15.70 ⁽³⁾	18.84	26.05 ⁽⁴⁾	1.87	15.39 ⁽⁵⁾
LR 22	16.44 ⁽³⁾	25.11	29.62 ⁽⁴⁾	2.68	8.7 ⁽⁵⁾
LR 21	17.46 ⁽³⁾	26.8	29.81 ⁽⁴⁾	2.32	21.16 ⁽⁵⁾
LR 20	17.44 ⁽³⁾	26.48	-	-	21.32 ⁽⁵⁾
LR 19	22.08 ⁽³⁾	22.81	-	-	23.04 ⁽⁵⁾
LR 18	26.83 ⁽³⁾	26.36	-	-	22.66 ⁽⁵⁾
LR 17	16.62 ⁽³⁾	21.51	-	-	22.79 ⁽⁵⁾
LR 16	23.08 ⁽³⁾	21.43	-	-	22.99 ⁽⁵⁾
LR 15	22.20 ⁽³⁾	21.32	-	-	23.02 ⁽⁵⁾
LR 14	34.85 ⁽³⁾	13.35	-	-	21.58 ⁽⁵⁾
LR 13	23.32 ⁽³⁾	12.74	-	-	23.78 ⁽⁵⁾
LR 12	26.76 ⁽³⁾	13.68	-	-	28.09 ⁽⁵⁾
LR 11	17.42 ⁽³⁾	3.03	-	-	26.90 ⁽⁵⁾

(Malagoli *et al.*, 2004b). Therefore, three scenarios for reducing N loss by leaf drop were simulated. The parameter N_{\min} in LR11-21 was integrated in the model such as the final N content was equal to 1 % DW at the drop of the leaves (simulation S1). Then, the duration of the N mobilization in these leaves was increased such as all leaves dropped simultaneously (*i.e.* at 1604.3°Cdays), while leaving N_{\min} as in S1 (simulation S2). In the next simulation (S3), the two previous modifications were combined (*i.e.* final N content at 1% DW all leaf ranks and increased duration of N mobilization of LR11-36) with the assumption that N uptake was unchanged from bolting to harvest. Consequently, only the dynamics of endogenous N was investigated. But given that the amount of N at $t_{N_{\max}}$ may change, the value of $k_{TN_{\text{out}}}$ was recalculated simultaneously for each simulation in each compartment to reach the same fixed N_{\min} values.

All N flows from endogenous mobilization, calculated from the model for the three different simulations, are presented in Figure V.6. Decreasing the remaining N% in lower leaf rank (LR11-21), lead to an increased remobilization from these leaves of 36 mg N. plant⁻¹, and a reduction of 30% in the amount of N that may be released in the soil by leaf drop (32.5 kg N.ha⁻¹ for S1 instead of 45 kg N.ha⁻¹ for S0). This would also increase the amount of endogenous N allocated to LR22-36, the stem and flowers, and subsequently its storage or metabolic use, and its remobilization later. Based on a grain yield for this experiment in the range of 3.6 t.ha⁻¹ (estimated from the entire plot) to 8.2 t.ha⁻¹ (estimated from individual plant harvest), this would, for the same DW yield, increase grain N content from 3.18 % (S0, Table V.III) to 3.49 and 3.34 % DW, respectively. On the other hand, if grain N% contents maintained constant to 3.18 % DW, then the grain yield would increase by 9.7 % and 5 %, respectively (S1, Table V.III). In the second simulation (S2, Figure V.6), consisting in increasing the LR 11-21 lifespan, the mobilization potential was increased (+36 mgN.plant⁻¹) but to a lesser extent compared to S1 (Table V.III), with finally a small increase in N content for constant yield, or a slightly higher yield if grains keep the same N content (Table V.III). The last simulation (S3, Figure V.6) combining partly the two previous one, longer life span for LR 11-21 with a minimal N content of 1% DW for all leaf ranks, gave more surprising results. Although the remobilization of N from LR11-21 leaves increased by 36 mg.plant⁻¹ (Figure V.6), this had a negative effect on LR22-36 as they remobilized less N, mostly because they received a lower amount of N from LR11-21, which was directly allocated to pods (effect of longer leaf lifespan and delayed remobilization with direct allocation to the pods). In this simulation, yields or N% DW of the seeds were increased as compared to simulation S0 (Table V.III).

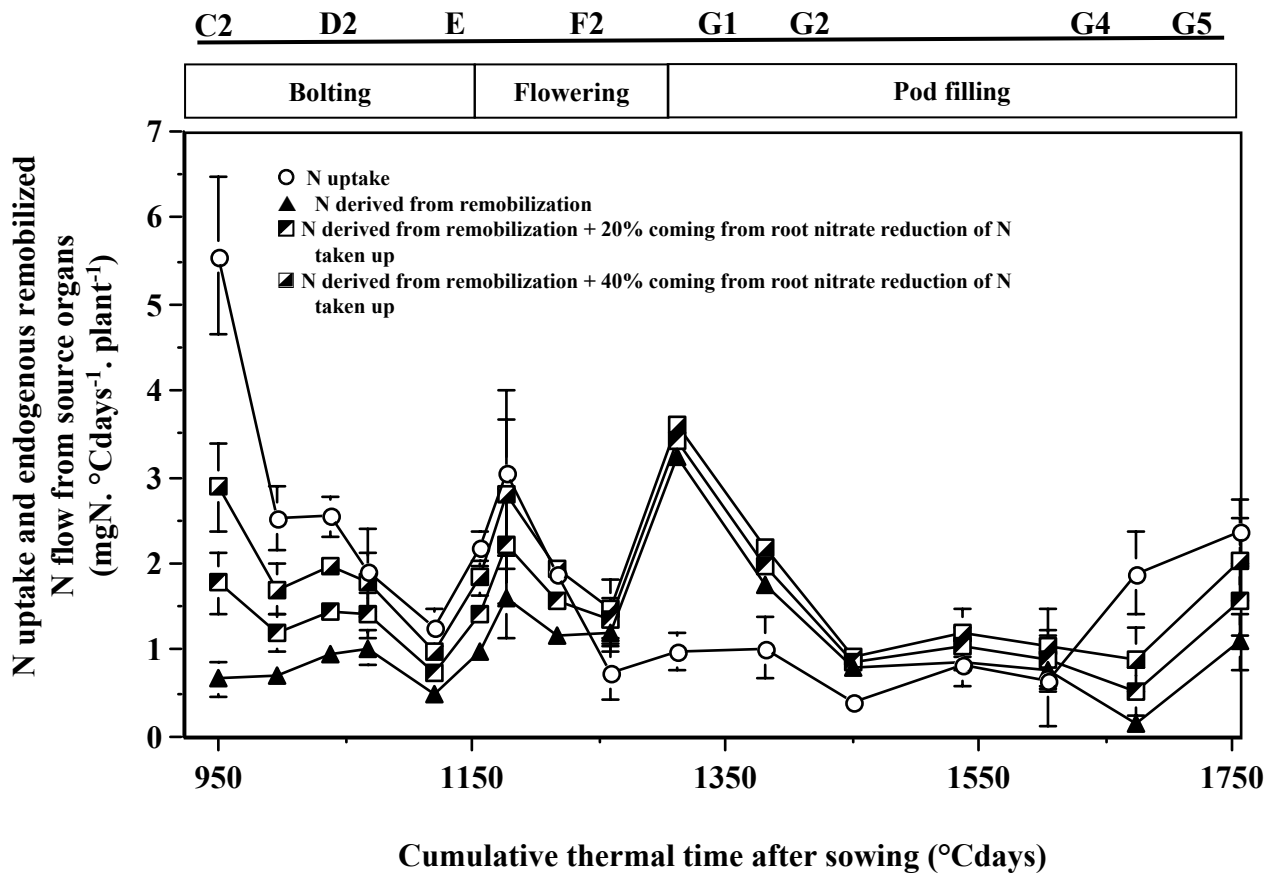


Figure V. 5: Changes of mineral N uptake by *Brassica napus* L. during the growth cycle and of amino-acid cycling pool at the whole plant level, estimated strictly from mobilization of endogenous N, or by considering that either 20% or 40% of N taken up is reduced in the roots, and these resulting amino acids increase the cycling amino acid pool.

Figure V. 5: Co-évolution de l'absorption de l'azote et du pool d'azote endogène libre circulant à l'échelle de la plante entière chez *Brassica napus* L.. Ce pool est la somme de la quantité d'azote remobilisé à partir de tous les organes sources à un moment donné pour lequel 20 ou 40% de l'azote issu de l'absorption ont été réduits et ajoutés.

D. Discussion

Aim of this study was to develop a compartmental model of N partitioning based on a ^{15}N labelling experiment conducted in field conditions (Malagoli *et al.*, 2004b). Harvests were conducted weekly by separating all leaf ranks, leading to a 25 compartment system. Combining the weekly mineral N uptake, calculated from logistic fitting of N accumulation in whole plant, with the relative allocation rate of ^{15}N taken up weekly, allowed the precise quantification of N flux from and into each compartment, either derived from uptake or from mobilization. Furthermore, the model was used to find simulations able to maximize N pod filling by decreasing N release to environment and improving N mobilization within the plant. It is well known that a near cessation of N uptake occurs after flowering in winter oilseed rape (Rood *et al.*, 1984; Gabrielle *et al.*, 1998a; Rossato *et al.*, 2001; Malagoli *et al.*, 2004a) although some authors have reported that N uptake only declines during N pod filling in field conditions (Hocking *et al.*, 1997). So, pod N filling is mainly achieved by N mobilization within the plant from the vegetative tissues (stem, leaves, taproot and inflorescences). As a consequence, N fluxes toward pods are mainly driven by source/sink relationships. However, data obtained through this work show the complexity of the change of sink/source relationships within the plant canopy. For example, all leaf ranks follow a transition from sink to source behaviour (Figures V.4 and V.6, Table V.II) for external N and endogenous remobilized N, but with different kinetics. Lower leaf ranks rely mostly on N taken up, but later on they remobilized N to higher leaf ranks, the latter being also involved in the recycling of N to the stem and to the reproductive sinks. Despite all the processes governing the sink/source transitions remained unknown, several hypotheses can be suggested.

Firstly, an environmental control can be considered through the decrease of light penetration inside the canopy. Indeed, several authors showed that the optimum leaf N allocation in a canopy is associated with the light interception through the crop (Anten *et al.*, 1995; Hirose *et al.*, 1987a; Hirose *et al.*, 1987b; Hirose *et al.*, 1988). As the crop expands, leaves that were initially at the top of the canopy gradually move down wards (increased shading). As a result, optimum SLN of the leaf declines, and N is translocated. This would increase lower leaf rank senescence, with a concomitant low efficiency for N remobilization, due to the lack of reproductive sinks.

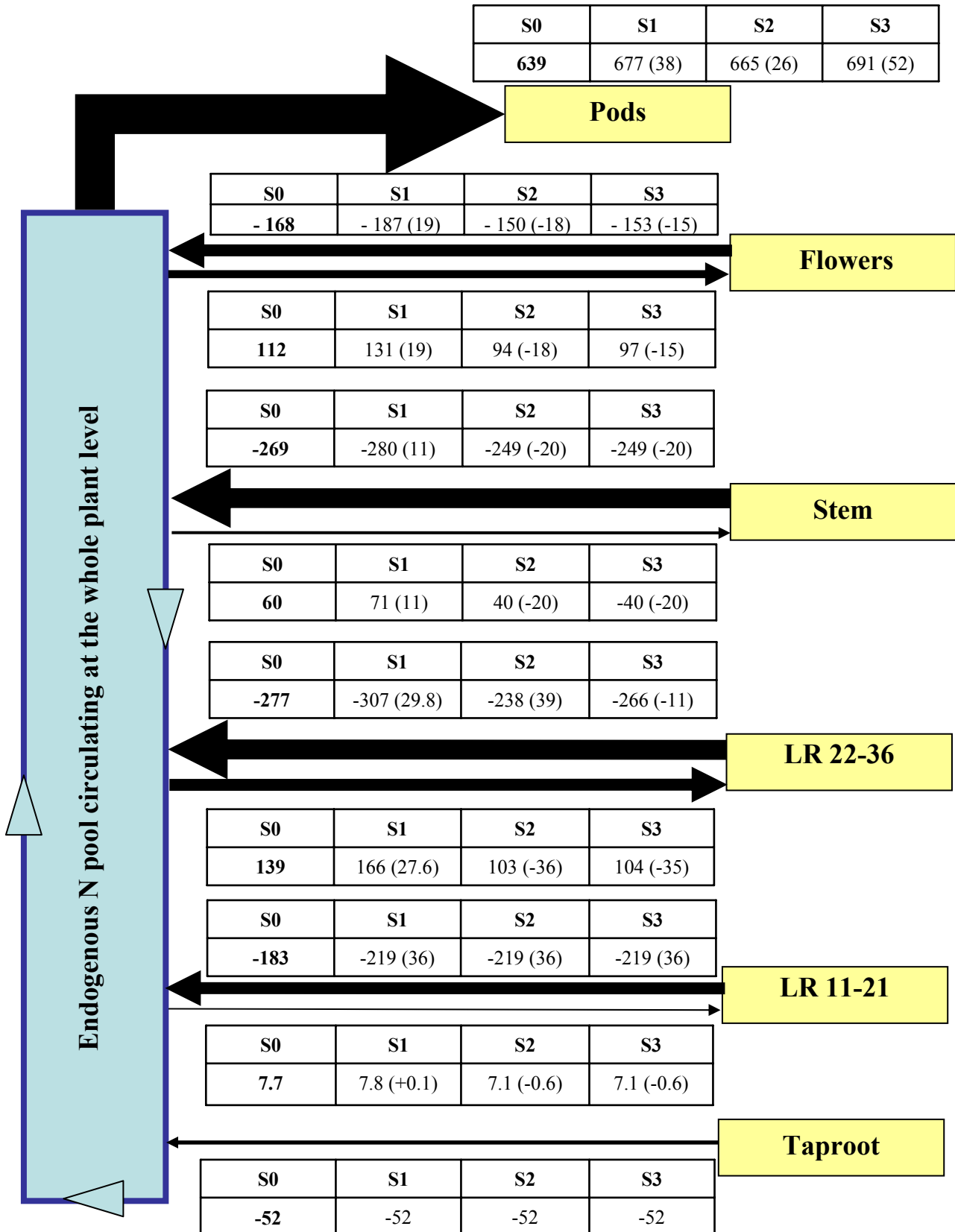


Figure V.6: Estimated flows of remobilized N from and to each tissue, calculated from the compartmental model, and for the different simulations tested (S0 : control, S1, S2, S3 as explained in legends of previous tables). Number between brackets indicates amount of endogenous allocated or remobilized as compared to S0.

Another hypothesis related to the specific position of a given leaf rank inside a changing trophic network could also be considered. It would rely on the developmental program of the plant, i.e. vegetative to reproductive transition, that, through for example, hormonal control (Methyl jasmonate for example, see Rossato *et al.*, 2002), would indirectly decrease N uptake after flowering. Thus, it would increase the need for internal N cycling, promoting leaf senescence and changes in source/sink relationships. In such a case, leaf-N dynamics would be triggered by hormones, independent of supply/demand balance.

Sinclair et de Wit (1975) have proposed that leaf senescence observed during the seed N filling in barley may be the result of self-destruction induced by N demand from reproductive sinks. Nevertheless, other authors have shown by removal of source (leaves) or sink (ear halving) tissues that seed N filling was source limited (Dreccer *et al.*, 1997) and not controlled by N demand. In particular, Kullman and Geisler (1986) proposed by a ^{15}N labelling experiment that N export from leaves controls the initiation of reproductive organs and seed development in oilseed rape. Endly, Schjoerring *et al.* (1995) demonstrated by increasing N application rates that seed production was source-limited in low- and medium- N plants, even if these plants were still able to withdraw all N from leaves before they were lost.

1. Endogenous N pool circulating at the whole plant level

The dynamic modelling of N fluxes allows the quantification of a cycling amino acid pool on the growth cycle. The access to such a mobile pool, which is difficult to assess quantitatively by classical methods, offers the opportunity to test the conceptual model of Imsande and Touraine (1994) that increased leaf senescence during the vegetative/reproductive transition, coupled with a reduced protein synthesis in leaves was responsible of higher amino acid cycling through the phloem which may down regulate root N uptake. Figure V. 5 shows that the size of this pool increased significantly during and after flowering, while N uptake was maintained at a low level. However, no obvious correlation was found between N uptake and the size of this cycling pool if the entire growth cycle is considered. It could be explained by recent molecular studies showing that mineral N transporters in the roots can be submitted to complex regulations involved at the transcriptional level, through down regulation by given amino acids and stimulation by products of carbon metabolism (Lejay *et al.* 2003). Nevertheless, the different simulations tested in the models show that this amino acid pool cannot be increased to such extent (S0,

Tableau II.1. Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture en hydroponie du colza.

Macroéléments	mM	Microéléments	μM
CaCl ₂	3,0	H ₃ BO ₄	14,0
KNO ₃	1,0	MnSO ₄	5,0
K ₂ SO ₄	1,0	ZnSO ₄	3,0
MgSO ₄	0,5	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,7
KH ₂ PO ₄	0,4	CuSO ₄	0,7
Fe-Na-EDTA	0,2	CoCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	0,15		

S1, S2 or S3, data not shown), that it would necessarily reduced root N uptake. It suggests that potentially, genotypes having a higher efficiency for N remobilization, may keep a relatively similar N uptake rate.

2. Agronomic applications

It seems that a better N harvest index (NHI) and a subsequent N use efficiency (NUE) may be achieved by improving N mobilization from sources tissues (especially leaves), although Yau and Thurling (1987) have demonstrated that NUE was not an inheritable trait in oilseed rape. Model outputs demonstrated that the amount of endogenous N mobilized from LR located at the bottom of the canopy and the timing of N mobilization were important variables to maximise pod N filling. When the final N content in the LR located at the bottom of the canopy was decreased down to 1 % (S1), model outputs showed a lower N release to soil (-13 kg N.ha^{-1}) and a higher N accumulation in pods (Table V.III). Dejoux (1999) and Dejoux *et al.* (2000) have already shown that freezing during the autumn-winter period could lead to high losses of leaf nitrogen, amounting to 100 kg N.ha^{-1} . Nevertheless, 28 and 24 % of N lost by leaf drop were re-absorbed by rapeseed at flowering and at harvest, respectively, limiting N losses. Trinsoutrot *et al.* (2000) and Thomson and Christensen (1998) found that N from residues such as stem, pod wall and taproot is relatively unavailable during the fallow, i.e. spring and summer seasons. Thus, during spring, N losses from leaf drop can not be re-absorbed by rapeseed crop because of an immobilization of N. Consequently, reducing N release to soil by improving N mobilization in leaves appears as a valuable means to limit N aquifer pollution, as proposed by the model output. Given N mobilization in LR at the bottom of the canopy started before flowering and pod N filling, the improved N accumulation was obtained by the ability of the buffer compartments (stem, flowers, LR22-36) to transfer additional endogenous N from LR11-21 to pods. In this simulation, the good relay was the result of a higher N allocation and a subsequent higher N_{max} values in flowers, stem and LR22-36. Nevertheless, in spite of a similar positive variations of endogenous N allocated (averaging +15-20 %) and of N_{max} values (ranging between 5-10 %) in LR22-36, additional endogenous N allocated to leaves were mainly driven toward LR24-29. This can be explained by the fact that endogenous N contributed up to 50% of N accumulation in LR24-29.

On the other hand, increasing the duration of N mobilization in the LR at the bottom of the canopy (S2) leads to a decrease in k_{TNout} (data not shown) and a slightly higher N accumulation in pods (Table V.III). Model outputs demonstrated that this higher transfer of

endogenous N resulted from direct transfer from LR11-21 to pods. Consequently, buffer compartments were less supplied with endogenous N. A better synchronisation between source N mobilization and pod N filling may hence increase NUE, what is consistent with the conclusion of Rossato *et al.* (2001). Moreover, Rood *et al.* (1984) suggested that the near cessation of N uptake from flowering onwards observed in controlled conditions in oilseed rape was responsible for the start of N mobilization and the subsequent leaf senescence. Consequently, they proposed that maintaining N uptake may delay leaf senescence and lead to a higher yield. A better source/sink relationship for N could also be obtained with early flowering varieties. Habekotté *et al.* (1997c) showed through simulation studies that yield would be improved by early flowering cultivar because of better photoassimilate transfer. Combining both previous simulations (S3) resulted in the best improvement of N accumulation in pods by adding both positive effects. It is interesting to note that the highest endogenous N increase was observed when leaf ranks located at the bottom of the canopy have the same kinetic characteristics as the leaves located at the middle and at the top of the canopy, *i.e.* N_{\min} at 1 % DW and k_{TNout} .

3. Conclusions

This modelling approach, then, suggests that the values of key parameters (N_{\min} and k_{TNout}) could be optimized to improve N use efficiency toward the pods, through a better N mobilization. Nanda *et al.* (1995) have shown, by studying pattern of leaf appearance in Brassica species, that the number of leaves and the leaf area of higher leaf ranks within the canopy were positively correlated with days from sowing to floral initiation. Hence, previous cited studies proposed that a better N transfer toward pods may be reached by an early flowering. It would therefore be interesting to have an early planting date in order to maximise area of the top leaf ranks and subsequently N amount in these leaf ranks. Moreover, Mickelson *et al.* (2003) have identified that the confidence interval of a QTL related to nitrogen remobilization from flag leaf in barley (*Hordeum vulgare* L.) overlapped with QTL for heading date and leaf size. In particular, they found a negative correlation between leaf N concentration at maturity and leaf size (*i.e.* line with large leaves are more efficient at N remobilization).

This work has been done with a given genotype under constant environmental conditions (temperature, light intensity for example). It will be of interest to evaluate how these factors

and the different morphological characteristics of different genotypes (different trophic network and indirectly modified leaf environment), affect N dynamics in leaves.

Aknowledgements

Authors would like to acknowledge Patrick Beauclair for his technical assistance in ^{15}N labelling and harvests in field and laboratory condition and Marie-Paule Henry for her helpful assistance in samples analysis by mass spectrometry as well as in laboratory harvests and leaf area measuring. Prof. Hammer is also acknowledged for his helpful and valuable comments about this manuscript.

CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE

VI. Discussion générale

Dans la perspective d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement, la limitation de la pollution nitrique des sols et des nappes aquifères passe, entre autres, par une meilleure gestion des intrants azotés. Dans ce contexte, l'optimisation de la fertilisation azotée semble nécessaire afin d'améliorer le bilan azoté des cultures. Parmi celles-ci, le colza voit ses zones d'emblavement augmenter régulièrement en Europe et il présente une faible capacité à valoriser l'azote absorbé vers les tissus récoltés. En effet, des études conjointement menées par l'INRA et le CETIOM ont montré que 2/3 des engrais apportés à une culture de colza étaient restitués au sol à la récolte, mettant en exergue un retour important de l'azote prélevé par la culture à l'environnement.

L'optimisation de la quantité d'engrais azoté à apporter et de la date d'application nécessite une définition exacte de la demande en azote de la culture à un moment donné du cycle de développement. Actuellement, la demande en azote est généralement appréhendée par la loi de dilution de l'azote dans les modèles agronomiques pour le colza (Colnenne *et al.*, 1998 ; Gabrielle *et al.*, 1998a, b). Bien que simulant correctement cette demande pour des situations variées de carences azotées, les limites d'utilisation de cette loi surviennent quand la demande n'est plus pilotée par la croissance des parties aériennes. Ainsi, cette approche ne permet pas d'appréhender l'existence de réserves ou de stockage transitoire de cet élément qui peuvent le cas échéant suppléer à un déficit d'absorption et ainsi maintenir un certain niveau de croissance. De plus, ce concept ne prend pas en compte l'impact des facteurs environnementaux et endogènes dont les effets sur la croissance et l'absorption ne sont pas similaires. Par ailleurs, le fonctionnement des systèmes de transport du nitrate (HATS et LATS) ainsi que les régulations s'exerçant à l'échelle physiologique et moléculaire ne sont pas intégrés dans ce type de modèles. En résumé, malgré l'identification de deux systèmes de transports chez de nombreuses espèces, et récemment chez le colza par Faure-Rabasse *et al.* (2002), **aucune démarche de modélisation mécaniste basée sur ces activités et sur leurs régulations par des facteurs environnementaux et endogènes n'a été entreprise jusqu'à présent.**

L'effort de réduction de la pollution nitrique doit aussi s'accompagner d'une meilleure efficacité de l'utilisation de l'azote. En effet, le colza se caractérise par de fortes capacités d'absorption du nitrate en général jusqu'à la floraison mais aussi par une faible capacité de

remobilisation de l'azote endogène des organes végétatifs au profit des tissus récoltés pendant le remplissage des siliques. Cela se traduit par de faibles valeurs d'efficacité d'utilisation de l'azote et d'indice de récolte azoté en comparaison avec d'autres espèces. Par conséquent, la maximisation de la remobilisation de l'azote des organes végétatifs au profit des tissus reproducteurs devrait permettre d'améliorer le bilan environnemental du colza pour l'azote et éventuellement son rendement. Ainsi, malgré les quantités importantes d'azote foliaire restituées par la chute des feuilles au cours de la floraison (jusqu'à $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ selon le niveau de fertilisation azotée), il n'existe que **peu d'informations sur la dynamique précise de l'azote absorbé et remobilisé entre les étages foliaires** composant le compartiment foliaire en conditions de plein champ du stade "reprise de végétation" (C1) au "stade maturité des graines" (G5).

Ce travail de thèse consistait donc à :

- élaborer un **modèle mécaniste de l'absorption du nitrate** basé sur les activités des systèmes de transport (HATS et LATS) et sur l'intégration de l'effet de facteurs environnementaux (concentration en nitrate du sol, température et rayonnement) et endogènes (cycle nyctéméral et ontogenèse) sur les activités de ces systèmes de transport chez le colza d'hiver au cours du cycle de culture,
- étudier **la dynamique de l'azote exogène et endogène** dans les différents compartiments du végétal, notamment **entre les rangs de feuilles**, en terme de relations source/puits pour l'azote du stade "reprise de végétation" (C1) au stade "maturité des graines" (G5),
- élaborer **un modèle d'allocation de l'azote** au sein de la plante basé sur une description mathématique de la dynamique de l'azote dans chaque compartiment afin d'identifier les **paramètres clés**, dont l'optimisation, à l'aide de l'amélioration génétique et/ou de pratiques culturales adaptées, permettrait une meilleure valorisation de l'azote au profit des siliques tout en minimisant le contenu résiduel des feuilles et des pailles au sol.

A. Régulation de l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture

Ce travail de modélisation s'est inscrit dans la perspective d'intégrer les connaissances récentes concernant les régulations de l'absorption du nitrate s'exerçant au niveau de l'activité des systèmes de transport. Cependant, étant donné l'écart d'échelle de temps et d'espace et la complexité des régulations mises en évidence, il semblait difficile de quantifier au cours du cycle de culture puis de modéliser l'effet de molécules spécifiques (acides aminés, glucides par exemple) sur les activités des systèmes de transport HATS et LATS ou sur l'expression des transcrits codant les transporteurs du nitrate des familles *Bnrrt1* et *Bnrrt2*. Par conséquent, nous avons opté pour une approche plus globale en étudiant puis en introduisant dans le modèle les effets de facteurs de l'environnement (concentration en nitrate du sol, température et PAR) et endogènes (cycle nycthéral et ontogénèse) capables de rendre compte, de façon intégrée à l'échelle du jour et du cycle de culture, de l'interaction des régulations. Cette approche, originale et novatrice par rapport aux modèles existants, nous a permis de proposer un modèle mécaniste de l'absorption du nitrate dont les bases reposent sur les activités des systèmes de transport mais dont l'utilisation peut être exploitée à l'échelle agronomique, *i.e.* à l'échelle de la population végétale en conditions de plein champ.

La construction du modèle d'absorption du nitrate a donc nécessité l'établissement de courbes de réponse des activités des systèmes de transport HATS et HATS+LATS aux variables environnementales et endogènes étudiées. La description mathématique de la variation de ces activités en fonction des facteurs testés (température, rayonnement, cycle nycthéral, ontogénèse) a ensuite permis d'intégrer individuellement ou simultanément les régulations s'exerçant sur le fonctionnement des systèmes de transport du nitrate. Les simulations réalisées à l'aide du modèle au cours de ce travail utilisant les données de la banque Colza de l'INRA (<http://www-bioclim.inra.grignon.fr>) ont permis:

1. de quantifier l'impact de chaque variable environnementale et endogène sur l'absorption du nitrate pendant le cycle de culture à l'échelle de la plante entière.

a. Cycle nycthéral et rayonnements photosynthétiquement actifs (PAR)

Le suivi des activités du HATS et du HATS+LATS sur **une période de 24 heures** a mis en évidence **une réduction de ces activités (-50%) lors de la transition jour/nuit**

(Figure III.1A). Ce résultat confirme les observations déjà réalisées chez le ray-grass (*Lolium perenne* L., Ourry *et al.*, 1994), le soja (*Glycine max* L. ; Dehlon *et al.* 1995, 1996) ou encore chez *Arabidopsis thaliana* (Lejay *et al.*, 1999). Par ailleurs, **les résultats issus de l'étude de la variation des valeurs du PAR sur les activités HATS et HATS+LATS ont montré une relation positive entre la quantité de rayonnement reçu au niveau du couvert et les valeurs d'influx du HATS** (Figure III.1D). De plus, l'établissement des courbes de réponse de la lumière au niveau foliaire a révélé une concomitance entre le point de saturation de la photosynthèse et celui de l'influx de nitrate du HATS, fixé dans nos conditions expérimentales à $300 \mu\text{moles. h}^{-1}. \text{s}^{-1}$. **L'ensemble de ces résultats semblent indiquer une relation positive entre l'influx de nitrate et la quantité de squelettes carbonés disponibles à l'échelle de la plante entière et plus probablement du flux carboné existant vers le système racinaire.** Par conséquent, la chute de l'activité de ces systèmes de transport serait liée à une réduction de la disponibilité des substrats carbonés, diminuant l'approvisionnement énergétique nécessaire au fonctionnement des systèmes de transport. En effet, Dehlon *et al.* (1995, 1996) ont montré qu'un ombrage des parties aériennes et une diminution de la teneur en CO_2 dans l'atmosphère entraînait respectivement une réduction de 45 et 75 % de l'influx de $^{15}\text{NO}_3^-$, mettant en évidence une relation entre la photosynthèse, la disponibilité en carbone et l'absorption du nitrate. Cependant, **l'action des substrats carbonés pourrait aussi intervenir au niveau moléculaire.** En effet, les études récentes ont montré que l'apport de saccharose dans le milieu (Lam *et al.*, 1996) et que l'augmentation de l'intensité lumineuse (Lejay *et al.*, 1999) stimulaient l'expression des gènes *Atnrt1.1* et *Atnrt2.1* codant respectivement les transporteurs CLATS et IHATS chez *Arabidopsis thaliana*. De plus, Lejay *et al.* (1999) et Matt *et al.* (2001) ont démontré que le niveau des transcrits du gène *Nrt2* était parallèle à la disponibilité en glucides simples au sein des racines lors du cycle nycthéral.

L'intérêt d'introduire l'effet du **cycle nycthéral** (associé à celui de la **photopériode**) et l'effet du **PAR** dans le modèle a été de prendre en compte :

- l'ensemble des régulations citées ci-dessus agissant à **court terme** sur les systèmes de transport et de permettre **un changement d'échelle en passant d'un influx horaire à un influx journalier** (effet nycthéral). L'intégration des variations nycthérales a permis de réduire uniformément au cours du cycle l'absorption potentielle non régulée d'un facteur 2 à la fin du cycle de culture,

- **les variations inter-journalières de la durée d'éclairement (photopériode)** au cours du cycle de culture. Il en ressort que l'absorption du nitrate est plus faible pendant la période automno-hivernale que pendant la période printanière si l'on tient compte de la variation de la durée de la photopériode au cours du cycle de culture,
- **les variations diurnes inter-journalières de la quantité de rayonnements photosynthétiquement actifs (effet PAR)** reçue par le couvert au cours du cycle de culture. Ces variations sont le résultat soit d'une réduction du rayonnement pendant l'hiver soit d'une atténuation très importante de la quantité de rayonnement perçu par les surfaces photosynthétiquement actives au cours de la floraison et du remplissage des siliques. En effet, de nombreux auteurs ont montré que les fleurs de colza réfléchissaient de façon très importante le PAR, entraînant une diminution de la pénétration du rayonnement dans le couvert s'échelonnant de 60 à 80 % (Mendham *et al.*, 1981 ; Chapman *et al.*, 1984). Pendant la période reproductrice, les siliques sont responsables de l'atténuation du PAR pénétrant le couvert.

b. Cycle ontogénétique (Figure III. 1C) :

L'étude des activités des systèmes de transport HATS et HATS+LATS au cours du cycle de culture a montré :

- **une phase de stimulation** de l'activité du HATS pendant la floraison et du HATS+LATS pendant la montaison, qui peut s'expliquer par une augmentation de la demande en azote par les parties aériennes, due à la mise en place des tissus photosynthétiquement actifs (la hampe et les feuilles),
- **une phase d'inhibition** importante de l'activité de nitrate par le HATS et le HATS+LATS à partir de la floraison et pendant le remplissage des siliques.

Ces résultats confirment l'arrêt de l'absorption déjà observé par Rossato *et al.* (2001) en conditions contrôlées chez le colza d'hiver et **ils précisent que l'inhibition des activités des systèmes de transport sont à l'origine de l'arrêt de l'absorption du nitrate au cours de la floraison.** Etant donné que les plantes ont été cultivées dans un milieu non limitant en KNO₃ (1mM) et en milieu hydroponique, la chute de l'absorption du nitrate ne s'explique pas par une diminution de la disponibilité du nitrate dans la solution nutritive ni même pour une

éventuelle contrainte hydrique. Elle est liée, dans nos conditions, à l'intervention de régulations agissant soit directement sur les activités des systèmes de transport soit sur l'expression des gènes codant les transporteurs du nitrate. Plusieurs hypothèses, ne s'excluant pas entre elles et envisageant une rétro inhibition par les acides aminés, une réduction de la disponibilité en glucides ou un effet des phytohormones, peuvent être avancées pour expliquer l'inhibition des activités du HATS et du LATS :

- selon le modèle de Cooper et Clarkson (1989) conforté par des éléments moléculaires, **les acides aminés exerceraient un rétro-contrôle négatif sur l'absorption du nitrate**. Or, la floraison est marquée par le début de la remobilisation de l'azote foliaire et par une protéolyse foliaire importante, ce qui augmente le pool d'acides aminés circulant à l'échelle de la plante entière. Ce pool pourrait donc rétro-inhiber l'absorption du nitrate. Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a pu montrer si c'est la taille et/ou la composition de ce pool d'azote circulant qui est déterminante dans ce rétro-contrôle. Cependant, les résultats que nous avons obtenus en conditions de plein champ n'ont pas mis en évidence de corrélation entre le pool d'azote issu de la remobilisation et l'absorption du nitrate (Figure V.5),
- de nombreuses études ont montré que la transition florale se caractérise par une modification des relations source/puits pour le carbone (Rood, 1984 ;Triboï-Blondel, 1988). Par conséquent, on peut aussi émettre l'hypothèse que le **détournement du flux carboné du pivot vers les siliques au cours de la période reproductrice entraînerait une chute de l'allocation des squelettes carbonés vers le système racinaire**, nécessaires au fonctionnement du HATS. Cette hypothèse est confirmée par les résultats préliminaires (non présentés) obtenus par un double marquage $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ en conditions contrôlées qui montrent une corrélation entre l'absorption du nitrate et l'allocation du carbone marqué vers le système racinaire au cours de la montaison et au début de la floraison,
- des expérimentations complémentaires ont montré qu'un apport foliaire ou racinaire de méthyljasmonate (Rossato *et al.*, 2002), analogue de l'acide jasmonique produit par les inflorescences, réduisait drastiquement l'absorption de nitrate, suggérant ainsi **l'intervention possible de cette phytohormone dans la régulation de l'expression des transcrits et des activités des systèmes de transport**. Toutefois, il apparaît que le méthyljasmonate appliqué par voie foliaire a une action rapide (moins de 12 heures) mais non spécifique sur l'absorption du nitrate, puisqu'il affecte de façon similaire l'absorption du potassium.

La prise en compte de ce facteur dans le modèle a permis d'intégrer les régulations s'exerçant à **long terme** sur l'absorption du nitrate. Dans le modèle, l'effet du cycle ontogénétique intervient tardivement dans le cycle de culture (à partir de la floraison) et il ne provoque qu'une diminution de 19 % de l'absorption potentielle non régulée.

c. Température :

L'exposition des racines de jeunes plantes de colza à de basses températures a entraîné une réponse différentielle de l'activité du HATS et du LATS (Figure III.1.B). En effet, nos résultats ont montré une réduction significative de l'influx associé à l'activité du HATS pour de basses températures. Tout d'abord, le résultat fournit un élément supplémentaire étayant l'hypothèse d'un fonctionnement énergétiquement dépendant de l'activité du HATS, déjà suggérée par la cinétique de type Michaëlis-Menten décrivant l'activité du HATS en fonction de la concentration en nitrate dans la solution nutritive. De plus, plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence l'impact d'une chute de la température sur l'absorption nette du nitrate à long terme (Lainé *et al.*, 1993). Dans notre expérimentation, nous montrons que la température peut aussi agir localement (racines) et à court terme sur l'influx de nitrate (Macduff *et al.*, 1987).

Dans nos conditions expérimentales, il apparaît que l'activité du système de transport LATS est peu sensible à une baisse de température, confirmant l'hypothèse d'un fonctionnement ne requérant pas d'énergie de type canal ionique.

L'introduction de l'effet de la température a permis une réduction de 50 % de la quantité d'azote exporté à la récolte s'exerçant principalement lors de la période automno-hivernale.

2. de déterminer l'impact de l'ensemble des facteurs sur l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture.

L'introduction **globale** de l'ensemble des facteurs dans le modèle **entraîne une forte réduction de la quantité d'azote nitrique prélevée par la culture à la récolte** (facteur 6) (Figure III.2B).

- Période automno-hivernale et montaison :

L'intégration de ces variables a permis d'obtenir un bon ajustement des sorties du modèle aux valeurs observées pendant la période automno-hivernale et la montaison, pour les niveaux de fertilisation N0 (0 kgN.ha⁻¹) et N2 (270 kgN.ha⁻¹). Par conséquent, ce résultat montre que le modèle est capable de rendre compte du niveau de fertilisation azotée appliquée au cours du cycle de culture (Figure III.3).

La surestimation du prélèvement d'azote nitrique pendant la période automno-hivernale avec le niveau de fertilisation N1 (135 kg.ha⁻¹) peut s'expliquer par le fait que la répartition de la biomasse racinaire a été calculée à partir des données N2, en raison de l'absence de données relatives à la répartition du système racinaire dans les essais N1. Par ailleurs, cette approximation soulève la difficulté d'estimer en conditions de plein champ, d'une part, la biomasse racinaire totale (pivot et racines latérales) et, d'autre part, la proportion du système racinaire participant activement au prélèvement d'azote nitrique (localisation tissulaire spécifique des systèmes de transport, sénescence racinaire éventuelle). Dans notre modèle, la biomasse racinaire active du point de vue de l'absorption du nitrate a été estimée à partir de données obtenues en conditions contrôlées (ratio pivot/(pivot+racines latérales)) et au champ (biomasse du pivot). A l'évidence, cette approximation est grossière. Néanmoins, une analyse de sensibilité portant sur une variation de $\pm 20\%$ de la biomasse racinaire absorbante n'a montré qu'une variation de 12 % de la quantité d'azote nitrique absorbé à la fin du cycle de culture. Cette faible sensibilité du modèle à une modification de la biomasse racinaire peut s'expliquer dans le cas de ce modèle d'absorption du nitrate par le fait que :

- l'ion nitrate est extrêmement mobile dans le sol par rapport à d'autres éléments comme l'ammonium ou le potassium. Par conséquent, la définition approximative de la pénétration du système racinaire apparaît moins handicapante pour modéliser l'absorption du nitrate,
- l'absorption du nitrate est réalisée à 90 % dans les 30 premiers centimètres du sol comme le soulignent Gabrielle *et al.* (2001) avec l'utilisation du modèle SUNDIAL,
- il a été démontré chez le colza et chez de nombreuses autres plantes une plasticité importante du système racinaire pour l'absorption du nitrate. Ainsi, si seulement 50%

des racines sont alimentées en nitrate, elles sont capables de doubler leur capacité d'absorption en moins de 24 heures et ainsi de compenser l'absence de prélèvement par les racines privées en nitrate (expérimentations en conditions contrôlées utilisant des plantes cultivées avec le système « split-root » ; Laîné *et al.*, 1995).

- Floraison et remplissage des siliques :

A partir de la floraison, le modèle surestime la quantité d'azote nitrique prélevée par la culture de colza (Figure III.3). Ce résultat a suggéré, d'une part, que les capacités d'absorption du nitrate seraient maintenues à un niveau élevé pendant la floraison en conditions de plein champ, avant de s'effondrer pendant le remplissage des siliques. Ceci corrobore les observations de Schjoerring *et al.* (1995) et Hocking *et al.* (1997) qui ont montré un maintien de l'absorption au cours de la transition florale en conditions de plein champ chez *Brassica napus* L.. D'autre part, cela a aussi révélé l'existence d'un autre facteur de régulation ou potentiellement de nature trophique limitant l'absorption à la floraison et qui n'était pas intégré dans notre modèle. Ainsi, l'introduction de l'offre en azote du sol (*via* le calcul du stock disponible en azote nitrique du sol) a permis de corriger la surestimation observée pendant la floraison. Dans notre cas, soulignons que seul l'aspect "quantité" et non "disponibilité" du nitrate a été pris en compte pour définir l'offre en azote du sol. Cependant, bien que Merrien *et al.* (1988) aient proposé que l'arrêt de l'absorption puisse résulter des conditions hydriques défavorables pour la mobilité des ions nitrate dans le sol, les travaux de Rossato *et al.* (2002) ont montré que la chute de l'absorption du nitrate résulterait davantage du programme ontogénétique que de la diminution de la disponibilité en azote nitrique dans la solution et d'un éventuel stress hydrique (plantes cultivées en hydroponie). Par conséquent, même si la définition de l'offre en azote du sol demeure incomplète dans le modèle que nous présentons (pas de flux de convection ni de diffusion), cette approche présente l'intérêt d'être opérationnelle.

3. de quantifier la participation relative de chaque système de transport à l'absorption et leur durée d'activité au cours du cycle de culture à l'échelle du système racinaire.

L'un des atouts de cette démarche de modélisation a été de pouvoir accéder à l'activité des systèmes de transport (HATS et LATS) au cours d'un cycle entier de culture en terme de participation relative et de durée de fonctionnement. En effet, l'accès à ce type d'information

n'est pas possible *via* une démarche strictement expérimentale. Il ressort de l'analyse des simulations que **le système de transport à forte affinité (HATS) est le principal acteur de l'absorption du nitrate au cours du cycle de culture** (Figure III.4). En particulier, la composante inductible (IHATS) peut représenter jusqu'à 80 % de la quantité simulée d'azote nitrique absorbé. Au regard des concentrations rencontrées dans le sol (toujours supérieures à 100 μM), il apparaît que ce système de transport fonctionne pendant tout le cycle de culture à sa valeur maximale d'influx (I_m), confirmant les résultats obtenus par Steingrobe et Schenk (1997) chez la laitue en conditions contrôlées. Par conséquent, dans notre modèle, **l'influx du HATS n'est pas piloté par la concentration en nitrate du sol, et donc par sa constante d'affinité ($K_m=85 \mu\text{M}$), mais il est sous la dépendance stricte des régulations issues des facteurs exogènes et endogènes introduits dans le modèle.**

La participation du système de transport à faible activité (LATS) et sa durée de fonctionnement sont réduites au cours du cycle de culture (Figure III.4). En effet, la concentration seuil de nitrate (900 μM et 1 mM respectivement pour le CLATS et le ILATS) pour laquelle le LATS fonctionne dans le modèle est atteinte au début de la période automnale (pic de minéralisation) et lors d'apport d'engrais azotés. Dans ce cas, la participation du LATS peut assurer jusqu'à 80 % de l'absorption journalière simulée d'azote nitrique et sa durée d'activité est augmentée de 30 %, ce qui correspond à un allongement de la durée de l'activité de 200°Cjours. **Bien que notre travail ait démontré que l'activité du LATS soit potentiellement soumise à des régulations par les facteurs endogènes et environnementaux, les conditions rencontrées en conditions de plein champ montrent que l'activité du LATS est limitée principalement par les concentrations en nitrate du sol.**

B. Etude de la dynamique de l'allocation et de la remobilisation de l'azote à partir de la reprise de végétation

1. Dynamique de l'azote

L'utilisation du traceur ^{15}N a permis de suivre précisément la dynamique de l'azote exogène et endogène dans les différents compartiments du stade « reprise de végétation » au stade « maturité des graines ». La méthodologie retenue, à savoir un apport séquentiel hebdomadaire d'une faible quantité de K^{15}NO_3 , permettant d'estimer son allocation relative,

est originale et n'a pas, à notre connaissance, été décrite dans la littérature. Combinée à la régression de l'azote total absorbé à l'échelle de la plante entière, cette approche permet d'évaluer les quantités réelles d'azote allouées chaque semaine dans chaque compartiment du végétal. Les résultats issus de cette expérimentation ont mis en évidence :

a. la contribution significative du compartiment foliaire au remplissage en azote des siliques.

En effet, les travaux menés jusqu'à présent ont montré que la hampe participait de façon prépondérante à la fourniture azotée des tissus reproducteurs (Hocking *et al.*, 1997 ; Dreccer *et al.*, 2000). La sous-estimation de la participation des feuilles s'explique par le fait que la participation des différents organes au remplissage en azote des siliques n'a été étudiée que pendant la période reproductrice. A partir de la floraison, comme une part importante des feuilles sénescences a chuté, l'azote foliaire remobilisé avant la floraison n'était pas pris en compte. Dans notre expérimentation, le marquage a commencé dès la reprise de végétation. Par conséquent, la dynamique de l'azote dans toutes les feuilles pendant la montaison (*i.e.* avant l'apparition des siliques) a été suivie, permettant ainsi la quantification exacte des flux d'azote endogène issus de ces rangs foliaires,

b. la dynamique complexe de l'azote à l'intérieur du compartiment foliaire, se manifestant par des comportements différents entre les rangs de feuilles vis à vis de l'azote issu de l'absorption et/ou de la remobilisation.

En effet, le suivi des flux associés à leur formalisation mathématique à l'aide d'équations de type exponentielle ou logistique a permis de distinguer globalement **deux catégories de rangs de feuilles** (Figures IV.6 et IV.8) :

- les feuilles situées en **bas du couvert**, caractérisées par des teneurs élevées en azote au moment de leur chute (variant de 2,5 à 3,5 %), ont des **valeurs élevées de constantes de vitesse d'allocation de l'azote exogène (k_{EXONAI})** (Tableau V.II) qui rendent compte de la participation exclusive de l'azote issu de l'absorption à leur remplissage. De façon plus étonnante, ces rangs de feuilles présentent aussi dans notre expérimentation des valeurs importantes **de constantes de vitesse de remobilisation de l'azote endogène par rapport à l'ensemble des rangs de feuilles du couvert**, bien qu'il s'avère que les quantités d'azote remobilisées par ces feuilles restent relativement faibles (faible valeur de N_{max}). Ceci

s'explique par le fait que les durées de remobilisation de l'azote endogène sont particulièrement courtes en raison d'une abscission précoce de ces rangs foliaires. Les caractéristiques des feuilles du bas du couvert mettent en exergue une faible capacité de remobilisation de l'azote pendant la montaison et le début de la floraison. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- **limitation par les puits :**

La remobilisation des feuilles du bas du couvert commence à partir de la montaison, marquée par l'absence de puits forts pour l'azote (hampe florale et/ou siliques). Par conséquent, la limitation de la force puits peut expliquer la faible capacité de vidage des feuilles de la rosette. Cette hypothèse a d'ailleurs été retenue par Rossato *et al.* (2002).

- **limitation par une sénescence accélérée des feuilles sources :**

Nos résultats ont mis en évidence deux pics de chutes de feuilles pendant la montaison et la période reproductive (Figure IV.3). Le premier pic de chute de feuilles correspond à la chute des feuilles de la rosette (feuilles du bas du couvert). Parallèlement, la détermination de la surface foliaire a montré que le LAI (Leaf Index Area) était de 4 à ce moment. Or, Habbekotté (1997) a montré qu'une valeur de LAI supérieure à 3 entraînait un phénomène d'auto-ombrage des feuilles. Par conséquent, la chute prématurée des feuilles pourrait aussi s'expliquer par une détérioration de l'environnement trophique des feuilles du bas du couvert, se traduisant par une réduction de la pénétration du PAR dans le couvert. Cette hypothèse a été avancée par Hocking *et al.* (1997) et Dreccer *et al.* (2000).

- les feuilles situées en **haut du couvert** (du RF 21 au RF 36) présentent une dynamique plus duale vis-à-vis de l'azote issu de l'absorption ou de la remobilisation.

Les feuilles du haut du couvert étant caractérisées par des teneurs résiduelles en azote plus faibles au moment de leur chute (oscillant entre 1,5 et 2 %), l'ajustement mathématique de la cinétique d'allocation de l'azote exogène met en évidence **une décroissance progressive et quasi-linéaire des valeurs de constante de vitesse de l'allocation de l'azote exogène (k_{EXONAI}) (Tableau V.II) dans le sens croissant des numéros de rangs de feuilles.** Cette diminution s'explique par (i) une réduction progressive de l'absorption de l'azote à

l'échelle de la plante entière et (ii) par la compétition due à l'apparition et la croissance de nouveaux puits (fleurs, siliques) lors du remplissage en azote de ces rangs de feuilles.

A la différence des feuilles s'échelonnant entre les RF 11 et 20, le remplissage en azote dans les RF du haut du couvert n'est pas le résultat exclusif de l'allocation de l'azote absorbé. Au contraire, **plus le numéro de l'étage foliaire est élevé, plus la contribution de l'azote issu de la remobilisation est significative (jusqu'à 50 % de l'azote total accumulé)** (Figure IV.8). Il en résulte que dans nos conditions, **les feuilles situées dans la partie supérieure du couvert ont la capacité de stocker de l'azote avant de le remobiliser au profit des organes reproducteurs** (en l'occurrence, les siliques chez le colza). Dans nos conditions, le pivot n'assure qu'une contribution mineure.

De plus, la fréquence de l'application de ^{15}N en conditions de plein champ (tous les sept jours) a aussi permis de suivre très précisément le timing des changements de statut source/puits dans chaque rang de feuille. La superposition des périodes successives puits/sources dans chaque rang de feuille le long de l'axe de la hampe a permis de mettre en évidence **l'existence de flux d'azote entre les feuilles localisées dans le bas du couvert et celles situées dans la partie supérieure du couvert via un compartiment central : la hampe florale** (Figure IV.7). En effet, **avant le début du remplissage en azote des siliques**, les organes **sources** (les feuilles situées en **bas du couvert** du RF 11 à 20, dans notre expérimentation) remobilisent l'azote endogène au profit des organes puits en croissance (la hampe et les feuilles du haut du couvert). La remobilisation précoce de l'azote foliaire nécessite l'intervention de compartiments «tampons» pour stocker provisoirement l'azote avant le transfert vers les tissus reproducteurs. Cette asynchronie entre les phases de remobilisation de l'azote foliaire et de début du remplissage en azote des siliques ainsi que l'identification d'organes tampons ont déjà été mises en évidence par Rossato *et al.* (2002). Ces auteurs ont montré en conditions contrôlées que la hampe et le pivot étaient les principaux organes de stockage de l'azote. En conditions de plein champ, nos résultats ont montré que **la hampe et les feuilles situées dans la partie supérieure du couvert** (du RF 21 à 36) remplissaient **la fonction de compartiments tampons**.

La modélisation de la cinétique d'allocation (k_{ENDONAI}) (Tableau V.II) et de remobilisation (k_{ENDONMOb}) (Tableau V.II) de l'azote endogène a permis de dégager les constantes de vitesse associées à ces deux flux. Il en résulte que :

- 1) à l'instar de l'évolution des constantes d'allocation de l'azote exogène, **les valeurs de constantes de l'allocation de l'azote issu de la remobilisation décroissent de façon quasi-linéaire en fonction de la numérotation croissante de rang de feuille** (Tableau IV.II). Cette décroissance est le résultat :
- d'une augmentation de la durée de remplissage en azote,
 - de la compétition due à l'apparition de nouveaux puits,
 - d'une réduction de la taille des rangs de feuilles (notamment à partir du rang de feuille 26), mettant ici en exergue l'importance de la variable « biomasse » et « surface » dans l'interprétation de l'évolution des flux d'azote.
- 2) *A contrario*, **les constantes de vitesse de remobilisation de l'azote endogène varient peu, quel que soit le numéro de rang de feuille concerné entre RF 21 et RF 36**. Cette faible variation s'explique par une diminution de la taille des rangs de feuilles (et donc de la quantité d'azote remobilisable) et par une réduction parallèle de la durée de remobilisation de l'azote dans les rangs de feuilles. **Par ailleurs, cela montre que, malgré une date variable du début de remobilisation de chaque RF correspondant à des stades variables de l'apparition puis du remplissage en azote des siliques, la valeur de chacune de ces constantes est limitée, suggérant au moins pour ces RF, une limitation de la vitesse du vidage en azote par la demande en azote des siliques.**

La floraison puis le remplissage en azote des siliques sont marqués par la modification des relations source/puits pour l'azote. En effet, **la hampe, les feuilles du haut du couvert et les inflorescences deviennent successivement exportateurs d'azote endogène au profit des tissus reproducteurs** (Figure IV.5). La hampe devient une source d'azote endogène au début de la floraison au profit des feuilles du haut du couvert, capable de participer au stockage transitoire de l'azote. Ce résultat confirme ceux de Schjoerring *et al.* (1995) chez *Brassica napus* L. Pendant le remplissage en azote des siliques, l'ensemble des organes sont des sources pour le remplissage des siliques.

2. Quantification du pool d'azote endogène libre circulant

Nos résultats permettent de quantifier de façon précise **un pool d'azote endogène libre circulant à l'échelle de la plante entière**. Il faut noter que l'estimation par une méthode

classique telle que l'analyse du phloème ne permet pas d'estimer d'un point de vue quantitatif ce pool circulant. Ce pool est la résultante de **deux phases de remobilisation** :

- « **précoce** » à partir **des feuilles du bas du couvert**, sous la dépendance de la capacité de remobilisation de ces rangs de feuilles,
- « **tardive** » vers les graines à partir **des organes sources participant directement au remplissage des siliques**.

Malgré un ralentissement de l'absorption du nitrate lors de la transition florale concomitant à une augmentation du pool d'azote endogène mobilisé à l'échelle de la plante entière, les résultats issus de cette expérimentation n'ont pas permis d'établir de façon nette une relation inverse entre l'absorption et la remobilisation d'azote (Figure V.5). Bien que le pool d'azote endogène (ici assimilé au pool d'acides aminés circulants) pourrait conceptuellement exercer un rétro-contrôle négatif sur l'expression et/ou sur l'activité des systèmes de transport (Imsande et Touraine, 1994), ce résultat montre aussi indirectement qu'il n'est pas le seul acteur de cette régulation. En effet, les travaux menés par Lejay *et al.* (2003) ont démontré que le saccharose était un candidat éligible en tant que molécule signal régulatrice de l'expression racinaire des systèmes de transport du nitrate chez *Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, Beuve *et al.* (2004) ont mis en évidence chez *Brassica napus* L. que le GABA (acide aminé synthétisé à partir du glutamate) pouvait stimuler l'expression de *BnNRT2*.

Par ailleurs, contrairement aux observations réalisées en conditions contrôlées, l'absorption a été maintenue jusqu'à un stade avancé du remplissage des siliques (Figure IV.2.B). Bien que cette observation ait déjà été faite, il est nécessaire de rappeler que cette situation correspondait à des conditions particulières de culture (cas de carence azotée pendant la période végétative, Schjoerring *et al.*, 1995). Dans l'étude présentée, ce maintien de l'absorption peut être le résultat combiné de :

- un apport hebdomadaire d'azote sous forme de nitrate marqué (à hauteur de 2,5 kgN.ha⁻¹), assurant ainsi une offre non limitante en azote sur chaque plante récoltée,
- un biais introduit lors de l'échantillonnage, aboutissant à la sélection de plantes plus développées que celles présentes dans le couvert,
- un apport régulier d'eau sous forme de précipitations au cours du printemps et de l'été, limitant dans ce cas l'effet néfaste d'une carence hydrique sur la mobilité du nitrate dans le sol.

3. Applications agronomiques

Bien que les résultats de cette expérimentation n'aient pas permis l'identification exacte des variables ou des facteurs impliqués dans la sénescence précoce foliaire, la construction d'un modèle compartimental dynamique à partir des données recueillies et s'appuyant sur une description mathématique simple de la cinétique de l'azote dans les différents tissus a cependant fourni un outil pour tester des hypothèses susceptibles d'améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote (se manifestant par une augmentation du rendement) ou de maximiser le remplissage en azote des siliques (*i.e.* la teneur en azote dans les graines). Il en résulte que :

- une diminution de la teneur en azote dans les feuilles du bas du couvert pourrait améliorer significativement la remobilisation de l'azote et permettre **une augmentation du rendement (à teneur constante à la récolte) ou de la teneur en azote (à rendement constant à la récolte)**.
- Dans nos conditions, le gain du rendement ou de la teneur en azote dans les graines apparaît comme faible (biais expérimental résultant d'un choix sélectif des plantes récoltées aboutissant à un rendement très élevé). Par conséquent, le calcul du gain de rendement ou de teneur en azote pour une culture de colza avec un rendement moyen de 36 quintaux.ha⁻¹ (correspondant à celui mesuré globalement sur la parcelle par l'exploitant agricole) a été choisi afin de mieux évaluer l'impact de l'augmentation des quantités d'azote remobilisé dans des conditions courantes de culture. Dans ce cas, les résultats issus des simulations montrent un accroissement de l'ordre de 15 % pour le rendement et la teneur en azote dans le cas du scénario le plus optimiste (Tableau V.III). **Une optimisation de la remobilisation apparaît donc comme un moyen efficace non seulement de réduire la quantité d'azote restituée au sol (-13kgN.ha⁻¹) mais aussi d'améliorer de façon significative le rendement du colza.**

CHAPITRE VII. PERSPECTIVES

VII. Perspectives

A. Absorption du nitrate par le colza et régulations associées

Cette étude a confirmé une réduction plus ou moins importante de l'absorption du nitrate lors de la floraison chez le colza. En effet, en conditions contrôlées, la chute drastique de l'absorption résulte de la diminution importante de l'activité des systèmes de transport HATS et LATS suggérant l'intervention de régulation *in planta* de l'expression et/ou de l'activité de ces systèmes de transport. Parmi les nombreuses hypothèses avancées pour expliquer la régulation de l'absorption, le modèle de Imsande et Touraine (1994) s'appuie notamment sur le pool d'acides aminés circulant à l'échelle de la plante entière capable, à partir d'une certaine taille critique, d'inhiber l'absorption racinaire du nitrate. Cependant, les résultats obtenus au cours de ce travail en conditions de plein champ ne vont pas dans ce sens. En effet, dans nos conditions expérimentales, il n'est pas apparu de relation claire entre l'absorption de l'azote et le pool d'azote endogène circulant (assimilable aux acides aminés circulant) dans la plante. Par conséquent, ce résultat suggère aussi l'implication d'autres facteurs, d'ordre endogène et/ou environnemental, pouvant modifier l'absorption du nitrate.

- Notre travail portant notamment sur le cycle met en évidence des phases critiques concernant la régulation de l'absorption du nitrate : une forte stimulation lors de la montaison et une réduction/inhibition importante après la transition florale. **Ces deux phases du développement pourraient constituer des conditions expérimentales intéressantes pour rechercher ou tester l'effet des signaux assurant ces régulations.** En effet, même s'il est communément admis que les acides aminés circulant exercent un effet négatif tant sur le plan physiologique que moléculaire (Lejay *et al.*, 1999), des résultats récents (Beuve *et al.*, 2004) montrent que des acides aminés comme le GABA peuvent stimuler l'absorption lors de la montaison.

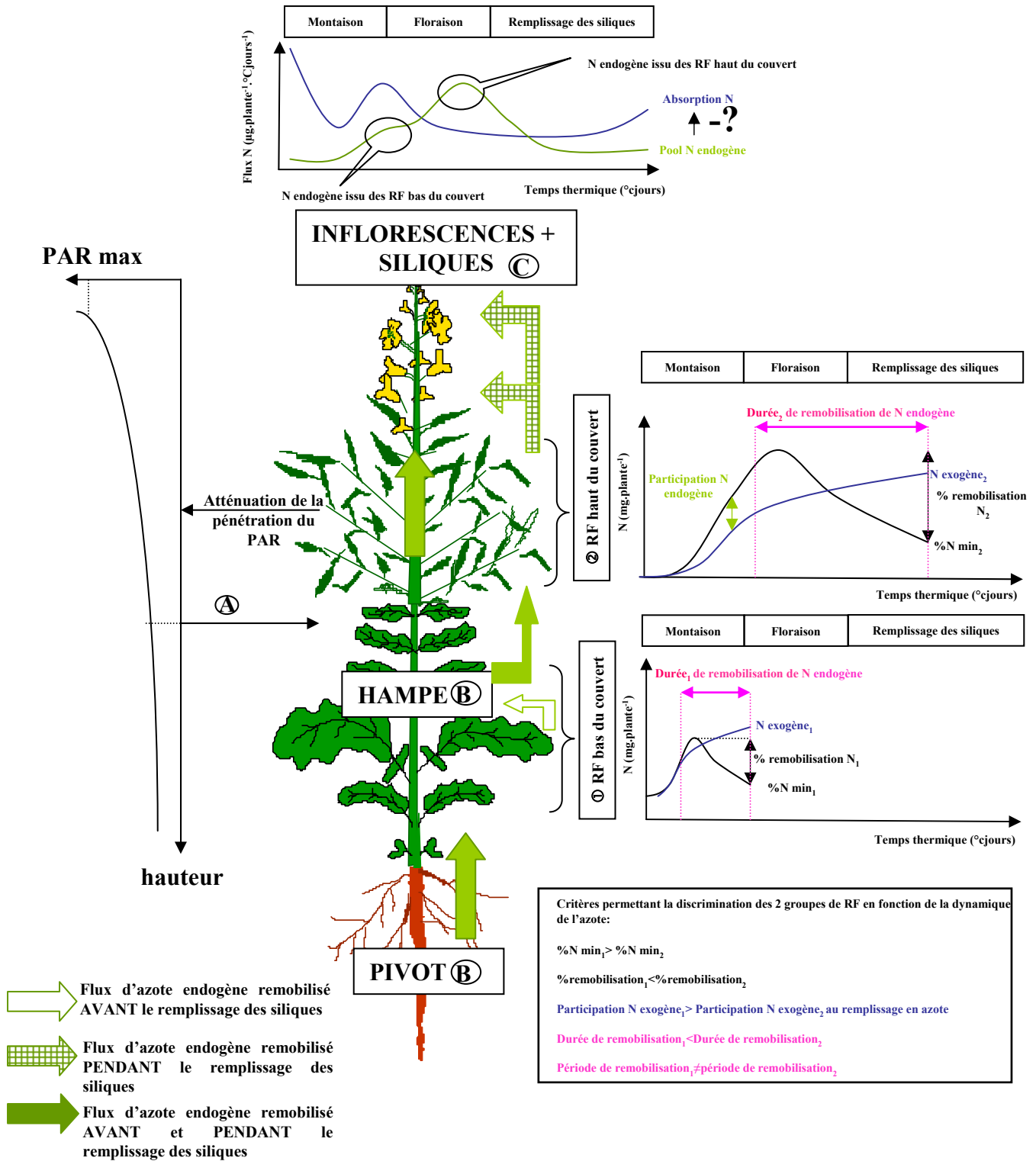
- Par ailleurs, nos expérimentations ont montré une réduction de l'activité de ces systèmes de transport lors de la transition jour/nuit ainsi que lors d'une exposition à des valeurs décroissantes de PAR (mais aussi en post-floraison, par exemple), suggérant **l'intervention de squelettes carbonés dans cette régulation.** Aussi, une expérimentation utilisant un double marquage $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ pourra être réalisée afin de préciser les flux de carbone

nouvellement fixé entre les parties aériennes et le système racinaire couplé à celui du nitrate absorbé.

- Les données utilisées pour la modélisation, issues de la banque colza, de même que les résultats rapportés par Rossato *et al.* (2001), montrent un arrêt de l'absorption après la floraison, alors que l'expérimentation que nous avons conduite en conditions de plein champ (forte pluviométrie notamment) montre que celle-ci peut être maintenue dans une certaine mesure. Les résultats divergents issus d'expérimentations réalisées en conditions contrôlées ou en conditions de plein champ, associés à d'autres observations rencontrées dans la bibliographie (Merrien *et al.*, 1988 ; Schjoerring *et al.*, 1995) semblent confirmer l'implication de facteurs environnementaux dans le contrôle du prélèvement en azote de la culture de colza pendant la floraison. Par exemple, **l'existence de contrainte hydrique en fin de cycle et son effet éventuel sur l'absorption du nitrate pourront être recherchés en analysant la discrimination naturelle du ^{13}C , révélant l'ampleur du stress hydrique.** L'emploi d'échantillons des expérimentations précédentes pourrait être envisagé.

- La construction du modèle d'absorption repose sur certaines simplifications et l'une d'entre elles concerne l'estimation indirecte de la biomasse racinaire. Le prélèvement en azote dépend des capacités d'absorption racinaire ainsi que de la taille du système racinaire. Il paraît donc nécessaire, dans un premier temps, **de quantifier précisément la part du système racinaire participant activement à l'absorption du nitrate.** Dans cette optique, un apport foliaire d'urée marquée pourra être réalisé afin de déterminer indirectement cette biomasse « active ». L'obtention de ces données permettra un ajustement du paramètre déjà intégré dans le modèle. Par la suite, cette méthodologie pourra être utilisée pour différents génotypes.

- Dans notre modèle, le nitrate est considéré comme la seule source de nutrition azotée : cette hypothèse repose sur le fait que cette espèce est considérée comme nitrophile. Cette hypothèse certes simplificatrice repose aussi sur le fait que les concentrations en ammonium du sol sont inférieures à celles du nitrate (par exemple, dans la banque colza, les concentrations en ammonium dépassent rarement 500 μM alors que celles du nitrate peuvent atteindre des valeurs proches de 7 mM). Toutefois, **il importerait de vérifier ce que l'absorption d'ammonium représente relativement à celle du nitrate**, même si cet objectif, s'il est appréhendé en conditions de plein champ, pose un certain nombre de difficultés méthodologiques.



Hypothèses proposées pour expliquer la faible capacité de remobilisation des RF du bas du couvert:

- (A) induction de la sénescence foliaire par l'atténuation de la pénétration du PAR?
- (B) limitation par l'absence de puits forts nécessaires au stockage de l'azote issu de la remobilisation foliaire?
- (C) asynchronie entre le début de remobilisation de l'azote foliaire et l'apparition des siliques?

Figure VII.1: Schéma de synthèse des principaux résultats et hypothèses de fonctionnement motivant les perspectives de recherche.

- **Le modèle d'absorption tel qu'il a été conçu doit pouvoir permettre d'identifier les processus pour lesquels il existe une variabilité génotypique.** Des expérimentations en plein champ utilisant quelques géotypes sélectionnés doivent fournir des données simples permettant d'identifier les écarts aux sorties du modèle pour chaque géotype. Par la suite, la recherche du paramètre ou de la variable d'entrée aboutissant à une sortie du modèle en adéquation avec les valeurs mesurées permettra l'identification du ou des facteurs de variation (I_m , température, PAR, par exemple), capable à son tour de guider les approches expérimentales nécessaires pour valider les hypothèses ainsi générées. Par exemple, il ressort des analyses de sensibilité que la quantité d'azote nitrique absorbé simulée était sensible à une variation de la valeur de l'influx maximal. Par conséquent, **l'utilisation de variétés caractérisées par des valeurs différentes de I_m associée à une exportation d'azote mesurée au champ permettrait de tester et de valider le modèle pour des cultivars différents.**

B. Remobilisation de l'azote chez le colza : variabilité environnementale et génotypique

Grâce à une approche expérimentale originale s'appuyant sur un marquage ^{15}N en conditions de plein champ combinée à une récolte très précise (séparation des rangs de feuilles), notre expérimentation a permis de suivre la dynamique de l'azote issu de l'absorption et de la remobilisation, en particulier dans les étages foliaires.

D'une part, l'analyse des flux d'azote a confirmé la contribution majeure de l'azote endogène au remplissage des siliques. D'autre part, il ressort de cette étude que la dynamique de l'azote dans le compartiment foliaire est complexe et hétérogène. En effet, la récolte rang par rang des feuilles vertes et de feuilles mortes a mis en évidence l'existence de deux populations de rangs de feuilles au sein du compartiment foliaire, chacune de ces populations bien que relativement hétérogène se caractérisant par (i) des teneurs résiduelles en azote, (ii) une participation de l'azote endogène, (iii) une durée de la remobilisation et (iiii) une date de début de remobilisation différentes au cours du cycle de culture (Figure VII.1).

Il faut en effet considérer que chaque rang foliaire en interaction avec le reste de la plante s'insère dans un réseau trophique en constante évolution (rapport potentiel sources/puits variable au cours du développement) régi en particulier par la morphogenèse. Le développement d'une feuille est aussi conditionné par son environnement (notamment thermique et lumineux) qui est lui aussi modifié par l'architecture du végétal. L'une des faiblesses majeures de notre travail, consistant à développer une modélisation dynamique des flux azotés, tient au fait qu'aucun asservissement au microclimat local n'a été considéré (essentiellement pour des raisons de faisabilité et de logistique).

Malgré une discrimination plus précise des RF en fonction de l'ensemble de ces critères, le déterminisme exact du recyclage de l'azote (*i.e.* pilotage de la remobilisation par les source et/ou les puits, effet de l'environnement) n'a pas été clairement établi, même si plusieurs hypothèses à la suite de ce travail peuvent être émises et pourront être expérimentalement vérifiées.

- **Une meilleure prise en compte de l'effet de l'environnement thermique et lumineux sur la dynamique des flux d'azote** pourrait être possible en travaillant sur des systèmes simplifiés (en se limitant par exemple à deux rangs de feuilles ayant une dynamique très contrastée). Il serait ainsi possible d'associer :

- une **approche « plante entière »** permettant de suivre la dynamique de l'azote dans les deux populations de feuilles et la pénétration du PAR (Figure VII.1A),
- une **approche moléculaire** en mesurant l'activité et l'expression des gènes impliqués dans le processus de sénescence foliaire (SAG 12, GDH, GS).

Cette approche expérimentale pourrait être couplée à des régimes variables de PAR et de températures, ce qui permettrait d'extrapoler les courbes de réponse obtenues à l'ensemble des feuilles. Outre la vérification de l'hypothèse testée, cette expérimentation permettra de prendre en compte une variable environnementale et un outil de transfert des résultats obtenus en conditions contrôlées (*i.e.* repérage de rangs de feuilles recevant la même intensité lumineuse).

- L'absence de puits suffisamment développés pour recevoir et stocker l'azote foliaire pourrait également contribuer à la limitation de la capacité de remobilisation foliaire (Figure

VII.1B). Cette hypothèse a déjà été émise par Rossato *et al.* (2001) en conditions contrôlées lors de l'étude de la cinétique d'accumulation/remobilisation de l'azote sous forme de VSP (Vegetative Storage Proteins) dans le pivot à la floraison, mettant en évidence l'existence de compartiments tampon nécessaires au stockage provisoire de l'azote avant le remplissage des organes reproducteurs. Par ailleurs, les modifications expérimentales de relations source/puits menées par Noquet *et al.* (2003) en conditions de plein champ ont montré que la suppression des fleurs ou des siliques entraînait un retard de l'induction de la sénescence foliaire, étayant l'hypothèse d'une relation entre l'induction de la sénescence foliaire et l'apparition de nouveaux puits reproducteurs. Cependant, il faut signaler que, dans les travaux cités, l'ensemble du compartiment foliaire est pris en compte. Dans notre cas, la faible capacité de remobilisation des feuilles du bas du couvert pourrait être, outre le déclenchement précoce de la sénescence, le résultat de l'absence de puits capables de recevoir l'azote remobilisé. Par conséquent, deux expérimentations pourront être mises en place afin de tester cette hypothèse, reposant sur l'utilisation de :

- géotypes présentant des **dates variables de floraison** (précoce, semi-tardive, tardive) afin de réduire l'asynchronisme existant entre le début de la remobilisation de l'azote foliaire et l'apparition des siliques (Figure VII.1C),
- géotypes se différenciant par une **morphologie contrastée** avec par exemple une taille variable de la tige (variété naine, semi-naine, normale) ou des variétés buissonnantes afin d'augmenter la multiplicité des puits et donc la taille du puits présent lors de la phase précoce de remobilisation observée au cours de la reprise de végétation.

Une troisième alternative pourrait consister à modifier le développement des puits chez un même géotype (par exemple en réduisant expérimentalement la température locale) afin d'en évaluer l'impact sur le vidage en azote des différents étages foliaires.

CHAPITRE VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VIII. Références bibliographiques

- Amarasingh B.H.R.R., de Bruxelles G.L., Braddon M., Onyeocha I., Forde B.G. & Udvardi M.K. (1998).** Regulation of *GmNrt2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*, 206 : 44-52.
- Anten, N.P.R., Schieving, F., Werger, M.J.A. (1995).** Patterns of light and nitrogen distribution in relation to whole canopy carbon gain in C₃ and C₄ mono- and dicotyledonous species. *Oecologia* 101, 504-513.
- Augustinussen E. (1987).** The influence of nitrogen fertilization on growth and development of winter oilseed rape. *Dan. J. Plant Sci.*, 91 : 301-311.
- Backx M., van Duivenvoorden J. & Goudriaan J. (1984).** Simulation of the production pattern of rape-seed on the basis of a field experiment. *Nether. J. Agric. Sci.*, 32 : 247-250.
- Bancal P. & Soltani F. (2002).** Source-sink partitioning. Do we need Münch? *J. Exp. Bot.*, 53 : 1919-1928.
- Ben Zioni A., Vaadia Y. & Lips S.H. (1971).** Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiol. Plant.*, 24 : 288-290.
- Beuve N., Rispaill N., Laîné P., Cliquet J.-B., Ourry A. & Le Deunff E. (2004).** Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant cell Env.*, sous presse.
- Bidin A.A. (1985).** Phosphate in Malaysia ultisols and oxisols as evaluated by a mechanistic model. *Soil Sci.*, 139 : 500-504.
- Boelcke B., Léon J., Schulz R.R., Schröder G. & Diepenbrock W. (1991).** Yield stability of winter oil-seed rape (*Brassica napus* L.) as affected by stand establishment and nitrogen fertilization. *J. Agron. Crop Sci.*, 167 : 241-248.
- Breteler H. & Arnosis P.A. (1985).** Effet of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf-bean. *Phytochemistry*, 24 : 653-658.
- Breteler H. & Nissen P. (1982).** Effects of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant physiol.*, 70 : 754-759.
- Brisson N., Mary B., Ripoche D., Jeuffroy M.H., Ruget F., Nicoullaud B., Gate P., Devienne-Barret F., Antonioletti R., Durr C., Richard G., Beaudoin N., Recous S., Tayot X., Plenet D., Cellier P., Machet J.M., Meynard J.M. & Delécolle R. (1998).**

- STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie*, 18 : 311-346.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2001).** Constancy of nitrogen turnover kinetics in the plant cell: insights into the integration of subcellular N fluxes. *Planta*, 213 : 175-81.
- Britto D.T. & Kronzucker H.J. (2002).** NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.*, 159 : 567-584.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2003).** Ion fluxes and cytosolic pool sizes: examining fundamental relationships in transmembrane flux regulation. *Planta*, 217 : 490-7.
- Buchanan-Wollaston V., Earl S., Harisson E., Mathas E., Navabpour S., Page T., Pink D. (2003).** The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotech. J.*, 1 : 3-22.
- Cacco G., Sidari M., Gelsomino A. & Orsega E.F. (2002).** An attempt to model the induction and feedback inhibition of nitrate uptake in wheat seedlings. *J Plant. Nutr.*, 25 : 17-25.
- Caloin M. & Yu O. (1984).** Analysis of the time course change in nitrogen content of *Dactylis glomerata* L. using a model of plant growth. *Ann. Bot.*, 54 : 69-76.
- Càrdenas-Navarro R., Adamowicz S. & Robin P. (1998).** Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants: test of a feedback-based model. *J. Exp. Bot.*, 49 : 721-730.
- Càrdenas-Navarro R., Adamowicz S., Gojon A. & Robin P. (1999).** Modelling nitrate influx in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. *J. Exp. Bot.*, 50 : 625-635.
- Cerezo M, Flors V V, Legaz F, Garcia-Agustin P (2000).** Characterization of the low affinity transport system for NO₃⁽⁻⁾ uptake by Citrus roots. *Plant Sci.*, 160 : 95-104.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Munos S., Daniel-Vedele F. & Gojon A. (2001).** Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of NRT2.1 and NRT2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127 : 262-271.
- Chamorro A.M., Tamagno L.N., Bezus R. & Sarandón S.J. (2002).** Nitrogen accumulation, partition, and nitrogen-use efficiency in canola under different nitrogen availabilities. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 33 : 493-504.
- Chapman J.F., Daniels R.W. & Scaisbrick D.H. (1984).** Field studies on ¹⁴C assimilate fixation and movement in oil-seed rape (*Brassica. napus*). *J. Agr. Sci.*, 102 : 23-31.

- Charles-Edwards D.A., Stutzel H., Ferraris R. & Beech D.F. (1987)** An analysis of spatial variation in the nitrogen content of leaves from different horizons within the canopy. *Ann. Bot.*, 60 : 421-426.
- Clarkson D.T., Hopper M.J. & Jones L.H.P. (1986)**. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*. I. Solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- . *Plant Cell Env.*, 9 : 535-545.
- Clarkson D.T., Jones L.H.P. & Purves J.V. (1992)**. Absorption of nitrate and ammonium ions by *Lolium perenne* from flowing solution cultures at low root temperatures. *Plant Cell Envir.*, 15 : 99-106.
- Colnenne C., Meynard J.M., Reau R., Justes E. & Merrien A. (1998)**. Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Ann. Bot.*, 81 : 311-317.
- Colnenne C., Meynard J.M., Roche R. & Reau R. (2002)**. Effects of nitrogen deficiencies on autumnal growth of oilseed rape. *Eur. J. Agron.*, 17 : 11-28.
- Cooper H.D. & Clarkson D.T. (1989)**. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals. A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.*, 40 : 753-762.
- Crawford N.M. (1995)**. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7 : 859-868.
- Daniels R.W., Scarisbrick D.H. & Smith L.J. (1986)**. Oilseed rape physiology. In *Oilseed rape* Scarisbrick D H and R W Daniels eds, London, pp 83-126.
- Dejoux J.F. (1999)** Evaluation d'itinéraires techniques du colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. Thèse de doctorat, INA P-G, Paris, 244 p. + annexes.
- Dejoux J.F., Recous S., Meynard J.M., Trinsoutrot I. & Leterme P. (2000)**. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant Soil*, 218 : 257-272.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1995)**. Diurnal regulation of NO_3^- in soybean plants I. Changes in NO_3^- influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *J. Exp. Bot.*, 46 : 1585-1594.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P. & Passama L. (1996)**. Diurnal regulation of NO_3^- in soybean plants IV. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. *J. Exp. Bot.*, 47 : 893-900.
- Diepenbrock W. (1981)**. Effect of light, temperature and nitrogen treatments upon the fatty acid composition of young and older leaves from winter rape plants. *Physiol. Plant.*, 52 : 1-6.

- Diepenbrock W. (2000).** Yield analysis of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. *Field Crops Res.*, 67 : 35-49.
- Doddema H. & Telkamp G.P. (1979).** Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana* disturbed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.*, 45 : 332-338.
- Dreccer M.F., Grashoff C. & Rabbinge R. (1997).** Source-sink ratio in barley (*Hordeum vulgare* L.) during grain filling: effects on senescence and grain protein concentration. *Field Crops Res.*, 49 : 269-277.
- Dreccer M.F., Schapendonk A.H.M., Slafer G.A. & Rabbinge R. (2000).** Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply : absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stage determining yield. *Plant Soil*, 220 : 189-205.
- Faure-Rabasse S., Le Deunf E., Lainé P., Macduff J.H. & Ourry A. (2002).** Effects of nitrate pulses on *BnNRT1* and *BnNRT2* genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L.. *J. Exp. Bot.*, 53 : 1711-1721.
- Feller U. & Fisher A. (1994).** Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Rev. Plant Sc.*, 13 : 241-273.
- Filleur S. & Daniel-Vedele F. (1999).** Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*, 207 : 461-469.
- Filleur S., Dorbe M.F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A. & Daniel-Vedele F. (2001).** An Arabidopsis T-DNA mutant affected in NRT2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.*, 489 : 220-224.
- Forde B.G. (2002).** Local and long-range signalling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53 : 203-224.
- Forde B.G. & Clarkson D.T. (1999).** Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. In J A Ellow, eds, *Advances in Botanical Research*, vol.30, Incorporating *Advances in Plant pathology*. Academic press, New-York, pp 1-90.
- Fraisier V., Dorbe M.F. & Daniel-Vedele F. (2001).** Identification and expression analysis of two genes encoding putative low-affinity nitrate transporters from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol. Biol.*, 45 : 181-190.

- Fujiki Y., Yoshikawa Y., Sayo T., Inada N., Ito M., Nishida I. and Watanabe A. (2001).** Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant.*, 111 : 345-352.
- Gabrielle B., Denoroy P., Gosse G., Justes E. & Andersen M.N. (1998a).** Development and evaluation of a CERES-type model for winter oilseed rape. *Field Crops Res.*, 57 : 95-111.
- Gabrielle B., Denoroy P., Gosse G., Justes E. & Anderson M.N. (1998b).** A model of leaf area development and senescence of winter oilseed rape. *Field Crops Res.*, 57 : 209-222.
- Gabrielle B., Recous S., Tuck G., Bradbury N.J. & Nicolardot B. (2001).** Ability of the SUNDIAL model to simulate the short-term dynamics of ^{15}N applied to winter wheat and oilseed rape. *J. Agr. Sci.*, 137 : 157-168.
- Gan S & Amasino R (1997).** Making sense of senescence, molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.*, 113 : 313-319.
- Gillespie A.R. & Pope P.E. (1990).** Rhizosphere acidification increases phosphorus recovery of black locust: II. Model predictions and measured recovery *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54 : 538-541.
- Glass A.D.M. & Siddiqi M.Y. (1995).** Nitrogen absorption by plant roots. In Nitrogen nutrition in higher plants, H.S. Srivastava et R.P. Singh, eds (New Delhi: Associated Publishing Co.), pp 21-56.
- Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. & Rufty T.W. (1990).** Studies of the uptake of nitrate in barley II. Energetics. *Plant Physiol.*, 93 : 1585-1589.
- Glass A.D.M., Shaff J. & Kochian L.V. (1992).** Studies of the uptake of nitrate in barley IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.*, 99 : 456-463.
- Gosse G., Cellier P., Denoroy P., Gabrielle B., Laville P., Leviel B., Justes E., Nicolardot B., Mary B., Recous S., Germon J.C., Hénault C. & Leech P.K. (1999).** Water, carbon and nitrogen cycling in a rendzina soil cropped with winter rape: the Châlons oilseed rape database. *Agronomie*, 19 : 119-124.
- Grindlay D.J.C. (1997).** Towards an explanation of crop nitrogen demand based on the optimization of leaf nitrogen per unit leaf area. *J. Agr. Sci.*, 128 : 377-396.
- Guo F.Q., Wang R., Chen M. & Crawford N.M. (2001).** The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell*, 13 : 1761-1777.

- Habekotté B. (1993).** Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) under field conditions. *Field Crops Res.*, 35 : 21-33.
- Habekotté B. (1997a).** A model of the phenological development of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Field Crops Res.*, 54 : 127-136.
- Habekotté B. (1997b).** Evaluation of seed yield determining factors of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) by means of crop growth modelling. *Field Crops Res.*, 54 : 137-151.
- Habekotté B. (1997c).** Identification of strong and weak yield determining components of winter oilseed rape compared with winter wheat. *Eur. J. Agron.*, 7 : 315-321.
- Hallmark W.B. & Huffaker R.C. (1978).** The influence of ambient nitrate, temperature, and light on nitrate assimilation in grass seedlings. *Physiol. Plant.*, 44 : 147-152.
- Hansen G.K. (1980).** Diurnal variation of root respiration rates and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. *Physiol. Plant.*, 48 : 421-427.
- Hansen S., Jensen H.E., Nielsen N.E. & Svendsen H. (1991).** Simulation of nitrate dynamics and biomass production in winter wheat using the Danish simulation model Daisy. *Fert. Res.*, 27 : 245-259.
- Hardwick R.C. (1987).** The nitrogen content of plants and the self-thinning rule of plant ecology: a test of core-skin hypothesis. *Ann. Bot.*, 60 : 439-446.
- Hirose, T., Werger, M.J.A. (1987a).** Nitrogen use efficiency in instantaneous and daily photosynthesis of leaves in the canopy of a *Solidago altissima* stand. *Physiol. Plant.*, 70 : 215-222.
- Hirose, T., Werger, M.J.A. (1987b).** Maximizing daily canopy photosynthesis with respect to the of leaf nitrogen allocation pattern in the canopy. *Oecologia* 72, 520-526.
- Hirose, T., Werger, M.J.A., Pons, T.L., van Rheenen, J.W.A. (1988).** Canopy structure and leaf nitrogen distribution in a stand of *Lysimachia vulgaris* L. as influenced by stand density. *Oecologia* 77, 145-150
- Hocking P.J., Randall P.J. & DeMarco D. (1997).** The response of dryland canola to nitrogen fertilizer : partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crop Res.*, 54 : 201-220.
- Hoffland E., Bloemhof H.S., Leffelaar P.A., Findenegg G.R & Nelemans J.A. (1990).** Simulation of nutrient uptake by a growing root system considering increasing root density and inter-root competition. *Plant Soil*, 124 : 149-155.

- Huang N.C., Chiang C.S., Crawford N.M. & Tsay Y.F. (1996).** CHL1 encodes a component of the low affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type specific expression in roots. *Plant Cell*, 8 : 2183-2191.
- Huang N.C., Liu K.H., Lo H.J. & Tsay Y.F. (1999).** Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*, 11 : 1381-1392.
- Imbardi J. & Touraine B. (1994).** N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. *Plant Physiol.*, 105 :3-7.
- Jackson W.A., Volk R.J. & Tucker T.C. (1972).** Apparent induction of nitrate uptake in nitrate-depleted plants. *Agron. J.* 64 : 518-524.
- Jamieson P.D., Semenov M.A., Brooking I.R. & Francis G.S. (1998).** *Sirius*: a mechanistic model of wheat response to environmental variation. *Eur. J. Agron.*, 8 : 161-179.
- Jamieson P.D. & Semenov M.A. (2000).** Modelling nitrogen uptake and redistribution in wheat. *Field Crops Res.*, 68 : 21-29.
- Jensen L.S., Christensen L., Mueller T. & Nielsen N.E. (1997).** Turnover of residual N-15-labelled fertilizer N in soil following harvest of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil*, 190 : 193-202.
- Jeuffroy M.H., Ney B. & Ourry A. (2002).** Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. *J. Exp. Bot.*, 53 : 809-823.
- Jiang C-Z., Rodermel S.R. & Shibes R.M. (1993)** Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing soybean leaves. *Plant Physiol.*, 101 : 105-112.
- Justes E., Mary B., Meynard J.M., Machet J.M. & Thelier-Huché L. (1994).** Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Ann. Bot.*, 74 : 397-407.
- Justes E., Denoroy P., Gabrielle B. & Gosse G. (2000).** Effect of crop nitrogen status and temperature on the radiation use efficiency of winter oilseed rape. *Eur. J. Agron.*, 13 : 165-177.
- Kappen L., Hammler A. & Schutz G. (1998).** Seasonal changes in the photosynthetic capacity of winter rape plants under different nitrogen regimes measured in the field. *J. Agron. Crop Sci.*, 181 : 179-187.
- Kelly M., Barber S.A. & Edwards G.S. (1992).** Modelling magnesium, phosphorus and potassium uptake by loblolly pine seedlings using a Barber-Cushman approach. *Plant Soil*, 139 : 209-218.

- King B. J., Siddiqi M. Y., Ruth T. J., Warner R. L. & Glass ADM (1993).** Feedback Regulation of Nitrate Influx in Barley Roots by Nitrate, Nitrite, and Ammonium. *Plant Physiol.*, 102: 1279-1286.
- Kleemola J., Teittinen M. & Karvonen T. (1996).** Modelling crop growth and biomass partitioning to shoots and roots in relation to nitrogen and water availability, using maximization principle I. Model description and validation. *Plant Soil*, 185 : 101-111.
- Krapp A., Fraiser V., Scheible R.R., Quesada A., Gojon A., Stitt M., Caboche M. & Daniel-Vedele F. (1998).** Expression studies of *RT2:INp*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J.*, 14 : 723-731.
- Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y. & Glass A. (1995).** Analysis of $^{13}\text{NH}_4^+$ Efflux in Spruce Roots. A Test Case for Phase Identification in Compartmental Analysis. *Plant Physiol.* 109 : 481-490.
- Kullman A. & Geisler G. (1986).** Translocation of labelled nitrogen in oilseed rape. In Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Lambers H., Neeteson J. J. & Stulen I. (Eds), Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster pp 127-129.
- Lainé P., Ourry A., Macduff J.H., Boucaud J. & Salette J. (1993).** Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiol. Plant.*, 88 : 85-92.
- Lainé P., Ourry A. & Boucaud J. (1995).** Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. *Planta*, 196 : 77-83.
- Lainé P., Ourry A., Boucaud J. & Salette J. (1998).** Effects of a localized supply of nitrate on NO_3^- uptake rate and growth of roots in *Lolium multiflorum* Lam. *Plant Soil*, 202 : 61-67.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R. & Coruzzi G.M. (1996).** The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47 : 569-593.
- Lauter F.R., Ninneman O., Bucher M., Riesmeier J.W. & Frommer W.B. (1996).** Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 8139-8144.
- Lawlor D.W. (2002).** Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *J. Exp. Bot.*, 53 : 773-787.
- Le Bot J. & Kirkby E.A. (1992).** Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *J. Plant Nutr.*, 15 : 247-264.

- Le Bot J., Adamowicz S. & Robin P. (1998).** Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Sci. Hortic.*, 74 : 47-82.
- Lee R.B. (1982).** Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Ann. Bot.*, 50 : 429-449.
- Lee R.B., Purves J.V., Ratecliffe R.G., & Saker L.R. (1992).** Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. *J. Exp. Bot.*, 43 : 525-535.
- Lejay L., Tillard P., Lepetit M., Olive F.D., Filleur S., Daniel-Vedele F. & Gojon A. (1999).** Molecular and functional regulation of NO₃⁻ uptake systems by N- and C- status of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 18 : 509-519.
- Lejay L., Gansel X., Cerezo M., Tillard P., Müller C., Krapp A., von Wirén N., Daniel-Vedele F. & Gojon A. (2003)** Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell*, 15 : 2218-2232.
- Leleu O., Vuylstecker C., Têtu J.F., Degrande D., Champolivier L. & Rambour S. (2000).** Effect of two contrasted N fertilisations on rapeseed growth and nitrate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.*, 38 : 639-645.
- Lemaire G. & Millard P. (1999).** An ecophysiological approach to modelling resource fluxes in competing plants. *J. Exp. Bot.*, 50 : 15-28.
- Lemaire G. & Salette J. (1984).** Relation entre dynamique de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. II. Etude de l'effet du milieu. *Agronomie*, 4 : 423-430.
- Léon M., Lainé P., Ourry A. & Boucaud J. (1995).** Increased uptake of native soil nitrogen by roots of *Lolium multiflorum* Lam. after nitrogen fertilization is explained by a stimulation of the uptake process itself. *Plant Soil*, 173 : 197-203.
- Lhuillier-Soundélé A., Munier-Jolain N.G. & Ney B. (1999).** Influence of nitrogen availability on seed nitrogen accumulation in pea. *Crop Sci.*, 39 : 1741-1748.
- Liu K.H., Huaug C.Y. & Tsay Y.F. (1999).** CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, 11 : 865-874.
- Macduff J.H., & Hopper M.J. (1986).** Effects of root temperature on uptake of nitrate and ammonium by barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in flowing solution culture. *Plant Soil*, 91 : 303-306.
- Macduff J.H., Hopper M.J. & Wild A. (1987).** The effect of root temperature on growth and uptake of ammonium and nitrate by *Brassica napus* L. in flowing solution culture. *J. Exp. Bot.*, 38 : 53-66.

- Macduff J.H. & Jackson S.B. (1991).** Growth and preference for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. *J. Exp. Bot.*, 42 : 521-530.
- Mäck G. & Tischner R. (1990).** The effect of endogenous and externally supplied nitrate on nitrate uptake and reduction in sugar beet seedlings. *Planta*, 182 : 169-173.
- Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B. & Ourry A. (2004a).** Modeling Nitrogen Uptake in Oilseed Rape cv Capitol during a Growth Cycle Using Influx Kinetics of Root Nitrate Transport Systems and Field Experimental Data. *Plant Physiol.*, 134 : 388-400.
- Malagoli P., Lainé P., Rossato L. & Ourry A. (2004b)** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest. I. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape from bolting to harvest. Submitted to *Annal. Bot. editors*.
- Masclaux C., Valadier M.H., Brugiere N., Morot-Gaudry J.F. & Hirel B. (2000)** Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, 211 : 510-518.
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H. & Krautler B. (1996)** Chlorophyll Breakdown in senescent Leaves. *Plant Physiol.*, 112 : 1403-1409.
- Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A. & Stitt M. (2001).** The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant Cell Environ.*, 24 : 177-190.
- Mattson M., Lundborg T., Larsson M. & Larsson C.M. (1992).** Nitrogen utilization in N-limited barley during vegetative and generative growth III. Post-anthesis kinetics of net nitrate uptake and the role of the relative root size in determining the capacity for nitrate acquisition. *J. Exp. Bot.* 43 : 25-30.
- Mendham N.J., Shipway P.A. & Scott R.K. (1981).** The effects of delayed sowing and weather on growth, development and yield of winter oil-seed rape (*Brassica napus*). *J. Agr. Sc.*, 96 : 389-416.
- Merrien A., Palleau J.P. & Maisonneuve C. (1988).** Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. In : Physiologie et élaboration du rendement Colza, Cetiom Editions, Paris, pp 34-46.

- Mickelson S., See D., Fletcher D.M., Garner J.P., Foster C.R., Blake T.K & Fischer A.M. (2003).** Mapping of QTL associated with nitrogen storage and remobilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J. Exp. Bot.*, 54 : 801-812.
- Minchin P.H.H., Thorpe M.R. & Farrar J.F. (1993).** A simple mechanistic model of phloem transport which explains sink priority. *J. Exp. Bot.*, 44 : 947-955.
- Muldin I. & Ingemarsson B. (1995).** A cDNA from *Brassica napus* L. encoding a putative nitrate transporter. *Plant Physiol.*, 108 : 1341.
- Muller B. & Touraine B. (1992).** Inhibition of NO₃⁻ uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.*, 43 : 617-623.
- Nanda R., Barghava S.C. & Rawson H.M. (1995).** Effect of sowing date on rates of leaf appearance, final leaf numbers and areas in *Brassica campestris*, *B. juncea*, *B. napus* and *B. carinata*. *Field Crops Res.*, 42 : 125-134.
- Nazoa P., Vidmar J.J., Timothy J.T., Transbarger T.J., Mouline K., Damiani I., Tillard P., Zhuo D., Glass A.D.M. & Touraine B. (2003).** Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stages. *Plant Mol. Biol.*, (in press).
- Ney B., Doré T. & Sagan M. (1997).** Grain legumes. IN: Lemaire G., ed. *Diagnosis of the nitrogen status in crops*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 107-117.
- Noquet C., Avice J.-C., Rossato L., Beauclair P., Henry M.-P & Ourry A. (2003).** Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein in accumulation in *Brassica napus* L.. *Plant Sci.*, 166 : 1007-1018.
- Ogunlela V.B., Kullman A., Geisler G. (1990).** Nitrogen distribution and dry matter accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) as influenced by N nutrition. *J. Agr. Crop Sci.*, 164 : 321-333.
- Okada K., Inoue Y., Satoh K. & Katho S. (1992).** Effects of light on degradation of chlorophyll and proteins during senescence of detached rice leaves. *Plant Cell Physiol.*, 33 : 1183-1191.
- Okamoto M., Vidmar J. & Glass A.D.M. (2003).** Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol.*, 44 : 304-317.
- Ono K. & Watanabe A. (1997).** Levels of endogenous sugars, transcripts of *rbcS* and *rbcL*, and of RuBisCo protein in senescing sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.*, 38 : 1032-1038.

- Ono F., Frommer W.B. & von Wiren N. (2000).** Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato. *Plant Biology*, 2 : 17-23.
- Ourry A., Kim TH., Boucaud J. (1994).** Nitrogen Reserve Mobilization during Regrowth of *Medicago sativa* L. Relationships between Availability and Regrowth Yield. *Plant Physiol.*, 105 : 831-837.
- Ourry A., Gordon, A.J. & Macduff J.H. (1997).** Nitrogen uptake and assimilation in roots and root nodules. In "A molecular approach to primary metabolism in higher plants", eds C. Foyer et P. Quick, Taylor and Francis publishers (London Washington), pp 237-253.
- Petersen C.T., Jørgensen U., Svendsen H., Hansen S., Jensen H.E. & Nielsen N.E. (1995).** Parameter assessment for simulation of biomass production and nitrogen uptake in winter rape. *Eur. J. Agron.*, 4 : 77-89.
- Peuke A.D. & Jeschke W.D. (1993).** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I growth with ammonium or nitrate as nitrogen source. *J. Exp. Bot.*, 44 : 1167-1176.
- Peuke A.D., Glaab J., Kaiser W.M. & Jeschke W.D. (1996).** The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. I Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. *J. Exp. Bot.*, 47 : 377-385.
- Quesada A., Krapp A., Trueman L.J., Daniel-Vedele F., Fernandez E., Forde B.G. & Caboche M. (1997).** PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol. Biol.*, 34 : 265-274.
- Quillére I. & Triboï-Blondel A.M. (1988).** Les mouvements d'assimilats chez le colza d'hiver: II. Importance et rôle des réserves carbonées. In CETIOM, eds, Physiologie et élaboration du rendement. Paris, pp. 54-59.
- Rao K.P. & Rains D.W. (1976).** Nitrate Absorption by Barley I. Kinetics and energetics. *Plant Physiol.*, 57 : 55-58.
- Rao M.S.S., Mendham N.J. & Buzza G.C. (1991).** Effect of the apetalous flower character on radiation distribution in the crop canopy, yield and its components in oilseed rape (*Brassica napus*). *J. Agr. Sci.*, 117 : 189-196.
- Redinbaugh M.G. & Campbell W.H. (1991).** Higher Plant responses to environmental nitrate. *Physiol. Plant.*, 82 : 640-650.

- Rode J.C. (1988).** Etude de quelques aspects de la croissance du colza de printemps en relation avec les déplacements d'assimilats. In CETIOM, eds, Physiologie et élaboration du rendement. Paris, pp. 78-90.
- Rodgers C.O. & Barneix J. (1988).** Cultivar differences in the rate of nitrate uptake by intact wheat plants as related to growth rate. *Physiol. Plant.*, 72 : 121-126.
- Rood S.B., Major D.J. & Charnetski W.A. (1984).** Seasonal changes in $^{14}\text{CO}_2$ assimilation and ^{14}C translocation in oilseed rape. *Field Crops Res.*, 8: 341-348.
- Rossato L., Lainé P. & Ourry A. (2001).** Nitrogen storage and remobilisation in *Brassica napus* L. during the growth cycle : nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J. Exp. Bot.*, 52 : 1655-1663.
- Rossato L., Macduff J.H., Lainé P., Le Deunff E. & Ourry A. (2002).** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *J. Exp. Bot.*, 53 : 1131-1141.
- Sanetra C. M., Ito O., Virmani S. M. & Vlek P. L. G. (1998).** Remobilization of nitrogen from senescing leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Milsp.): genotypic differences across maturity groups? *J. Exp. Bot.*, 49 : 853-862.
- Scaife A. (1989).** A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant soil*, 114 : 139-141.
- Scaife A. & Schloemer S. (1994).** The diurnal pattern of nitrate uptake and reduction by spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Ann. Bot.*, 73 : 337-343.
- Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R. & Mogensen V.O. (1995).** Nitrogen incorporation and remobilisation in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant Soil*, 177 : 255-264.
- Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J. & Rufty T.M. (1990).** Studies of the uptake of nitrate in barley I. Kinetics of NO_3^- influx. *Plant Physiol.*, 93 : 1426-1432.
- Sieling K. & Christen O. (1997).** Effect of preceding crop combination and N fertilization on yield of six oil-seed rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Eur. J. Agron.*, 7 : 301-306.
- Silberbush M. & Barber S.A. (1983).** Sensitivity analysis of parameters used in simulating K uptake with a mechanistic mathematical model. *Agron. J.*, 75 : 851-854.
- Sinclair T.R. & deWit C.T. (1975).** Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science*, 18 : 565-567.

- Sinclair T. R., Amir .J. (1992).** A model to assess nitrogen limitations on the growth and yield of springwheat. *Field Crop Res.*, 30 : 63-78.
- Smart C., Monéger F. & Leaver C. J. (1994).** Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell*, 6 : 811-825.
- Smith C.J., Whitfield D.M., Gyles O.A. & Wright G.C. (1989).** Nitrogen fertilizer balance of irrigated wheat grown on red-brown earth in southeastern Australia. *Field Crops Res.*, 21 : 265-275.
- Soussana J.F., Minchin F.R., Macduff J.H., Raistrick N., Abberton M.T. & Michaelson-Yeates T.P.T. (2002).** A simple model of feedback regulation for nitrate uptake and N fixation in contrasting phenotypes of white clover. *Ann. Bot.*, 90 : 139-147.
- Steingrobe B. & Schenk M.K. (1997).** Calculation of the total nitrate of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by use of a mathematical model to simulate nitrate inflow. *Z. Pflanz. Bodenkunde*, 160 : 73-79.
- Stockdale E.A., Gaunt J.L. & Vos J. (1997).** Soil-plant nitrogen dynamics: what concepts are required? *Eur. J. Agron.*, 7 : 145-159.
- Stockle C.O. & Debaeke P. (1997).** Modelling crop nitrogen requirements: a critical analysis. *Eur. J. Agron.*, 7: 161-169.
- Stockle C.O. & Nelson R. (1996).** Cropsyst user's manual. Biological systems engineering department, Washington State University, Pullman, WA. 186 pp.
- Tabourel-Tayot F. & Gastal F. (1998a).** MecaNiCAL, a supply-demand model of carbon and nitrogen partitioning applied to defoliated grass I. Model description and analysis. *Eur. J. Agron.*, 9 : 223-241.
- Tabourel-Tayot F. & Gastal F. (1998b).** MecaNiCAL, a supply-demand model of carbon and nitrogen partitioning applied to defoliated grass II. Parameter estimation and model evaluation. *Eur. J. Agron.*, 9: 243-258.
- Téo Y.H., Beyrouthy C.A. & Gbur E.E. (1995).** Evaluation of a model to predict nutrient uptake by field-grown rice. *Agron. J.*, 87 : 7-12.
- Thomsen I.K. & Christensen B.T (1998).** Cropping system and residue management effects on nitrate leaching and crop yields. *Agr.,Ecos. Env.*, 68 : 73-84
- Tillard P., Passama L. & Gojon A. (1998).** Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO₃⁻ uptake in *Ricinus communis* plants? *J. Exp. Bot.*, 49 : 1371-1379.
- Tittonel E.D., Chaput J.P., Letoublon F. & Bonnot O. (1988).** Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. *In : Physiologie et élaboration du rendement Colza*, Cetiom Editions, Paris, pp 68-72.

- Tischner R. (1992).** Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant Cell Env.*, 23 : 1005-1024.
- Touraine B. (1992).** Régulation de l'absorption racinaire de NO_3^- par les parties aériennes. Thèse de Doctorat d'état. Université de Montpellier II. 189p.
- Touraine B., Daniel-Vedèle F. & Forde B.G. (2001).** Nitrate Uptake and its regulation. In *Plant Nitrogen*. Lea P J and J F Morot-Gaudry eds, New York, pp 1-36.
- Triboï-Blondel A.M. (1988).** Mise en place et fonctionnement des feuilles de colza d'hiver : relations azote-carbone et sénescence. *Agronomie*, 8 : 37-44.
- Trinsoutrot I., Nicolardot B., Justes E.S. (2000).** Decomposition in the field of residues of oilseed rape grown at two levels of N fertilisation: effects on the dynamics of soil mineral N between successive crops. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 56 : 125-137.
- Trueman L.J., Richardson A. & Forde B.G. (1996).** Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 175 : 223-231.
- Tsay Y.F., Schoeder J.I., Feldmann K.A. & Crawford N.M. (1993).** The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a nitrate inducible nitrate transporter. *Cell*, 72 : 1-20.
- Unkless S.E., Hawker K.L., Grieve C., Campbell E.I., Montague P. & Kinghorn J.R. (1991).** *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 204-208.
- van Keulen H., Seligman N.G. (1987).** Simulation of water use, nitrogen nutrition and growth of a spring wheat crop. PUDOC Wageningen.
- Van Rees K.C.J., Comerford N.B. & McFee W.W. (1990).** Modeling potassium uptake by slash pine seedlings from low-potassium-supplying soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54 : 1413-1421.
- Vidmar J.J., Zhuo D., Siddiqi M.Y., Schjoerring J.K., Touraine B. & Glass A.D.M. (2000).** Regulation of high-affinity transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol.*, 123 : 307-318.
- Vold A., Bakken L.R., Uhlen G. & Vatn A. (1999).** Use of data from long-term fertilizer experiments to model plant nitrogen uptake. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 55 : 197-206.
- Vos J. & van der Putten P.E.L. (1997).** Field observations on nitrogen catch crops. I. Potential and actual growth and nitrogen accumulation in relation to sowing date and crop species. *Plant Soil*, 195 : 299-309.

- Wang R., Liu D. & Crawford N.M. (1998)** The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95 : 15134-15139.
- Watts D.G. & Hanks R.J. (1978)**. A soil-water-nitrogen model for irrigated corn on sandy soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42 : 492-499.
- Wild A. & Breeze V.G. (1981)**. Nutrient uptake in relation to growth. In C.B. Johnson, eds, *Physiological Processes limiting Plant Productivity*. Butterworths, London, pp 331-344.
- Wright G.C., Smith C.J. & Woodroffe M.R. (1988)**. The effect of irrigation and nitrogen fertilizer on rapeseed (*Brassica napus*) production in south-eastern Australia. I. Growth and seed yield. *Irrigation Sci.*, 9 : 1-13.
- Yau S. K & Thurling N. (1987)**. Variation in nitrogen response among spring rape (*Brassica napus*) cultivars and its relationship to nitrogen uptake and utilization. *Field Crop. Res.*, 45 : 29-229.
- Zhang Q.Z., Kullman A. & Geisler G. (1991)**. Nitrogen transportation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant during flowering and early siliqua developing. *J. Agron. Crop Sci.*, 167 : 229-235.
- Zhang Q.Z., Xi H.F. & Geisler G. (1993)**. Translocation of N in pods of oilseed rape during siliqua developing. *J. Agron. Crop Sci.*, 171 : 46-48.
- Zhuo D., Okamoto M., Vidmar J.J. & Glass A.D.M. (1999)**. Regulation of a putative high affinity nitrate transporter (*At NRT2. 1*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 17 : 563-568.

MALAGOLI Philippe, 2004. Modelling N uptake, N allocation and N remobilization in *Brassica napus* L. from bolting to harvest. University Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 140 p.

Abstract – Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is characterized by high nitrate uptake capacity during fall (used as a catch crop) and bolting, but also by a low N use efficiency, leading to a high N release to environment, especially by dead leaf drop.

Aim of this work was to acquire knowledge about regulations of NO_3^- transport systems during the entire growth cycle and to establish an accurate description of N dynamics within the plant during bolting and N pod filling.

The use of equations describing kinetics of NO_3^- High-(HATS) and Low-(LATS) Affinity Transport Systems and of rape databank from INRA (providing inputs and outputs needed to run the model) allowed to build a basic mechanistic N uptake model during the growth cycle. Characterization of endogenous (day/night cycle, ontogeny) and environmental (root temperature and photosynthetically active radiations) factors on transport system activities by ^{15}N labelling experiments allowed to establish response curves. Integration of these factors leads to build a model able to quantify impact of each studied factor as well as the relative contribution of each transport systems during the growth cycle. Simulations showed that HATS represents 89% of N taken up at harvest (71 and 18% for inducible and constitutive components of HATS, respectively) when no fertilizer was applied. LATS activity occurred early in the growth cycle. A fall N fertilizer application increased both its duration of functioning and its contribution to total N uptake.

Weekly application of ^{15}N on 12 individual plants in field conditions allowed to discriminate N flux coming from current N uptake (labelled N) and N remobilization (unlabelled N) between each tissue from bolting to harvest. In our conditions, endogenous N coming from N mobilized from vegetative tissues represents the main N source for N pod filling (73% of total N allocated toward pods at harvest with 36, 34, 22 and 8% coming from leaves, stem, flowers and taproot, respectively).

Calculation of rate constants related to flux kinetics of current N uptake and N remobilization allowed to discriminate two leaf populations based on (i) the residual N content (% of dry weight), (ii) their apparent N remobilization capacity, (iii) contribution of endogenous N to N filling in these leaf ranks, (iv) timing and (v) duration of endogenous N remobilization.

Despite a decrease of N uptake occurring during flowering period and associated with an increase of endogenous N pool circulating at the whole plant level, no correlation was clearly found between N uptake and N remobilization.

Results showed that this macroelement is submitted to a complex dynamic within the plant and open new research areas in order to optimize its valorisation by this crop.

Key-words - *Brassica napus* L., amino-acids, dynamics, environment, leaf ranks, modelling nitrate, ^{15}N labelling, HATS, LATS, remobilization.

MALAGOLI Philippe, 2004. Modélisation de l'absorption de l'azote nitrique et de son allocation et de sa remobilisation chez *Brassica napus* L. de la reprise de végétation au stade maturité des graines. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, 140 p.

Résumé – Le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) est caractérisé par de fortes capacités d'absorption du nitrate pendant la période automnale (utilisé alors comme plante « piège à nitrate ») et pendant la montaison mais aussi par une mauvaise valorisation de l'azote se manifestant par une restitution importante de l'azote (notamment foliaire) à l'environnement.

Ce travail avait pour but de mieux comprendre les régulations s'exerçant sur les systèmes de transport racinaire du nitrate et de mieux décrire la dynamique de l'azote au sein du végétal pendant la montaison et la période de remplissage des siliques.

L'utilisation conjointe des équations descriptives de l'activité des systèmes de transport à forte (HATS) et à faible (LATS) affinité pour le nitrate et de la banque de données Colza de l'INRA (fournissant les variables d'entrée et de sortie) a permis d'initier une modélisation mécaniste de l'absorption au cours du cycle de culture. L'étude de l'effet de facteurs endogènes (cycle nyctéméral et variations ontogénétiques) et environnementaux (basses températures, rayonnement) sur les activités des systèmes de transport HATS et LATS, *via* des expérimentations basées sur l'utilisation de l'isotope stable $^{15}\text{NO}_3^-$, a permis d'établir des lois d'action. Leur intégration a abouti à la construction d'un modèle capable de quantifier l'impact de chaque facteur ainsi que la participation relative des systèmes de transport au cours du cycle de culture. Les simulations ont montré que le système d'absorption HATS participe pour 89 % à l'absorption totale du nitrate (71 et 18 % pour le HATS inductible et constitutif respectivement) sans apport d'engrais azoté. Dans ces conditions, le système d'absorption LATS n'intervient qu'au moment de l'implantation de la culture alors qu'une fertilisation azotée à l'automne augmente sa durée d'action et sa participation.

L'application hebdomadaire du marqueur ^{15}N à la base de 12 plantes individualisées en conditions de plein champ a permis de différencier les flux d'azote issu de l'absorption (azote marqué) et de la remobilisation (azote non marqué) entre les différents compartiments de la plante du stade « reprise de végétation » au stade « maturité des graines ». Dans nos conditions, l'azote issu de la remobilisation à partir des organes végétatifs représente la principale source pour le remplissage en azote des siliques (73% de l'azote total dans les siliques à la récolte dont 36, 34, 22 et 8% proviennent respectivement des feuilles, de la hampe, des inflorescences et du pivot).

Le calcul de constantes de vitesse associées à la cinétique des flux d'azote issu de l'absorption et de la remobilisation a permis de discriminer deux populations de feuilles se différenciant par (i) la teneur résiduelle en azote, (ii) leur capacité de remobilisation apparente, (iii) la contribution de l'azote endogène au remplissage en azote des autres rangs de feuilles, (iv) la période et (v) la durée de remobilisation de l'azote endogène.

Bien qu'une réduction de l'absorption du nitrate ait été mesurée au cours de la transition florale caractérisée notamment par une augmentation du pool d'azote endogène circulant, aucune corrélation inverse n'a pu être établie clairement entre l'absorption et la remobilisation de l'azote.

L'ensemble des résultats obtenus montre que ce macroélément est soumis à une dynamique complexe au sein de la plante et permet de proposer des pistes exploratoires afin d'optimiser sa valorisation par cette culture.

Mots-clé - *Brassica napus* L., acides aminés, dynamique, environnement, marquage ^{15}N , modélisation, nitrate, HATS, LATS, rang de feuille, remobilisation.