



# UNIVERSITE DE CAEN / BASSE – NORMANDIE

U.F.R. de l'Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole Doctorale Normande de Chimie – Biologie

Thèse présentée par

**M<sup>r</sup> Frédéric MEURIOT**

en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de CAEN**

Spécialité : **Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions**

(Arrêté du 25 Avril 2002)

**Caractérisation et modélisation des flux de carbone et  
d'azote lors de la repousse après la coupe chez la luzerne  
(*Medicago sativa* L.).**

soutenue à CAEN le 29 Juin 2004, devant la commission d'examen composée de :

M<sup>r</sup> Gilles LEMAIRE, Directeur de recherche, INRA, Lusignan

Rapporteur

M<sup>r</sup> Hans SCHNYDER, Professeur, Munich, Allemagne

Rapporteur

M<sup>r</sup> Alain OURRY, Professeur, Université de Caen

M<sup>r</sup> Jean-Claude SIMON, Directeur de recherche, INRA, Caen

Co-directeur de thèse

M<sup>r</sup> François. GASTAL, Directeur de recherche, INRA, Lusignan

Co-directeur de thèse

## AVANT-PROPOS

Ma thèse a été réalisée au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie - Nutrition NCS de l'Université de Caen, dirigée par Monsieur le Professeur A. OURRY.

Je tiens à lui témoigner toute mon estime et ma reconnaissance pour son soutien et sa confiance lors de mon DEA et de ma thèse, ainsi que pour m'avoir permis d'acquérir et de développer de nouvelles compétences au travers de ma participation à plusieurs congrès internationaux et formations en modélisation.

Je n'oublie pas non plus les quelques mois passés au sein de l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères de Lusignan, dirigée par Monsieur F. GASTAL. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour son accueil en pays Mélusin, et j'en profite également pour remercier toute l'équipe de l'Unité pour la chaleur et l'enthousiasme qui m'ont été témoignés au cours de mes différents séjours. J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à Monsieur A. J. ESCOBAR-GUTIERREZ pour l'étendue de ses connaissances et la qualité de l'aide et de l'écoute prodiguées au cours de cette expérience de recherche.

Ce travail de thèse a par ailleurs été rendu possible grâce à l'attribution d'une bourse co-financée par l'INRA et la Région Basse – Normandie, et a été co-dirigée par Messieurs J-C. SIMON et F. GASTAL. Je tiens tout particulièrement à les remercier pour leur encadrement, leur disponibilité, et la qualité des nombreuses suggestions et idées apportées tout au long de cette thèse.

Je suis très honoré que Messieurs G. LEMAIRE et H. SCHNYDER aient accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et ce malgré leurs charges de travail conséquentes.

Je tiens également à remercier l'équipe « Carbone- Défoliation » de la région aux deux léopards pour le soutien, la confiance, et l'aide apportée pendant ces trois années, et tout particulièrement :

- Jean-Christophe et la qualité de son « expertise » (à prononcer en Québécois), prodiguée depuis le DEA, sur la physiologie des plantes, et plus particulièrement celle des « VSPaceae » ;
- Marie-Laure, professionnelle du « 0 redo last point » et co-dévoreuse de biblio à bulles, pour les nombreuses mises à jour (ô combien utiles !) en statistique analytique, les récoltes en tous genres, et la digitalisation acrobatique de la luzerne ;
- Annette et Marie-Pascale du « Jardin des simples » pour leur enthousiasme, leur vision fine du fonctionnement de la plante (qu'elle ait des talles ou des tiges), et leur célèbre maxime « Un acide aminé ou une protéine, ce n'est pas seulement de l'azote, c'est encore plus du carbone » ;

ainsi qu'à toute l'équipe de l'UMR : Patrick, Marie-Paule, Christine, Julie, Ange-Laure, Alexandra, Stéphanie, Nathalie, les stars du ballon rond (Bertrand, Jérémy, Jean-Bernard, Philippe, Erwann...), mes deux « puits de science » de référence (et inavoués), Messieurs les Professeurs J.P. BILLARD et C. HUAULT, et tous les autres...

Une pensée plus personnelle est aussi adressée à un célèbre macédonien qui, s'il n'avait jadis pas étiré son vaste empire éphémère vers les rives de l'Indus, ne m'aurait peut-être pas permis aujourd'hui de travailler sur la luzerne... Un clin d'œil aussi vers ceux qui ont guidé mes pas sur les prés carrés et les étendues d'écume du vendredi soir (et du samedi matin) : Sun Tzu, Frédéric II, Suffren, Surcouf, Clausewitz, Von Manstein et bien sûr, ma référence parmi tous, le « petit caporal » des grognards de la vieille garde.

Enfin, mes pensées les plus chères et les plus tendres vont à mes parents, à ma grand-mère, à ma famille proche, et à mes meilleurs amis de toujours, Laurence, Arnaud et Manu, qui m'ont tous inlassablement soutenu et encouragé au cours de toutes ces longues années, et qui ont contribué à leur manière à ce que je suis humblement devenu aujourd'hui.

*« Le temps passe, le souvenir reste »*  
pour toi, pourtant si loin mais toujours si proche ;  
ton petit-fils.

*La simplicité consiste à montrer ce que l'on est ; la modestie à le cacher.*

(Lettre à Voltaire, 11 Mars 1770, Jean le Rond d'Alembert)

## LISTE DES ABREVIATIONS

A : Abondance naturelle

ACP : Analyse des Composantes Principales

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

C : Carbone

DM: Dry Matter

DW : Dry Weight

E%: Excès isotopique

EDTA : Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ha : Hectare

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IRMS : Isotope Ratio Mass Spectrometry

kDa : kiloDalton

LA: Leaf Area

MeJA: Méthyl-JAsmonate

$\mu$ M: microMolaire

mM : milliMolaire

MS : Matière Sèche

N : Azote

PAR : Photosynthetic Active Radiation

ppm: partie par million

PVDF : PolyVinylidene DiFluoride

RLA : Residual Leaf Area

RuBisCO : Ribulose Bis phosphate Carboxylase - Oxygénase

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

t : Tonne

TBS : Tris Buffer Saline

Tris : Tri (hydroxyméthyl) amino méthane

TCA : Tri-Chloro acetic Acid

TNC : Total Non-structural Carbohydrate

VSP : Vegetative Storage Protein (protéine de réserve des organes végétatifs)

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>16</b>
A- GENERALITES SUR LA LUZERNE .....	16
B- INCIDENCES AGRONOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA COUPE CHEZ LA LUZERNE .....	18
C- CONTRIBUTION DES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES A LA REPOUSSE .....	24
D- MODELISATION DES FLUX CARBONES ET AZOTES CHEZ LES VEGETAUX .....	32
E- CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE .....	35
<b>CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>38</b>
INTRODUCTION .....	38
A- ACCUMULATION OF N RESERVES AND VEGETATIVE STORAGE PROTEIN (VSP) IN TAPROOTS OF NON-NODULATED ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) ARE AFFECTED BY MINERAL N AVAILABILITY. ....	40
B- INFLUENCE OF THE INITIAL ORGANIC N RESERVES AND RESIDUAL LEAF AREA ON GROWTH, N UPTAKE, N PARTITIONING AND N STORAGE IN ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) DURING POST-CUTTING REGROWTH. ....	57
C- CONTRIBUTION OF INITIAL C AND N RESERVES IN MEDICAGO SATIVA L. RECOVERING FROM DEFOLIATION: MODULATION BY THE CUTTING HEIGHT AND THE RESIDUAL LEAF AREA. ....	75
<b>CHAPITRE III : MODELISATION.....</b>	<b>98</b>
A- INTRODUCTION .....	98
B- DESCRIPTION DU MODELE .....	100
C- RESULTATS .....	111
D- DISCUSSION .....	124
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>128</b>
A- MODULATION DE L'ETAT INITIAL (AU JOUR DE COUPE) PAR L'ALIMENTATION AZOTEE ANTERIEURE .....	129
B- EFFET DU NIVEAU DES RESERVES C ET N INITIALES DU PIVOT SUR LE POTENTIEL DE REPOUSSE .....	133
C- EFFET DE LA HAUTEUR DE COUPE (VIA LE NIVEAU DES RESERVES ORGANIQUES DES CHAUMES) SUR LE DEGRE DE CONTRIBUTION DES RESERVES C ET N DU PIVOT AU POTENTIEL DE REPOUSSE .....	137
D- EFFET DE LA SURFACE FOLIAIRE RESIDUELLE SUR LE TAUX DE CONTRIBUTION DES RESERVES C ET N DU PIVOT AU POTENTIEL DE REPOUSSE .....	141
E- INTERETS ET LIMITES DE LA MODELISATION DE LA DISTRIBUTION DES RESSOURCES AZOTEES AU COURS DE LA REPOUSSE .....	145
<b>CHAPITRE V : PERSPECTIVES DE RECHERCHE .....</b>	<b>150</b>
A- APPROFONDISSEMENT DES CONNAISSANCES SUR LA PHYSIOLOGIE DES PLANTES EN REPOUSSE, A L'ECHELLE DE LA PLANTE ENTIERE .....	150
B- VALIDATION ET AMELIORATION DU MODELE DE DISTRIBUTION DES RESSOURCES .....	151
C- EVOLUTION DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES IMPLIQUEES LORS DE LA REPOUSSE EN CONDITIONS DE PLEIN CHAMP .....	154
<b>CHAPITRE VI : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>156</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>175</b>
A - MODELISATION DE LA DISTRIBUTION DE L'AZOTE CHEZ LA LUZERNE .....	175
B- VALORISATION DES COMPETENCES – UN NOUVEAU CHAPITRE DE THESE .....	178

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE .....	11
<b>CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>16</b>
A- GENERALITES SUR LA LUZERNE .....	16
B- INCIDENCES AGRONOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA COUPE CHEZ LA LUZERNE .....	18
<i>B.1- Effets de l'intensité et de la fréquence de la coupe sur la production aérienne :</i> .....	<i>18</i>
B.1.1 Impact de l'intensité de la coupe (hauteur et surface foliaire résiduelle) sur la repousse.....	18
B.1.2 Impact de la fréquence de la coupe sur la repousse.....	20
B.1.3 Interactions entre l'intensité et la fréquence de la coupe.....	21
<i>B.2- Effets de la coupe sur la croissance racinaire.....</i>	<i>22</i>
<i>B.3- Effets de la coupe sur le métabolisme racinaire.....</i>	<i>22</i>
C- CONTRIBUTION DES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES A LA REPOUSSE .....	24
<i>C.1- Stockage et mobilisation des réserves C et N :</i> .....	<i>24</i>
C.1.1 Mécanismes de mise en réserve du carbone et de l'azote .....	24
C.1.2 Mobilisation des réserves C et N .....	25
<i>C.2- Contribution des réserves carbonées à la reconstitution des organes aériens.....</i>	<i>26</i>
C.2.1 Composition biochimique des réserves carbonées.....	26
C.2.2 Contribution des réserves carbonées à la repousse.....	27
<i>C.3- Contribution des réserves azotées à la reconstitution des organes aériens .....</i>	<i>28</i>
C.3.1 Composition biochimique des réserves azotées .....	28
C.3.2 Contribution des réserves azotées lors de la repousse.....	31
C.3.3 Facteurs inducteurs de l'accumulation des VSP .....	31
D- MODELISATION DES FLUX CARBONES ET AZOTES CHEZ LES VEGETAUX .....	32
<i>D.1- Intérêts et limites actuelles des modèles de distribution des ressources carbonées et azotées :</i> .....	<i>32</i>
<i>D.2- La modélisation de la distribution des ressources .....</i>	<i>34</i>
E- CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	35
<b>CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>38</b>
INTRODUCTION .....	38
A- ACCUMULATION OF N RESERVES AND VEGETATIVE STORAGE PROTEIN (VSP) IN TAPROOTS OF NON-NODULATED ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) ARE AFFECTED BY MINERAL N AVAILABILITY. ....	40
A.1- Abstract.....	41
A.2- Résumé.....	42
A.3- Introduction .....	43
A.4- Materials and Methods .....	45
A.4.1 Plant Material .....	45
A.4.2 Experiment I: Application of optimal and sub-optimal N feeding .....	45
A.4.3 Experiment II: Application of decreasing concentrations of NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	46
A.4.4 Tissue sampling.....	46
A.4.5 Analysis of N, nitrate, amino acids, soluble proteins and VSP concentrations in taproots .....	46
A.4.6 Calculation of N partitioning in plants .....	47
A.4.7 Statistical analysis .....	48
A.5- Results.....	49
A.5.1 Total biomass and shoot root ratio.....	49
A.5.2 Total N concentrations in taproot .....	49
A.5.3 Exogenous N partitioning within the plant.....	51
A.5.4 Amino acid and nitrate concentrations in taproots.....	51
A.5.5 Soluble protein and VSP concentrations in taproots .....	51
A.6- Discussion.....	53

B- INFLUENCE OF THE INITIAL ORGANIC N RESERVES AND RESIDUAL LEAF AREA ON GROWTH, N UPTAKE, N PARTITIONING AND N STORAGE IN ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) DURING POST-CUTTING REGROWTH. ....	57
<i>B.1- Abstract</i> .....	58
<i>B.2- Résumé</i> .....	59
<i>B.3- Introduction</i> .....	60
<i>B.4- Materials and Methods</i> .....	62
B.4.1 Plant Material.....	62
B.4.2 Application of different N supplies and residual leaf areas.....	62
B.4.3 Tissue sampling.....	63
B.4.4 Analysis of taproot N pools at defoliation and after 29 d of regrowth.....	64
B.4.5 N uptake during regrowth after defoliation.....	64
B.4.6 Calculation of N allocation in plants.....	65
B.4.7 Statistical analysis.....	65
<i>B.5- Results</i> .....	66
B.5.1 Biomass and morphological status on the day of cutting (Day 0).....	66
B.5.2 Taproot N reserves on the day of cutting (Day 0).....	66
B.5.3 Net N uptake during regrowth after cutting.....	68
B.5.4 Production and allocation of the biomass at the end of regrowth (Day 29).....	68
B.5.5 N content and allocation within the plant at the end of regrowth (Day 29).....	68
B.5.6 N status and reserve compounds in taproot at the end of regrowth (Day 29).....	69
<i>B.6- Discussion</i> .....	71
B.6.1 Effects of the N fertilization on initial biomass, plant morphology and N status.....	71
B.6.2 Effects of initial residual leaf area and N status on N uptake during post-cutting regrowth.....	72
B.6.3 Effects of initial residual leaf area and N status on final biomass production, N allocation and N partitioning.....	73
C- CONTRIBUTION OF INITIAL C AND N RESERVES IN MEDICAGO SATIVA L. RECOVERING FROM DEFOLIATION: MODULATION BY THE CUTTING HEIGHT AND THE RESIDUAL LEAF AREA. ....	75
<i>C.1- Abstract</i> .....	76
<i>C.2- Résumé</i> .....	77
<i>C.3- Introduction</i> .....	78
<i>C.4- Material and methods</i> .....	81
C.4.1 Plant material.....	81
C.4.2 Application of different N supplies, cutting heights, and leaf areas treatments.....	81
C.4.3 Tissue sampling.....	82
C.4.4 Extraction and analysis of C and N pools.....	83
C.4.5 Calculation of N allocation within the plant.....	84
C.4.6 Statistical analysis.....	84
<i>C.5- Results</i> .....	85
C.5.1 Initial biomass and C-N reserve levels.....	85
C.5.2 Regrowth potential and C-N reserves contribution.....	86
<i>C.6- Discussion</i> .....	92
C.6.1 Initial (Day 0) plant status.....	92
C.6.2 Contribution of taproot C-N reserves to the regrowing shoot C-N supply.....	93
C.6.3 Modulation of the contribution of taproot C-N reserves by the cutting height and the residual leaf area.....	95
C.6.4 Physiological significance and agronomical application.....	96

### CHAPITRE III : MODELISATION.....98

A- INTRODUCTION .....	98
B- DESCRIPTION DU MODELE .....	100
<i>B.1- Hypothèses implicites du modèle :</i> .....	102
<i>B.2- Compartiments et variables du modèle</i> .....	103
B.2.1 Les compartiments.....	103
B.2.2 Les variables.....	106
<i>B.3- Flux d'azote entre compartiments</i> .....	107
B.3.1 Le nitrate.....	107
B.3.2 Les acides aminés.....	109
B.3.3 Les protéines solubles, les VSP et le N insoluble.....	110



C- RESULTATS .....	111
C.1- Ajustement et paramétrage du modèle : Expérimentation 15HN (plantes coupées à 15 cm, avec de fortes réserves azotées initiales) .....	111
C.1.1 Azote total et pertes racinaires .....	111
C.1.2 Distribution de l'azote au sein des différents organes .....	111
C.1.3 Evolution des acides aminés et des protéines solubles dans les organes épargnés par la coupe .....	113
C.1.4 Distribution de l'azote au niveau de la plante entière .....	114
C.1.5 Evolution des quantités d'acides aminés dans le xylème et le phloème au cours de la repousse .....	114
C.1.6 Cas particulier des VSP du pivot .....	116
C.2- Validation du modèle : Expérimentation 6LN (plantes coupées à 6 cm, avec de faibles réserves azotées initiales) : .....	117
C.2.1 Azote total et pertes racinaires .....	117
C.2.2 Distribution de l'azote au sein de chaque organe .....	117
C.2.3 Evolution des acides aminés et des protéines solubles dans les organes épargnés par la coupe .....	119
C.2.4 Distribution de l'azote au niveau de la plante entière .....	121
C.2.5 Evolution des des quantités d'acides aminés dans le xylème et le phloème au cours de la repousse .....	123
C.2.6 Cas particulier des VSP du pivot .....	123
D- DISCUSSION .....	124
D.1- Apports du modèle à l'étude de la physiologie de la plante en repousse .....	124
D.2- Nouvelles informations et nouveaux questionnement générés par le modèle .....	125
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>128</b>
A- MODULATION DE L'ETAT INITIAL (AU JOUR DE COUPE) PAR L'ALIMENTATION AZOTEE ANTERIEURE .....	129
A.1- La limitation de l'alimentation azotée modifie non seulement la production et la répartition de la biomasse au jour de coupe, mais aussi le statut C/N des chaumes et du pivot .....	129
A.2- La luzerne développe des stratégies adaptatives différentes en fonction du niveau d'alimentation azotée .....	130
B- EFFET DU NIVEAU DES RESERVES C ET N INITIALES DU PIVOT SUR LE POTENTIEL DE REPOUSSE .....	133
B.1- Le début de la repousse est accompagné par une mobilisation des réserves C et N initiales .....	133
B.2- Le niveau initial des réserves azotées module les capacités d'absorption du nitrate en début de repousse .....	134
B.3- Les plantes LN ont des potentiels de repousse et des capacités de reconstitution de leurs réserves azotées réduites .....	135
B.4- Le rôle des réserves organiques initiales du pivot est déterminant pour la production de la luzerne, notamment au début de la repousse .....	136
C- EFFET DE LA HAUTEUR DE COUPE (VIA LE NIVEAU DES RESERVES ORGANIQUES DES CHAUMES) SUR LE DEGRE DE CONTRIBUTION DES RESERVES C ET N DU PIVOT AU POTENTIEL DE REPOUSSE .....	137
C.1- Les réserves organiques initiales des chaumes sont mobilisées au cours de la repousse .....	138
C.2- La hauteur de coupe joue un rôle déterminant sur la production fourragère de la luzerne .....	139
C.3- La hauteur de coupe est un paramètre agronomique important à prendre en compte pour une bonne gestion des luzernières .....	140
D- EFFET DE LA SURFACE FOLIAIRE RESIDUELLE SUR LE TAUX DE CONTRIBUTION DES RESERVES C ET N DU PIVOT AU POTENTIEL DE REPOUSSE .....	141
D.1- Le rôle de la surface foliaire résiduelle semble passer par le métabolisme carboné .....	141
D.2- La défoliation limite la reconstitution des réserves organiques du pivot .....	143
D.3- L'importance de la surface foliaire sur la production de biomasse dépend des conditions d'éclaircissement .....	144
E- INTERETS ET LIMITES DE LA MODELISATION DE LA DISTRIBUTION DES RESSOURCES AZOTEES AU COURS DE LA REPOUSSE .....	145
E.1- Intérêts de la modélisation .....	145
E.2- Limites du modèle : .....	147

**CHAPITRE V : PERSPECTIVES DE RECHERCHE .....150**

A- APPROFONDISSEMENT DES CONNAISSANCES SUR LA PHYSIOLOGIE DES PLANTES EN REPOUSSE, A L'ECHELLE DE LA PLANTE ENTIERE .....	150
A.1- <i>Surface foliaire et métabolisme carboné</i> .....	150
A.2- <i>Co-régulation C-N des fonctions physiologiques de la luzerne</i> .....	151
B- VALIDATION ET AMELIORATION DU MODELE DE DISTRIBUTION DES RESSOURCES .....	151
B.1- <i>Validation sur des données indépendantes</i> .....	151
B.2- <i>Utilisation des données <sup>15</sup>N</i> .....	152
B.3- <i>Validation des compartiments xylème et phloème</i> .....	153
B.4- <i>Modélisation de la distribution du carbone</i> .....	153
C- EVOLUTION DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES IMPLIQUEES LORS DE LA REPOUSSE EN CONDITIONS DE PLEIN CHAMP .....	154
C.1- <i>Rôle de la fixation symbiotique</i> .....	154
C.2- <i>Conditions environnementales et échelle agronomique</i> .....	155

**CHAPITRE VI : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....156**

**ANNEXES .....175**

A - MODELISATION DE LA DISTRIBUTION DE L'AZOTE CHEZ LA LUZERNE .....	175
A.1- <i>Diagramme conceptuel</i> .....	175
A.2- <i>Protocole d'extraction et dosages des fractions C-N par IRMS</i> .....	176
A.3- <i>Photosynthèse brute</i> .....	177
B- VALORISATION DES COMPETENCES – UN NOUVEAU CHAPITRE DE THESE .....	178
Présentation : .....	178
B.1- <i>Objectifs et enjeux de la thèse</i> : .....	178
B.2- <i>cadre de la recherche et choix du projet</i> : .....	179
B.3- <i>Gestion et coût du projet</i> : .....	181
B.3.1 <i>Préparation et conduite du projet</i> : .....	181
B.3.2 <i>Evaluation du coût consolidé du projet</i> : .....	181
B.4- <i>Compétences développées dans le cadre du projet</i> : .....	182
B.5- <i>Evaluation des résultats de la thèse</i> : .....	184

## INTRODUCTION GENERALE

Ce travail de thèse, co-financé par l'INRA et la Région Basse-Normandie, s'est inscrit dans le champ thématique I du schéma stratégique du Département Environnement-Agronomie de l'INRA intitulé « Ecophysiologie et conduite des cultures », champ traitant plus particulièrement de l'« Etude de la réponse des plantes aux contraintes du milieu, métabolisme et nutrition minérale ». Ce travail entre ainsi dans le cadre des travaux développés par les équipes de Caen (UMR INRA / UCBN 950, Ecophysiologie Végétale et Agronomie – Nutrition NCS) et de Lusignan (UEPF, Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères) sur les « Réponses adaptatives des plantes et des couverts prairiaux à la défoliation ». Les objectifs de ce travail ont consisté i) à étudier la contribution des différentes réserves azotées et carbonées initiales du pivot à la production de la luzerne (*Medicago sativa* L.), puis ii) à préciser l'impact de la sévérité de la coupe sur cette contribution au cours de la repousse. A cet effet, les flux d'azote des différents organes de réserve de la luzerne ont été suivis, en relation avec le métabolisme carboné, notamment au travers d'une démarche de modélisation de la dynamique de répartition et d'allocation de l'azote au cours d'un cycle coupe / repousse.

La luzerne est une des légumineuses fourragères les plus répandues et les plus cultivées dans le monde. Son origine agricole serait très ancienne puisqu'elle était déjà cultivée il y a plus de 9000 ans sur les hauts plateaux du Caucase, de la Turquie, et de l'Iran. Elle doit d'ailleurs son nom latin « *Medicago* » à cette lointaine origine « d'herbe des Mèdes » (Mauriès, 1994). Elle fut ensuite rapportée en Europe par les armées d'Alexandre le Grand vers 430 *av. J.C.* et sa culture fut fortement développée, notamment sous l'impulsion des Romains, pendant les siècles suivants. En France, l'utilisation de cette plante fourragère a connu de fortes variations au cours des 100 dernières années. Ses surfaces en culture pure sont ainsi passées de 1 million d'hectares en 1900, à 1,7 millions en 1960, pour finalement retomber à près de 0,35 million d'hectares en l'an 2000 (Jarriges, 1988 ; Huyghe, 2003). La forte diminution observée depuis ces 40 dernières années s'explique en partie par le développement important de l'agriculture intensive qui a conduit à l'essor du maïs ensilage complémenté par des tourteaux de soja, et par la disparition de l'élevage dans les grandes zones céréalières. On trouve néanmoins encore des emblavements importants de luzerne en

Région Champagne - Ardennes (où elle est déshydratée) et localement, dans de nombreuses régions d'élevage françaises (Le Gall, 1993).

La luzerne présente de nombreux atouts dont certains pourraient conduire à un retour de sa culture dans les assolements fourragers : source de protéines d'origine végétale pour l'alimentation animale, caractéristiques nutritionnelles complémentaires du maïs ensilage, régularité de sa production estivale, limitation des pertes de nitrate par lessivage, amélioration de la structure des sols, et protection contre l'érosion (Le Gall, 1993 ; Broderick, 2001). De plus, la culture de plantes transgéniques de luzerne permet aussi la production de protéines recombinantes d'intérêt thérapeutique, comme par exemple la synthèse à moindre coût de la protéine VP1 impliquée dans le vaccin immunisant les ovins de la fièvre aphteuse (Khouady *et al.*, 2000 ; Faye *et al.*, 2001). Toutes ces caractéristiques mériteraient d'être valorisées dans le contexte agricole et biotechnologique actuel caractérisé par l'interdiction des farines animales, la protection de la ressource en eau et la production renouvelable, à moindre coût, de molécules d'intérêt, sans impact environnemental négatif mesurable. Néanmoins, cette plante présente quelques inconvénients qui peuvent en partie expliquer la diminution des surfaces cultivées : difficultés d'implantation, pertes de matière lors de la récolte ou en cours de conservation et pérennité de la culture (ou durée de vie du peuplement) parfois insuffisante (Le Gall, 1993). En effet, la luzerne est assez sensible à la coupe de ses parties aériennes. Cette pratique agricole, liée à la fauche ou, plus rarement pour cette espèce, au pâturage, est caractérisée par son intensité (hauteur) et sa fréquence (durée de la repousse). Des rythmes de coupe et de repousse trop rapides pénalisent à la fois la production et la pérennité de la culture (Brink et Marten, 1989). L'ensemble de ces données indique que **la maîtrise de l'ensemble « pérennité - production – qualité » s'avère particulièrement difficile chez cette espèce et reste encore à optimiser**, comme le soulignaient déjà Lemaire et Allirand en 1993.

Lors de la repousse après la coupe, comme lors de la reprise de croissance au printemps, les sources exogènes de carbone et d'azote ne permettent pas de subvenir à la forte demande des organes foliaires en développement. En effet, la photosynthèse, l'absorption de l'azote minéral du sol ainsi que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique sont fortement diminuées lors des premiers jours suivant la coupe (Kim *et al.*, 1993). Les réserves carbonées et azotées préalablement accumulées au niveau des organes pérennes correspondants au pivot et aux chaumes sont alors fortement mobilisées. De nombreuses études se sont donc attachées à décrire le rôle de ces réserves lors de ces phases critiques de

croissance. Au cours des premiers jours suivant la coupe, des travaux récents ont montré que les réserves carbonées du pivot sont essentiellement utilisées pour la respiration et la production d'énergie, alors que les réserves azotées sont fortement mobilisées et sont utilisées par les parties aériennes en croissance (Ta *et al.*, 1990 ; Avice *et al.*, 1996a). Cependant, les mécanismes régulant l'accumulation et l'utilisation des réserves azotées sont encore imparfaitement compris chez la luzerne, et sont notamment difficiles à intégrer au niveau de la plante entière en raison de la multiplicité des organes sources et / ou puits, dont le statut est fortement modifié par la coupe. **Une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'allocation et la répartition des réserves azotées dans la plante paraît donc indispensable pour améliorer la gestion de la pérennité, de la productivité et de la qualité de cette culture**, comme l'avaient déjà suggéré Brouwer en 1963 puis Phillipot en 1990. L'importance relative de ces mécanismes pour assurer la repousse sera appréhendée, notamment grâce à une démarche de modélisation des flux d'azote au niveau de la plante entière.

Une analyse bibliographique des connaissances agronomiques et physiologiques acquises sur la luzerne sera présentée dans un premier chapitre. Nous ferons aussi le point sur les effets de la coupe en portant une attention particulière sur la contribution des réserves carbonées et azotées à la repousse. Un bilan sur l'état actuel des connaissances concernant les conditions d'accumulation et d'utilisation de ces réserves y sera également dressé. Enfin, nous reviendrons sur le développement actuel de modèles dynamiques rendant compte de la distribution des ressources C et N chez les plantes.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons notre **travail de recherche qui a consisté à préciser les conditions d'accumulation des réserves sous l'effet du niveau de la disponibilité en azote du milieu de culture. Nous avons ensuite utilisé ces travaux préliminaires pour étudier l'incidence de la coupe, en suivant plus particulièrement les effets i) du niveau des réserves carbonées et azotées initiales, ii) de la hauteur de coupe, et iii) de la surface foliaire résiduelle, sur la repousse de la luzerne.** L'ensemble de ces travaux a donné lieu à la rédaction de trois articles, regroupés dans le chapitre « Résultats ».

Enfin, dans un troisième chapitre, une partie des résultats expérimentaux du chapitre II a servi de base à **l'élaboration d'un modèle dynamique décrivant la répartition et l'allocation de l'azote au cours de la repousse après la coupe.** Ce travail a pour objectif, à

court terme, **d'organiser et de hiérarchiser les facteurs liés aux pratiques culturales (fréquence et intensité de la coupe)** modulant la distribution des ressources azotées lors de la repousse après la coupe, et à plus long terme, de fournir des éléments d'information sur le métabolisme de l'azote de manière à **permettre une meilleure maîtrise de l'ensemble « pérennité – productivité – qualité » chez cette légumineuse fourragère.**

Ce travail de thèse a conduit à la publication ou à la soumission des trois articles scientifiques suivants :

- **F. Meuriot, J-C. Avice, M-L. Decau, J-C. Simon, P. Lainé, J. J. Volenec and A. Ourry. 2003.** Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* **165**, 709-718.
- **F. Meuriot, J-C. Avice, J-C. Simon, P. Lainé, M-L. Decau, and A. Ourry. 2004.** Influence of the initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during post-cutting regrowth. *Annals of Botany*, sous presse.
- **F. Meuriot, M-L. Decau, A. Morvan-Bertrand, M-P. Prud'homme, F. Gastal, J-C. Simon, J.J. Volenec et J-C. Avice. 2004.** Contribution of initial C and N reserves in *Medicago sativa* L. recovering from defoliation: modulation by the cutting height and the residual leaf area. Sera soumise à *Functional Plant Biology*.

Par ailleurs, mon travail de recherche réalisé au sein de l'UMR lors de mon DEA ou de ma thèse a permis de contribuer aux quatre articles publiés ou acceptés suivants :

- **C. Noquet, F. Meuriot, J-C. Avice, A. Ourry, S.M. Cunningham and J. J. Volenec. 2003.** Short-day photoperiod induces changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Functional Plant Biology* **30**, 853-863.
- **J-C. Avice, F. Le Dily, E. Goulas, C. Noquet, F. Meuriot, J.J. Volenec, S.M. Cunningham, T.G. Sors, C. Dhont, Y. Castonguay, P. Nadeau, G. Bélanger, F-P. Chalifour and A. Ourry. 2003.** Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: Roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* **81**, 1198-1212.

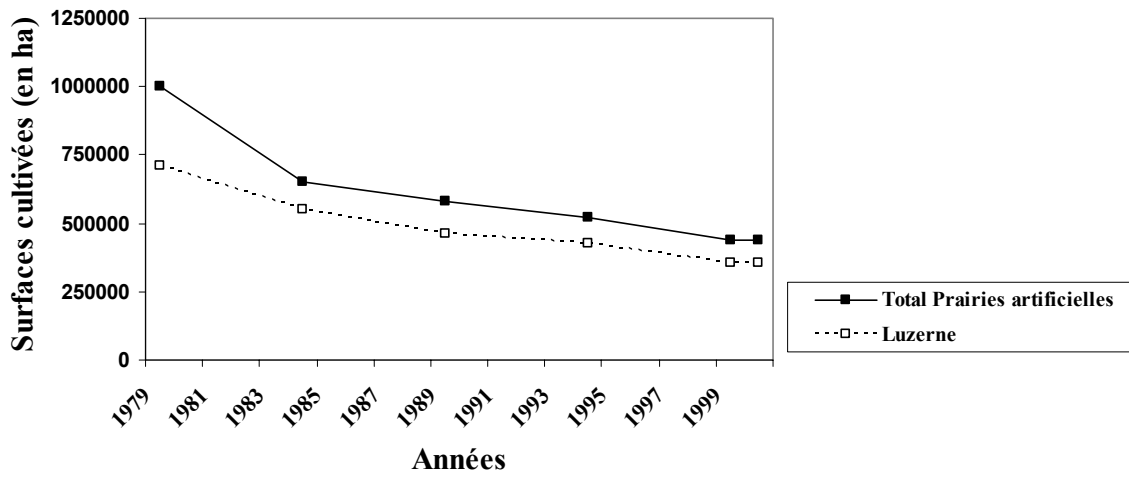
- **F. Meuriot, C. Noquet, J-C. Avice, J. J. Volenec, S.M. Cunningham, T. G. Sors, S. Caillot and A. Ourry. 2004.** Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possesses chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. *Physiologia Plantarum* **120**, 113-123.
  
- **J-C. Simon, M-L. Decau, A. Jacquet, J-C. Avice, F. Meuriot and J-M. Allirand. 2004.** Effect of residual leaf area and N reserve status after cutting on leaf area establishment and dry matter production during regrowth of alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science*, acceptée (Mai 2004).

Enfin, une partie de mon travail de recherche a été (ou sera) présentée sous forme de trois communications orales ou par voie d'affiche :

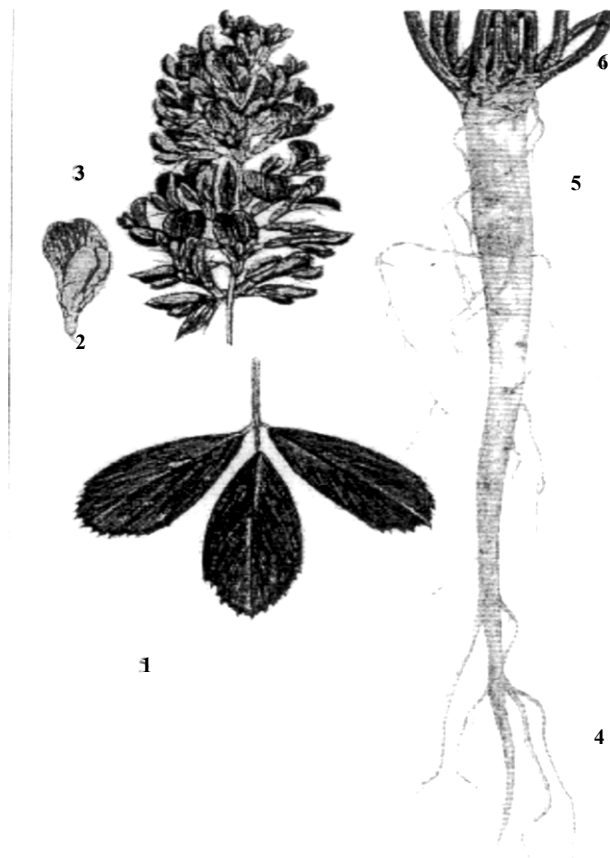
1 / N uptake, N partitioning and taproot VSP accumulation of *Medicago sativa* L. are influenced by MeJA. **F. Meuriot, C. Noquet, L. Rossato, J-C. Avice and A. Ourry**, 6<sup>th</sup> *International Symposium on Organic Nitrogen Assimilation*, Juin 2001, Reims, France.

2 / How does nitrogen availability affect growth and nitrogen storage in alfalfa taproot (*Medicago sativa* L.) during post-cutting regrowth? **F. Meuriot, J-C. Avice, J-C. Simon and A. Ourry**, 5<sup>ème</sup> *Colloque Général de la Société Française de Physiologie Végétale*, Juillet 2003, Orsay, France.

3/ Modelling of nitrogen distribution and reserve mobilization dynamics in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during post-cutting regrowth. **F. Meuriot, A.J. Escobar-Gutiérrez, M.L. Decau, J-C. Simon and F. Gastal**. 4<sup>th</sup> *International Workshop on Functional Structural Plant Models*, Juin 2004, Montpellier, France.



**Figure I.1:** Evolution des surfaces cultivées totales de prairies et de luzerne en France depuis 1979 (Agreste, 2001).



**Figure I.2:** Morphologie de la luzerne. 1- Feuille trifoliée; 2- Fleur; 3- Inflorescence; 4- Racines latérales; 5- Pivot; 6- Collet (Whyte *et al.*, 1953).



## CHAPITRE I : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

### **A– Généralités sur la luzerne**

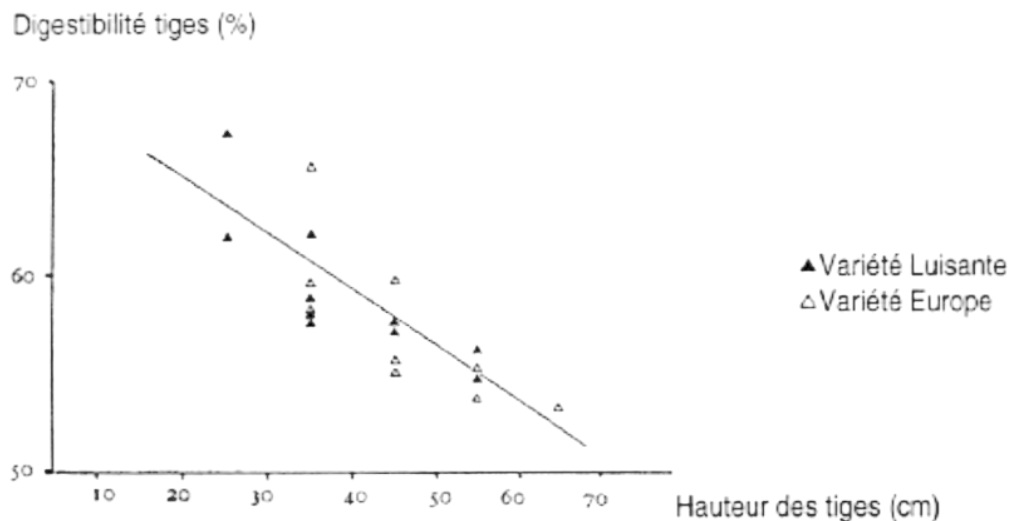
La luzerne est une des légumineuses fourragères les plus cultivées avec environ 32 millions d'hectares dans le monde en 1990, dont environ 13 millions pour l'Amérique du nord (Mauriès, 1994). En France, environ 350.000 hectares de prairies artificielles de luzerne sont encore cultivés en l'an 2000, malgré la diminution des surfaces cultivées depuis plusieurs années (Figure I.1). Comme les autres grandes légumineuses fourragères, la luzerne est une plante essentiellement récoltée après fauche. Elle ne constitue qu'une composante des systèmes fourragers, en complément des prairies et du maïs ensilage (Le Gall, 1993).

Un des avantages agronomiques principaux de la luzerne par rapport aux autres plantes fourragères repose essentiellement sur la régularité de sa production, notamment estivale, qui s'explique par l'existence d'un pivot très développé (Figure I.2 ; Whyte *et al.*, 1953), présentant une profondeur d'enracinement pouvant aller jusqu'à plus de 2 mètres. Un bilan des productions enregistrées sur 15 ans montre ainsi que si sa productivité est inférieure à celle du maïs ensilage sur des sols à disponibilité en eau élevée (environ 11 à 12 t contre 13 à 14 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> pour le maïs), elle présente au contraire de plus fortes productions en situations sèches (environ 7 à 10 t contre 6 à 8 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> pour le maïs ; Jarriges, 1988). En conditions pédoclimatiques très favorables, une culture de luzerne peut produire jusqu'à 18 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> en 3 ou 4 coupes annuelles (Lemaire et Allirand, 1993).

Son système racinaire très développé lui confère aussi une action positive sur la structure du sol. Le retour au sol d'organes sénescents (feuilles, tiges ou racines) contribue à l'entretien humique de ce dernier et favorise sa stabilité structurale (Le Gall, 1993). De plus, la luzerne est capable de fixer l'azote atmosphérique grâce à de nombreuses nodosités présentes sur ses racines (Figure I.3). Par conséquent, et à l'exception d'une fertilisation azotée (jusqu'à 100 kg.ha<sup>-1</sup>) qui peut être faite au cours de la première année d'installation d'une luzernière, cette plante ne nécessite pas d'apport d'engrais azotés (Justes *et al.*, 2002). Les pertes de nitrate par lessivage sous le couvert végétal sont par ailleurs très limitées (Beaudoin *et al.*, 1992). La luzerne diminue en effet les quantités d'azote nitrique présentes



**Figure I.3:** Racine de luzerne avec chapelet particulièrement dense de nodules. De couleur rougeâtre, ces derniers sont issus de la symbiose des racines avec une bactérie, *Sinorhizobium meliloti*.



**Figure I.4:** Digestibilité des tiges d'un peuplement en fonction de leur hauteur au cours d'une repousse pour deux variétés de luzerne (*var.* Luisante et Europe; Lemaire et Allirand, 1993)

**Tableau I.1:** Qualité moyenne de la luzerne récoltée selon quatre fréquences de coupe différentes (Lemaire et Allirand, 1993).

	Régime 1 (60 jours)	Régime 2 (45 jours)	Régime 3 (35 jours)	Régime 4 (28 jours)
<b>Protéines (t.ha<sup>-1</sup>)</b>	3,09	3,25	3,35	3,36
<b>Matière Azotée Totale (%)</b>	15,50	18,21	20,89	23,55
<b>Digestibilité (%)</b>	57,74	60,98	63,93	66,52

dans le sol du fait de ses fortes capacités d'absorption et de son utilisation préférentielle de l'azote minéral du sol par rapport à l'azote atmosphérique (Kim *et al.*, 1993 ; Tischner, 2000). Enfin, lors de la première année suivant son retournement, une luzernière peut fournir une quantité d'azote voisine de 30 à 50 kg N.ha<sup>-1</sup> à la culture suivante (Le Gall, 1991).

L'entrée d'azote *via* la fixation symbiotique a autrefois constitué la plus importante source d'azote des systèmes de culture jusqu'à l'apparition des engrais minéraux de synthèse (Picard, 1982). Cet avantage économique est malheureusement contrebalancé chez la luzerne par des coûts de récolte et de conservation plus importants que chez la plupart des autres espèces fourragères. En effet, il faut effectuer plusieurs coupes par an (de 3 à 5) et parfois ajouter un conservateur lorsque ce fourrage est conservé sous forme d'ensilage (Le Gall, 1993). Les difficultés de récolte d'un fourrage de bonne qualité sont également importantes, en raison d'une perte possible de feuilles lors des opérations de fanage (Cabon, 1982).

Le choix du stade de récolte est également très important. Il est le résultat d'un compromis entre le niveau de la production envisagée par l'exploitant, les valeurs énergétiques et azotées souhaitées du fourrage, et sa digestibilité par les ruminants (Demarquilly, 1982). La luzerne tolérant mal les rythmes d'exploitation trop rapides, il est par exemple nécessaire de ménager des temps de repousse suffisants (compris entre 35 et 45 jours). La hauteur de la coupe la plus fréquemment pratiquée est de 6 à 7 cm, une coupe plus haute diminuant la production d'environ 60 kg MS aérienne.ha<sup>-1</sup> par cm supplémentaire (Cabon, 1982). Par ailleurs, la digestibilité des parties aériennes diminue avec la maturité des tissus, et plus particulièrement dans le cas des tiges (Figure I.4 ; Lemaire et Allirand, 1993). Il convient ainsi de récolter la luzerne avant sa floraison. Le tableau I.1 permet d'observer qu'une digestibilité moyenne annuelle de 64% (correspondant à un fourrage de bonne qualité pour des rations de vaches laitières) est obtenue avec un régime de fauche de 35 jours et permet une production de 16 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> (Lemaire et Allirand, 1993).

Les parties aériennes récoltées présentent une haute valeur protéique (environ 3 à 3.5 t protéines.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup>), loin devant celles des protéagineux et oléo-protéagineux tels que le pois (*Pisum sativum* L.) et le colza (*Brassica napus* L.) (Huyghe, 2003). Leur valorisation tant en production laitière qu'en production de viande est intéressante, notamment du fait de leur bonne composition en acides aminés essentiels et de leur richesse en certains éléments minéraux indispensables. Ainsi, les teneurs en calcium, minéral indispensable pour la

**Tableau I.2:** Evolution des teneurs en phosphore et en calcium des parties aériennes récoltées chez la luzerne, le trèfle blanc et le ray-grass en fonction de différents stades de coupe appliqués pendant le premier cycle de culture (Jarriges, 1988).

Stades de coupe	Eléments minéraux (en g.kg <sup>-1</sup> MS)	
	Phosphore	Calcium
<b><u>Luzerne</u></b>		
Végétatif (30 cm de haut)	4,5	16,5
Végétatif (60 cm de haut)	3,5	16,5
Bourgeonnement	3,0	16,5
Début Floraison	3,0	16,5
Floraison	2,5	16,5
<b><u>Trèfle blanc</u></b>		
Végétatif	3,0	13,5
Début Floraison	2,5	13,0
Floraison	2,0	13,0
<b><u>Ray-grass</u></b>		
Feuille	4,5	5,5
Epiaison	3,0	5,5
Début Floraison	3,0	5,5
Floraison	2,5	5,5

croissance osseuse du bétail, sont de 16,5 g.kg MS<sup>-1</sup> pour la luzerne, contre respectivement 13 et seulement 5,5 g.kg MS<sup>-1</sup> pour le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) et le ray-grass (*Lolium perenne* L.) lors du stade « floraison » du premier cycle de culture (Tableau I.2) (Jarrige, 1988).

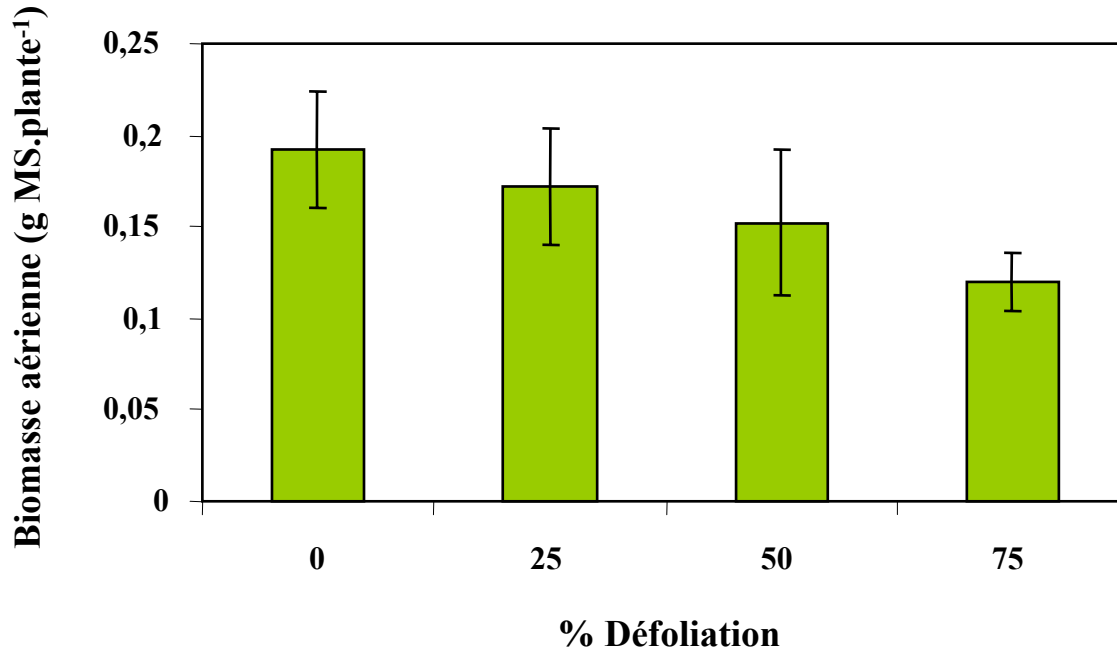
## **B– Incidences agronomiques et physiologiques de la coupe chez la luzerne**

### **B.1- Effets de l'intensité et de la fréquence de la coupe sur la production aérienne :**

Les plantes fourragères pérennes sont soumises à des cycles de coupes et de repousses successifs dans l'année caractérisés par leur intensité (ou hauteur de coupe) et leur fréquence (ou rythme de coupe). Ces deux paramètres déterminent les conditions d'exploitation de la culture. La coupe se caractérise alors par une suppression plus ou moins importante (fonction de l'intensité) et répétée (fonction de la fréquence) de feuilles, de tiges et de méristèmes caulinaires et apicaux, qui conditionne la repousse ultérieure.

#### **B.1.1 Impact de l'intensité de la coupe (hauteur et surface foliaire résiduelle) sur la repousse.**

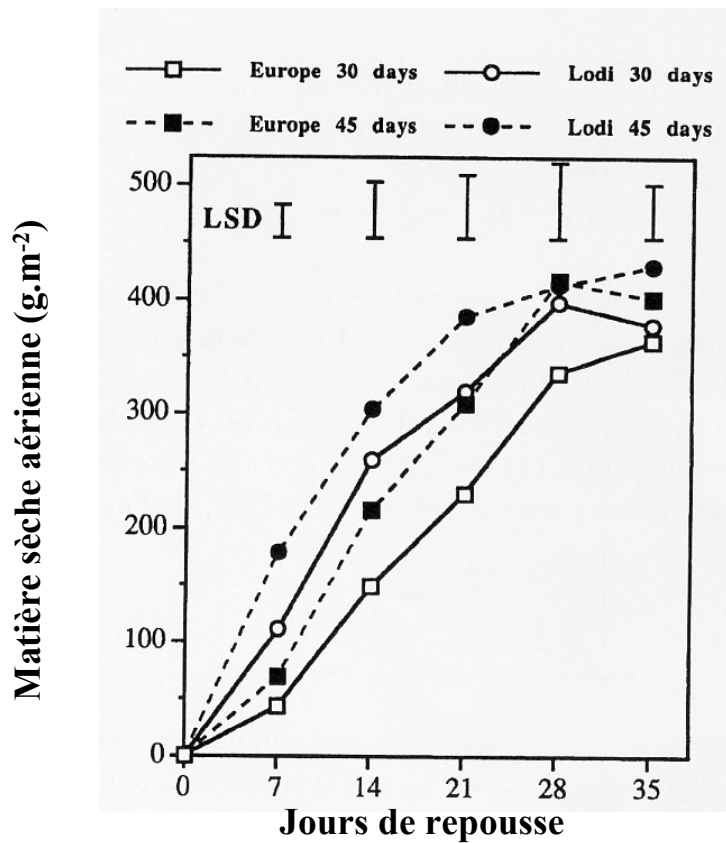
**La coupe, en fonction de son intensité, induit des réponses à court terme (de quelques heures à quelques jours) qui permettent de restaurer une balance carbonée positive, grâce à la construction de nouveaux organes foliaires (Lemaire et Allirand, 1993 ; Richards, 1993).** En effet, la suppression partielle des parties aériennes entraîne une réduction des entrées de carbone *via* la diminution de la surface foliaire et de la capacité photosynthétique associée. Les organes épargnés par la coupe continuent cependant à avoir leurs activités propres, et consomment notamment du carbone pour leur respiration de maintenance (Amthor, 1984). Ces deux mécanismes contribuent alors à créer une balance carbonée négative car les besoins en carbone de la plante ne sont plus satisfaits par la photosynthèse (Lemaire, 1999). La coupe induit aussi une diminution des flux de sève phloémique et xylémique car elle réduit respectivement l'activité de chargement du phloème et l'évapotranspiration (Richards, 1993). L'ensemble de ces perturbations conduit à une réorientation rapide de la distribution des composés disponibles au sein de la plante vers les



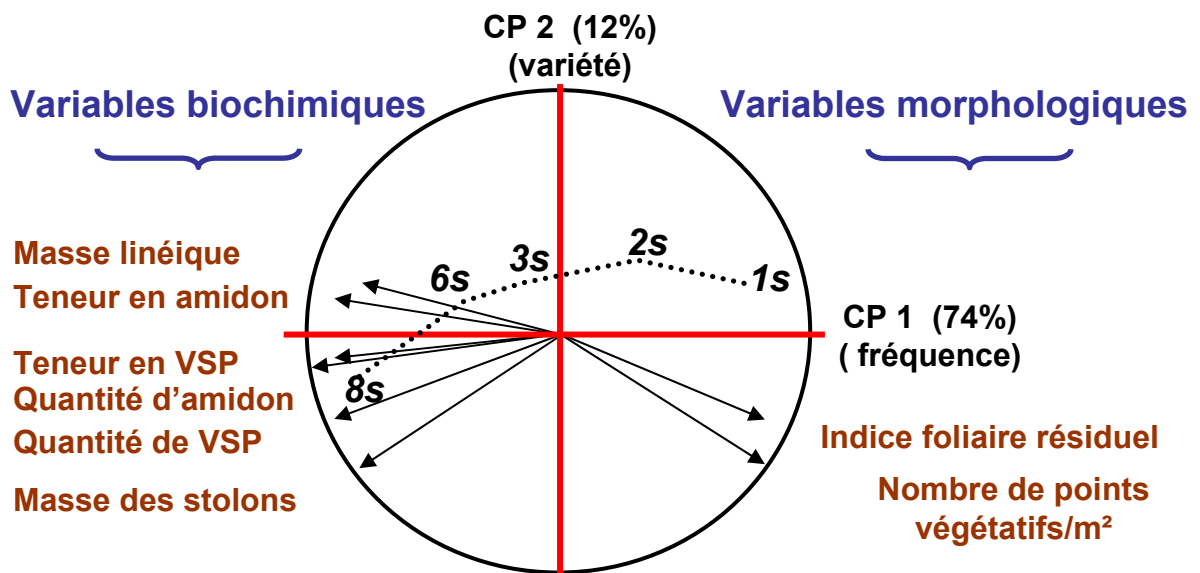
**Figure 1.5:** Effet d'une suppression croissante (0, 25, 50 et 75%) des feuilles des chaumes sur la production de biomasse aérienne après 22 jours de repousse pour des luzernes nodulées (d'après Quinn *et al.*, 1996). Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 6$ .

méristèmes foliaires épargnés par la coupe. Ces méristèmes sont des organes puits importants pour le carbone et l'azote (Engels, 1994) et leur forte croissance permet de restaurer une capacité photosynthétique importante (Phillipot, 1990 ; Richards, 1993).

L'ablation des organes foliaires entraîne aussi une diminution du nombre de méristèmes caulinaires et apicaux chez les plantes à port dressé comme la luzerne. Cette diminution, dont l'amplitude est liée à l'intensité de la coupe, semble généralement avoir plus de conséquences sur la vitesse de la repousse que sur la perte proportionnelle de biomasse aérienne ou de surface foliaire observée chez les herbacées (Briske, 1996 ; Bilbrough et Richards, 1993). La suppression des parties aériennes entraîne par ailleurs une ablation de tissus d'âges et de types différents. Son impact sur les capacités photosynthétiques résiduelles dépend alors des caractéristiques des organes restant en place. Chez les graminées, la suppression de vieilles feuilles semble avoir moins de conséquences sur les capacités photosynthétiques des organes épargnés par la coupe que la suppression de jeunes feuilles (Gold et Caldwell, 1989). Cependant, les capacités photosynthétiques des vieilles feuilles, bien que généralement faibles, ne sont pas négligeables quant à la fourniture d'assimilats carbonés aux bourgeons axillaires les plus proches (Hodgkinson, 1972 ; Richards, 1993). Chez la luzerne, Hodgkinson (1972) a montré, après 11 jours de marquage au  $^{14}\text{C}$ , que les assimilats issus de ces feuilles âgées sont principalement dirigés vers les organes en croissance issus des bourgeons axillaires, les bourgeons du collet étant pour leur part soumis à une inhibition de leur initiation due à l'ombrage. Il faut par ailleurs souligner que les capacités photosynthétiques des vieilles feuilles peuvent être augmentées après la coupe jusqu'à des capacités proches de jeunes feuilles fraîchement déployées, si bien que le terme de « rajeunissement » est employé par certains auteurs pour ces organes (Hart *et al.*, 1978). Plusieurs études montrent qu'il existe une corrélation positive entre la surface foliaire résiduelle, présente au jour de coupe, et la production de matière sèche chez la luzerne (Leach, 1969 ; Foutz *et al.*, 1976 ; Hart *et al.*, 1978). **Toutefois, dans ces études, les effets de la surface foliaire résiduelle sur la productivité de la luzerne ont été principalement interprétés grâce à des traitements jouant sur la hauteur de coupe, et très rarement sur la surface foliaire seule.** L'analyse bibliographique révèle qu'une seule expérimentation menée chez la luzerne et présentant des effets de défoliations de 0, 25, 50 et 100% des feuilles des chaumes restant après une coupe a été réalisée (Quinn *et al.*, 1996 ; Figure I.5). Cette expérimentation avait pour but de tester l'effet de ces défoliations croissantes en simulant l'effet d'insectes phytophages de la luzerne telle que la sitone (*Sitona hispidulus*). Ces auteurs



**Figure I.6:** Effet du rythme de coupe rapide (30 jours) ou lent (45 jours) sur la production de biomasse aérienne au cours d'une repousse de 35 jours après coupe chez deux variétés de luzerne (Europe et Lodi). LSD = Least Standard deviation (Avicé *et al.*, 1997a).



**Figure I.7:** Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les données relatives aux variables morphologiques et biochimiques de trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) soumis à différentes fréquences de coupe (de 1, 2, 3, 6 et 8 semaines; Simon *et al.*, 2004).



ont alors montré qu'une augmentation de la défoliation induisait une diminution relativement proportionnelle de la masse des racines, ainsi que de la production de matière sèche aérienne de la culture (Figure I.5). **L'ensemble de ces résultats montre qu'une approche dissociant les effets de la hauteur de coupe et de la surface foliaire résiduelle sur la dynamique de repousse de la luzerne est nécessaire.**

### **B.1.2 Impact de la fréquence de la coupe sur la repousse**

**La fréquence de la coupe**, définie par le rythme d'exploitation de la culture, **induit des réponses qui sont mises en place à moyen ou à long terme (de l'ordre de quelques jours à quelques semaines ; Richards, 1993)**. Chez la luzerne, par rapport à des rythmes de coupe rapides (de l'ordre de 30 jours), l'application de rythmes lents (de l'ordre de 45 jours) conduit à un indice foliaire plus important, une biomasse aérienne produite plus élevée (Avice *et al.*, 1997a, b ; Figure I.6), ainsi qu'à un niveau plus important de réserves carbonées et azotées au niveau du système racinaire (Gramshaw *et al.*, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus récemment chez le trèfle blanc (Simon *et al.*, 2004). Partant d'un couvert initialement homogène, cinq rythmes de coupe différents et correspondant à des situations rencontrées dans la pratique ont été appliqués : des rythmes rapides, observés en pâturage continu (1 et 2 semaines de repousse entre chaque coupe), des rythmes lents pratiqués pour l'ensilage ou le foin, (8 semaines), en passant par des rythmes intermédiaires (de 3 et 6 semaines). Après coupe et obtention d'un nouvel état initial du couvert, une ACP sur le tableau des données croisant les variables morphologiques et biochimiques avec les individus correspondants aux 5 rythmes de coupe, montre le poids déterminant du rythme de coupe sur cet état (Figure I.7). L'effet du rythme de coupe explique près de 75% de la variabilité des paramètres caractérisant la morphologie et l'état biochimique de la plante, contre seulement 12% pour l'effet variété. Ces auteurs ont ainsi montré que pour les rythmes de coupe rapides, les réserves carbonées et azotées sont plus faibles, alors que l'appareil foliaire résiduel et le nombre de sites de croissance sont significativement plus importants. Ce mécanisme adaptatif est alors favorable à une reprise précoce de l'activité photosynthétique et à une croissance lors de la repousse suivante basée sur l'assimilation de carbone et d'azote exogènes. Pour les rythmes lents, cette repousse est à l'inverse basée sur la mobilisation de réserves carbonées et azotées significativement plus importantes (biomasse des stolons, teneurs en amidon et en protéines de réserve augmentées), car l'appareil foliaire est alors fortement réduit.

**Tableau I.3:** Production de la luzerne récoltée selon quatre fréquences de coupe différentes (Lemaire et Allirand, 1993).

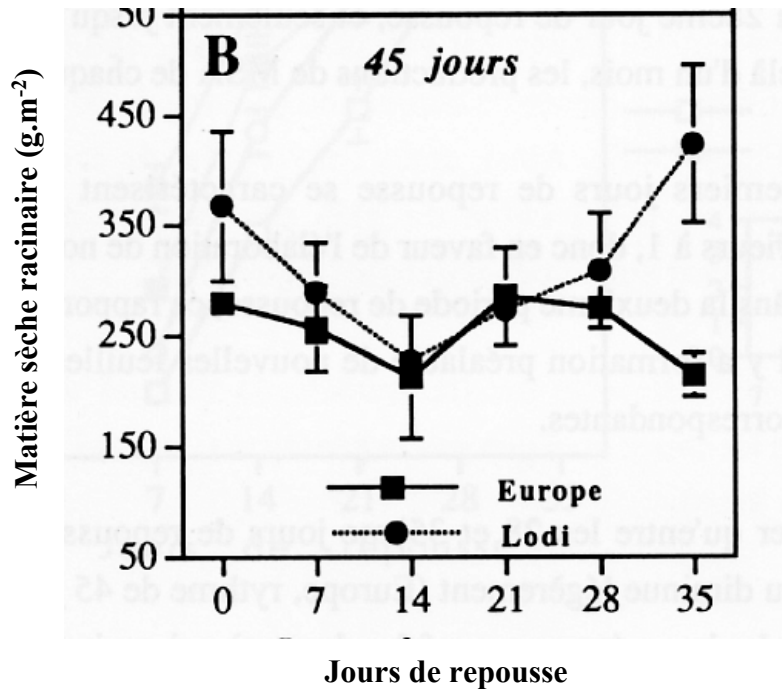
	<b>Régime 1</b> (60 jours)	<b>Régime 2</b> (45 jours)	<b>Régime 3</b> (35 jours)	<b>Régime 4</b> (28 jours)
<b>Matière sèche (t.ha<sup>-1</sup>)</b>	19,97	17,83	16,06	14,28

Par ailleurs, de tels traitements peuvent aussi induire une adaptation progressive de la morphologie de la plante au rythme de la coupe (Phillipot, 1990). Ils peuvent ainsi contribuer à l'émergence d'une stratégie «d'évitement» en coupes fréquentes permettant à la plante de développer davantage de nouveaux organes aériens ou de sites potentiels de croissance sous le niveau de coupe (Briske, 1996). Ces réponses sont néanmoins variables et sont moins développées chez les plantes à port dressé telle que la luzerne, que chez certaines espèces prairiales telles que le trèfle blanc, le ray-grass, ou la fétuque élevée (Lemaire, 1999).

### **B.1.3 Interactions entre l'intensité et la fréquence de la coupe**

**Les deux paramètres que sont l'intensité et la fréquence de la coupe sont relativement faciles à gérer au niveau de la parcelle, et de nombreuses études agronomiques ont permis de montrer leur impact sur la pérennité, la production et la qualité de la culture (Leach 1967 ; Brink et Marten, 1989 ; Lemaire et Allirand, 1993 ; Avice *et al.*, 1997a).** Le tableau I.3 montre qu'un régime de fauche de 35 jours permet une production de 16 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> (Lemaire et Allirand, 1993). Une production de 20 t MS aérienne.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> est obtenue pour des régimes de coupe de 60 jours, mais cette augmentation de la productivité est réalisée au détriment de la qualité du fourrage dont la digestibilité et les teneurs en matières azotées totales et en protéines chutent fortement (Tableau I.1). De même, il a été montré qu'une coupe plus basse entraîne une augmentation de la quantité de fourrage récoltée sur le court terme (Cabon, 1982). Cependant, à rythme de coupe constant, une coupe plus rase entraîne aussi une diminution de la pérennité de la culture sur le long terme, suite à une diminution de la quantité de réserves disponibles et un retour plus tardif à une balance carbonée équilibrée (Smith et Nelson, 1967 ; Brink et Marten, 1989 ; Avice *et al.*, 1997a). Pour ne pas pénaliser la productivité de la culture, des temps de repousse suffisants sont donc nécessaires quand les coupes sont sévères, comme l'avaient déjà remarqué Langer et Steinke (1965) et Smith et Nelson (1967).

L'ensemble de ces observations a montré que la fréquence et l'intensité de la coupe sont deux paramètres en interaction et que la fréquence de la coupe influe plus sur le long terme, alors que l'intensité de la coupe influe davantage sur le court terme (Kust et Smith, 1961 ; Reynolds, 1971 ; Brink et Marten, 1989). **L'optimisation du compromis existant entre la production, la qualité et la pérennité de la culture de la luzerne passe donc par une gestion adaptée de l'intensité et de la fréquence de la coupe, et par une meilleure**



**Figure I.8:** Effet d'un rythme de coupe de 45 jours sur la production de biomasse racinaire au cours d'une repousse de 35 jours après coupe chez deux variétés de luzerne (Europe et Lodi). Les barres verticales représentent  $\pm$ E.S. de la moyenne pour  $n = 5$  (Avice *et al.*, 1997a).

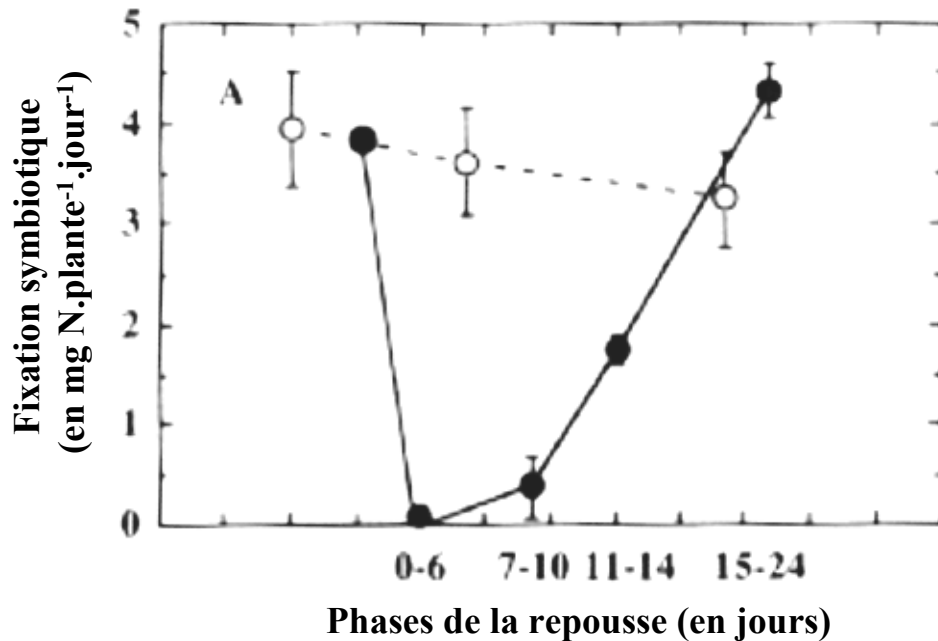
**connaissance des effets individuels de ces deux paramètres au niveau de la plante entière. En effet, la majorité des traitements agronomiques classiques ont contribué à moduler ces deux paramètres simultanément, et non individuellement.** Par exemple, et comme nous avons pu le voir précédemment, une fréquence de coupe élevée modifie la morphologie de la plante et contribue au développement d'une surface foliaire résiduelle plus importante que pour des plantes dont la fréquence de coupe est plus faible (à hauteur de coupe constante). De même, une coupe plus sévère conduit à diminuer le nombre de bourgeons axillaires (donc le nombre de sites potentiels de croissance), ainsi que des quantités de réserves carbonées et azotées des chaumes, directement disponibles pour la repousse (Leach, 1967 ; Lemaire *et al.*, 1992).

## **B.2- Effets de la coupe sur la croissance racinaire**

Chez les plantes fourragères, de nombreux travaux ont montré que la suppression plus ou moins sévère des parties aériennes entraîne une diminution significative de la croissance racinaire (Davidson et Milthorpe, 1966 ; Ryle et Powell, 1975 ; Richards, 1993). Chez la luzerne, les organes souterrains contiennent en effet la plus grande partie des réserves carbonées et azotées qui sont fortement sollicitées lors de la repousse après la coupe, ce qui leur confère un rôle d'organe source (exportateur de composés C et N) très important. Par exemple, une coupe après 45 jours de repousse chez deux variétés de luzerne (Lodi et Europe) diminue la biomasse des racines de plus de 30% après 14 jours de repousse (Figure I.8 ; Avice *et al.*, 1997a). Chez le ray-grass, Jarvis et Macduff (1989) ont par ailleurs montré que le nombre de nouvelles racines chez les plantes coupées est fortement diminué par rapport aux plantes non coupées. Cette diminution est de plus accompagnée par une perte numérique et pondérale importante des nodosités fixatrices d'azote chez le trèfle blanc (Marriot et Haystead, 1990) et par une chute proportionnelle des cellules contenant les bactéroïdes chez la luzerne (Vance *et al.*, 1979 ; Cralle et Heichel, 1981).

## **B.3- Effets de la coupe sur le métabolisme racinaire**

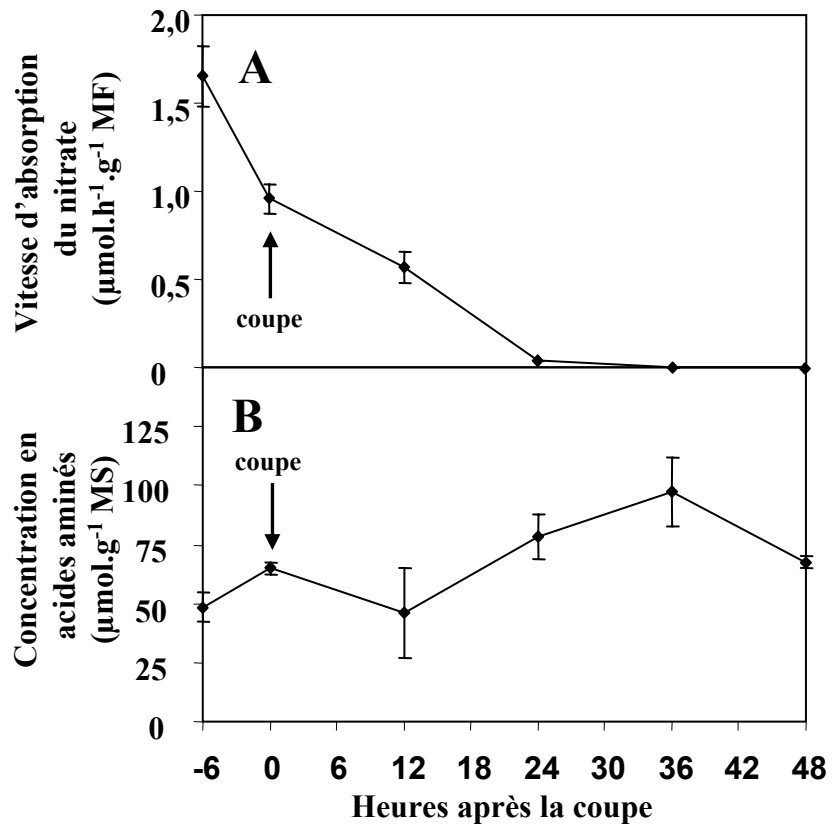
Parallèlement à ces perturbations de la croissance racinaire, une réduction de l'intensité respiratoire des racines est observée pendant les premiers jours suivant la coupe



**Figure I.9:** Evolution de la fixation symbiotique (en mg N.plante<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup>) au cours de la repousse chez des plantes coupées à 6 cm (symboles pleins) ou non coupées (symboles creux). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 9$  (Kim *et al.*, 1993).

chez les graminées fourragères (Davidson et Milthorpe, 1966 ; Thorgeirson, 1988). De nombreux travaux ont par ailleurs mis en évidence que la fixation d'azote atmosphérique des légumineuses est fortement réduite (d'environ 90%) après la coupe et que cette dernière reste très faible au cours des jours suivants (Cralle et Heichel, 1981 ; Kim *et al.*, 1993, Figure I.9). Cette diminution de la fixation est principalement due à la chute de l'activité nitrogénase, enzyme responsable de la réduction du N<sub>2</sub> atmosphérique en ammonium dans les nodules de la plante. Elle est aussi accompagnée d'une chute de nombreuses activités enzymatiques des nodosités impliquées dans le métabolisme des acides aminés (Gordon et Kessler, 1990). Chez le trèfle blanc, cette chute de la fixation symbiotique est également due à la diminution de la fourniture en assimilats carbonés aux nodules (Ryle *et al.*, 1986 ; Gordon et Kessler, 1990) mais elle résulte aussi d'une modification de la perméabilité à l'oxygène des nodules. En effet, la coupe entraîne une augmentation de la pression partielle en oxygène au niveau des nodules et provoque une chute de l'activité nitrogénase par inactivation enzymatique (Denisson *et al.*, 1992).

L'absorption racinaire de l'azote minéral du sol est fortement réduite après la coupe chez la luzerne (Kim *et al.*, 1993) comme chez de nombreuses plantes fourragères. Cette réponse est très rapide et survient dès les premières heures après la coupe. Ainsi, chez le ray-grass, cette chute est significative dès les 30 premières minutes après la coupe. Elle est proche de 60% après deux heures puis devient très faible lors des premiers jours après la coupe (Clément *et al.*, 1978). **Même si l'ensemble des mécanismes impliqués dans la régulation des capacités d'absorption de l'azote minéral restent encore imparfaitement compris chez la luzerne**, il a été montré que l'activité de la nitrate réductase, enzyme catalysant la réduction du nitrate en nitrite et agissant comme étape limitante de l'absorption nitrique par la plante (Imsande et Touraine, 1994), est fortement diminuée après la coupe (Boucaud et Bigot, 1989). Certains auteurs ont aussi émis l'hypothèse que les systèmes de transport de l'azote minéral sont soumis à une régulation négative de la part des acides aminés et du nitrate circulant, dont les teneurs augmentent transitoirement dans les tissus en réponse à la suppression des parties aériennes (Touraine *et al.*, 2001). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, la suppression des organes puits majeurs pour l'azote que sont les feuilles et les tiges en croissance provoque une augmentation transitoire du nitrate et des acides aminés au niveau des parties racinaires (Touraine et Gojon, 2001). Un mécanisme similaire est aussi observé chez le ray-grass anglais où les teneurs en acides aminés sont fortement augmentées 24 à 36 heures après la coupe, alors que l'absorption racinaire de l'azote est fortement diminuée dans



**Figure I.10:** Evolution de la vitesse d'absorption du nitrate (A) et de la concentration en acides aminés (B) dans les racines au cours des 48 heures suivant la défoliation de ray-grass anglais précultivés pendant 10 jours sur 1.0 mM de  $\text{KNO}_3$ . Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  (d'après Louahlia *et al.*, 1999).



le même temps, pour des plantes pré-cultivées sur des milieux de culture supplémentés ou non en azote (Figure I.10 ; Louahlia *et al.*, 1999). **Cependant, et à notre connaissance, un tel mécanisme n'a pas encore été observé chez la luzerne et reste à démontrer.**

Les entrées de carbone (par photosynthèse) et d'azote (par fixation symbiotique et / ou absorption racinaire) dans la plante sont fortement limitées lors des premiers jours suivant la coupe. Les organes pérennes tels que les chaumes (constitués par les tiges et les feuilles épargnés par la coupe) et les parties souterraines, sont alors mis à contribution lors de la repousse après coupe. Ces différents organes contiennent en effet des réserves carbonées et azotées qui seront mobilisées pour assurer un retour plus ou moins rapide à une balance carbonée positive et permettre la construction de nouveaux organes aériens photosynthétiques dans les plus brefs délais. Face à ces réductions des capacités d'acquisition de l'azote et du carbone liées à la coupe, **la reprise de la croissance va donc dépendre essentiellement de du niveau des réserves organiques dans les organes laissés en place par la coupe (chaumes et parties racinaires) et de la capacité de la plante à les utiliser.**

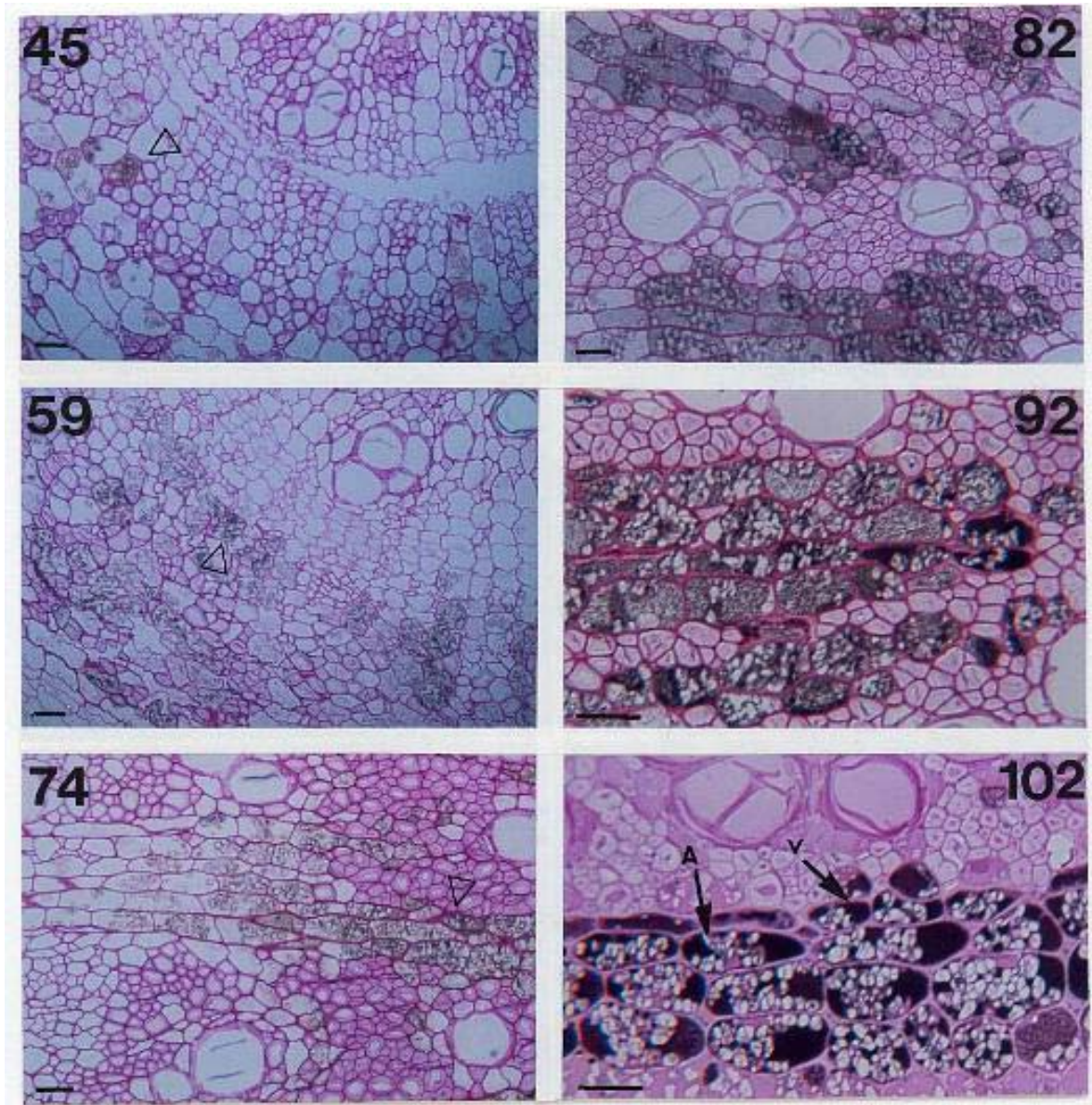
## **C– Contribution des réserves carbonées et azotées à la repousse**

### **C.1- Stockage et mobilisation des réserves C et N :**

Les plantes pérennes et annuelles sont confrontées à des conditions biotiques et abiotiques sans cesse changeantes au cours de leur développement. Le stockage et la mobilisation de composés azotés et carbonés font partie des mécanismes physiologiques majeurs qui permettent à la plante d'assurer sa croissance lors de phases critiques liées à son mode d'exploitation ou à des changements importants de conditions du milieu.

#### **C.1.1 Mécanismes de mise en réserve du carbone et de l'azote**

Les mécanismes impliqués dans la mise en réserve de composés carbonés et azotés font intervenir des organites spécialisés dans le stockage tels que la vacuole (Raven, 1987), les corps protéiques (Higgins, 1984), ou encore l'amyloplaste (Zamski, 1996). Au niveau de la plante entière, le stockage de composés de réserve est réalisé quand l'acquisition des ressources est excédentaire par rapport à leur utilisation (Heilmeyer *et al.*, 1994, Thornton *et al.*, 2000 ; Ourry *et al.*, 2001). Par exemple, une mise en réserve d'azote et de carbone sous la forme de protéines et d'amidon est possible en automne lorsque la croissance foliaire est



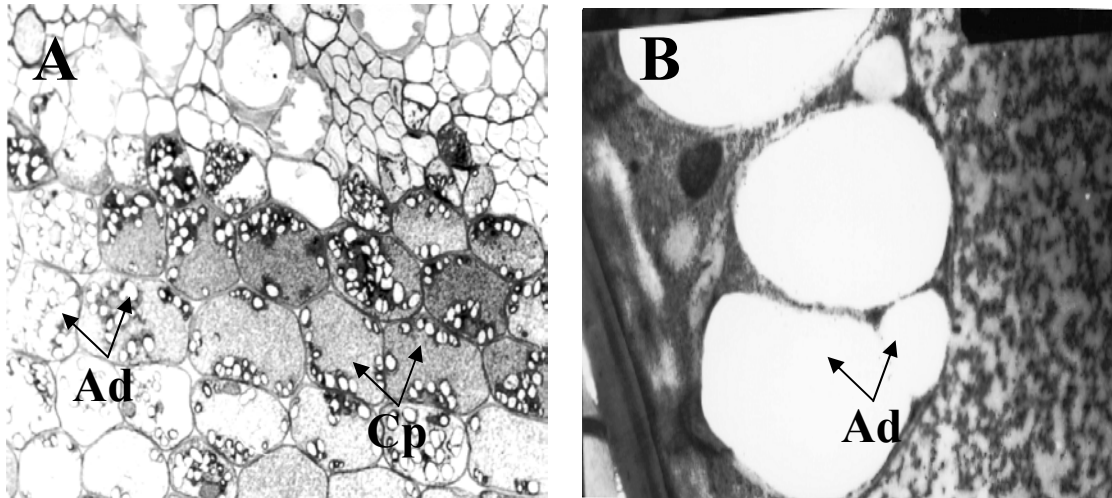
**Figure I.11:** Evolution de la coloration à l'or colloïdal des protéines de réserve (VSP) dans les tissus du pivot de luzerne au cours du développement de la plante (45, 59, 74, 82, 92 et 102 jours après le semis). Les barres verticales correspondent à 20  $\mu\text{m}$ . A, Amidon (grains achromatiques) ; V, Vacuole. La coloration brune révèle la présence des VSP. (Avice, 1996).

limitée par la diminution de l'héméroperiode et / ou de la température (Edminsten et Wolf, 1988 ; Thornton *et al.*, 2000). Sous ces conditions, cette accumulation quantitative de carbone et d'azote sous la forme de réserves organiques, permet d'éviter une régulation négative de leur acquisition ou de leur assimilation par la plante (Millard, 1988). Par exemple, une mise en réserve d'azote sous forme de protéines contribue à diminuer les teneurs en acides aminés libres et permet ainsi d'éviter un rétro-contrôle négatif de l'absorption racinaire de l'azote par ces derniers (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002). De même pour l'amidon, l'accumulation de ce polymère carboné de réserve permet de diminuer les teneurs en saccharose circulant au niveau du phloème et diminue ainsi le rétro-contrôle négatif exercé par ce dernier sur les enzymes clés responsables de la photosynthèse et de la synthèse de sucres au niveau foliaire (Jang et Sheen, 1994 ; Paul et Driscoll, 1997).

Cependant, cette accumulation peut être aussi le fait d'un programme ontogénétique propre à l'espèce concernée et être ainsi en partie en compétition avec la croissance de la plante (Ourry *et al.*, 2001). Par exemple, dans le pivot de luzerne, Avice (1996b) puis Kalengamaliro *et al.* (1997) ont montré que l'accumulation de l'amidon ainsi que des protéines solubles particulières telles que les VSP (Vegetative Storage Proteins) n'était réalisée qu'à partir de 40 jours après le semis (Figure I.11). En effet, chez la luzerne, cette mise en réserve est spécifique d'un tissu de stockage particulier, le parenchyme xylémique et phloémique du pivot, et cette période de 40 jours est nécessaire au développement de ce tissu de réserve. Cependant, cette mise en réserve s'effectue alors que la plante connaît une phase de développement importante. On assiste ainsi à une compétition partielle pour les assimilats C et N entre leur stockage et leur utilisation pour la croissance.

### **C.1.2 Mobilisation des réserves C et N**

La mobilisation des réserves est un processus actif, nécessitant l'action d'enzymes hydrolytiques, qui vise à fournir rapidement les composés indispensables à la croissance et au développement des organes puits lorsque l'acquisition de ressources exogènes ne peut satisfaire la demande de ces organes (Ourry *et al.*, 2001). Cependant, le niveau de contribution de ces composés aux tissus puits en développement dépend non seulement de l'espèce végétale étudiée mais aussi du niveau de la nutrition azotée, de la forme d'azote apportée après la coupe, de la température (Thornton *et al.*, 1993), ou encore de l'intensité (Hodgkinson, 1973 ; Brink et Marten, 1989) et de la fréquence de la coupe (Thornton et Millard, 1997). Chez les plantes fourragères, l'azote remobilisé à partir des réserves



**Figure I.12:** Observation en microscopie photonique (A) et électronique (B) de la formation de grains d'amidon (Ad) dans les amyloplastes des cellules du parenchyme phloémique (Cp) du pivot de luzerne (Avice, 1996).

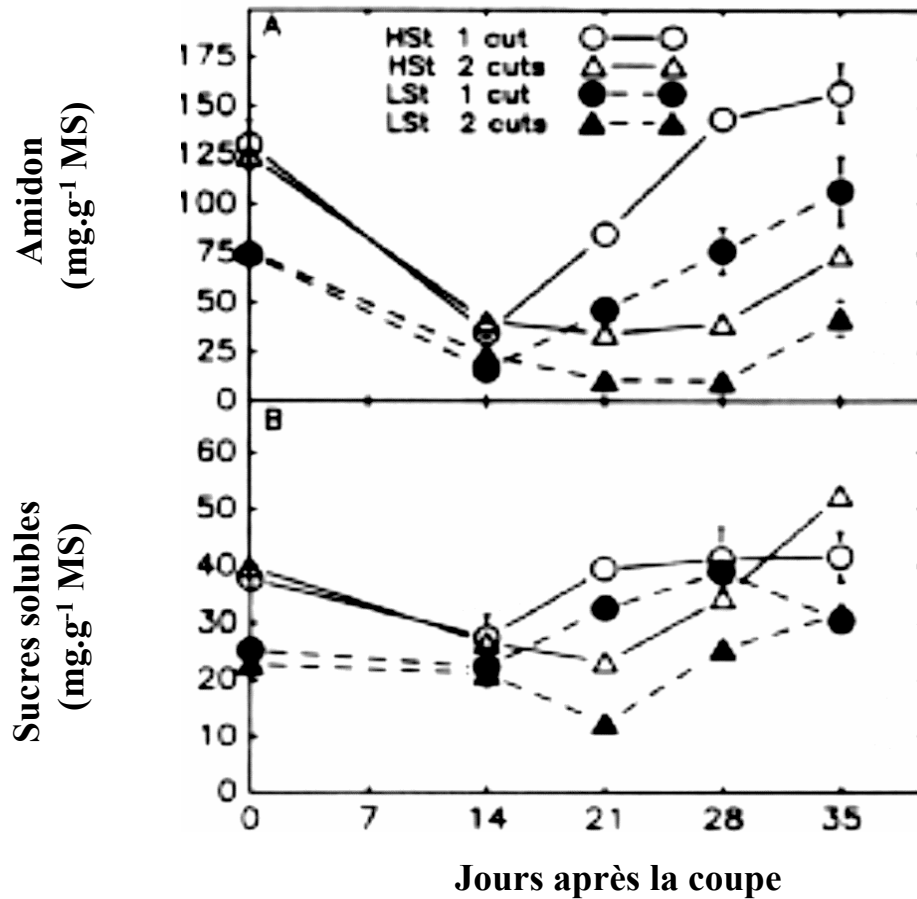
représente par exemple une forte proportion de l'azote foliaire total lorsque les plantes repoussent sur un milieu pauvre en azote, alors qu'*a contrario*, cette proportion est faible lorsque les plantes repoussent sur un milieu riche en azote (Ourry *et al.*, 1990 ; Millard *et al.*, 1990 ; Thornton *et al.*, 1994, Noquet *et al.*, 2001). Chez la luzerne, cette mobilisation des réserves survient lors de la repousse après la coupe, mais aussi lors de phases critiques de croissance comme lors de la croissance aérienne au printemps, phases où la demande des organes puits est soutenue et intense.

## **C.2- Contribution des réserves carbonées à la reconstitution des organes aériens**

### **C.2.1 Composition biochimique des réserves carbonées**

Depuis les travaux réalisés chez la luzerne par Graber *et al.* en 1927 et Granfield en 1943, il était communément admis que la production et la pérennité de la luzerne étaient fortement dépendantes de sa capacité à mettre en réserve des glucides dans ses organes pérennes. Ainsi, chez les fabacées fourragères telles que la luzerne et le trèfle, il a été montré que l'amidon représente la forme majoritaire de stockage des glucides non structuraux (Boyce et Volenec, 1992 ; Ourry *et al.*, 1994), alors que les réserves carbonées sont essentiellement retrouvées sous forme de fructanes chez les poacées fourragères telles que le ray-grass (Chatterton *et al.*, 1989 ; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Chez la luzerne, l'amidon est essentiellement accumulé au niveau des parties racinaires, et notamment au niveau du pivot (Figure I.12). Dans cet organe, il peut alors représenter jusqu'à environ 70% de l'amidon total racinaire (Ourry *et al.*, 1994). En conditions de plein champ, l'amidon est présent à des teneurs comprises entre 15 et 580 mg.g<sup>-1</sup> MS de racines (Frankhauser *et al.*, 1989 ; Brown *et al.*, 1990) selon le stade de la repousse et la saison (Figure I.13 ; Boyce et Volenec, 1992). Il peut aussi être retrouvé dans les tiges des chaumes en moindre quantité (jusqu'à 10 mg par plante ; Ourry *et al.*, 1994).

Des glucides solubles tels que le glucose, le fructose, et plus particulièrement le saccharose, sont présents dans tous les organes et sont aussi susceptibles d'être utilisés par les organes en formation lors de la repousse après la coupe (Smith et Marten, 1970; Avice *et al.*, 1996b). Les racines peuvent par exemple contenir jusqu'à 100 mg.g<sup>-1</sup> MS de sucres solubles, et le saccharose peut représenter plus de 90% de ces derniers (Frankhauser *et al.*, 1989 ;



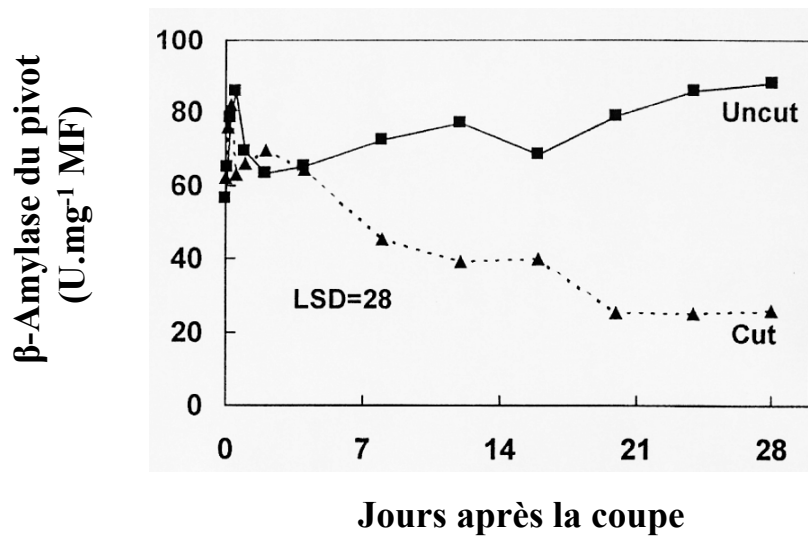
**Figure I.13:** Teneurs en amidon (A) et en sucre solubles totaux (B) du pivot de luzerne pendant 35 jours de repousse pour des plantes coupées une fois (1 cut) au jour 0, ou coupées deux fois (2 cuts), au jour 0 et au jour 14. Deux géotypes présentant des teneurs en amidon élevées (HSt pour High Starch) ou faibles (LSt pour Low Starch) ont été utilisées. Les barres verticales indiquent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 8$  (Boyce and Volenec, 1992).

Rechel, 1993). Chez la luzerne, comme pour plus de 50 autres espèces de légumineuses, le saccharose représente la forme majoritaire de carbohydrates solubles et constitue la forme principale de transport du carbone par les vaisseaux conducteurs du phloème entre les différents organes de la plante (Ziegler, 1975). Des prélèvements de sève phloémique par exsudation facilitée (avec un chélateur de cations tel que l'EDTA) ont par exemple montré que des concentrations en saccharose voisines de 604 mM sont observées dans les tiges de luzerne (Pate, 1980). Ce composé représente par ailleurs près de 90 % de l'ensemble des sucres présents dans la sève phloémique, alors que du glucose et du fructose sont retrouvés en faibles quantités (Ziegler, 1975). Cependant, la récolte d'exsudats après stylectomie de pucerons à récemment permis de montrer que le glucose et le fructose pourraient provenir d'une activité invertase acide dans la solution collectée par exsudation facilitée, et que le saccharose représenterait alors près de 100 % de l'ensemble des sucres solubles de la sève phloémique (Girousse *et al.*, 1996).

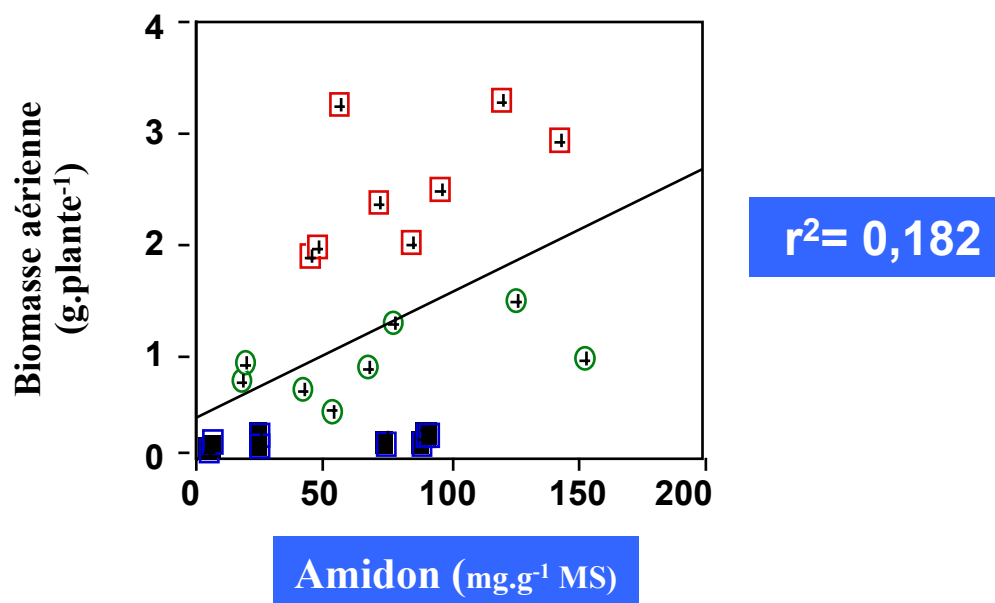
### **C.2.2 Contribution des réserves carbonées à la repousse**

Les premières études (Graber *et al.*, 1927 ; Granfield, 1943), reprises en partie par Boyce et Volenec (1992), ont mis en évidence une chute considérable des teneurs en sucres non structuraux (amidon et sucres solubles) dans les organes souterrains de la luzerne au cours des 10 premiers jours de repousse de la luzerne avec une baisse de 78% pour l'amidon et de 40% pour les sucres solubles (Figure I.13). De même, chez le ray-grass anglais, il a été montré que la teneur en fructanes (réserve carbonée majoritaire chez les poacées) chute de respectivement 50 et 84% dans les gaines et les bases de feuilles en croissance seulement 12 heures après la coupe (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Cette diminution semble être le résultat de la diminution plus ou moins intense de la photosynthèse (fonction de l'intensité de la coupe) et surtout d'une augmentation de l'activité des hydrolases telles que la fructane-exohydrolase chez le ray-grass (Prud'homme *et al.*, 1992, Morvan-Bertrand *et al.*, 1999) et endo-amylase chez la luzerne (Habben et Volenec, 1990 ; Figure I.14).

L'ensemble de ces résultats pourrait laisser penser, *a priori*, que la vitesse de la repousse serait fortement liée au niveau d'accumulation des réserves carbonées. Cependant, depuis quelques années, le rôle de ces réserves a été considérablement réévalué. Ainsi, il a été montré chez la luzerne qu'il n'existait pas de corrélation significative entre la teneur en sucres non structuraux dans les organes pérennes et la production de matière sèche aérienne après la



**Figure I.14:** Evolution après coupe (Cut) ou non (Uncut) de l'activité  $\beta$ -Amylase dans le pivot de la luzerne (Gana *et al.*, 1998). LSD = Least Standard Deviation de la moyenne pour  $n = 6$ .



**Figure I.15:** Corrélation entre la biomasse aérienne produite après 35 jours de repousse par 2 variétés de luzerne (Lodi et Europe) et les teneurs racinaires initiales en amidon observées au jour de coupe (d'après Avice *et al.*, 1997).



coupe (Ourry *et al.*, 1994 ; Avice *et al.*, 1997b ; Volenec *et al.*, 1998 ; Dhont *et al.*, 2002 Figure 1.15). De même, l'utilisation de techniques de marquage isotopique au  $^{13}\text{C}$  ou au  $^{14}\text{C}$  a permis de montrer qu'une partie importante du carbone des réserves des organes épargnés par la coupe est utilisée pour la respiration de ces organes, de façon à assurer la production de l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leur métabolisme (Danckwerts et Gordon, 1987 ; Ta *et al.*, 1990 ; Avice *et al.*, 1996b ; De Visser *et al.*, 1997). Chez la luzerne, Avice *et al.* (1996b) ont par exemple montré après double marquage au  $^{13}\text{C}$  et au  $^{15}\text{N}$  des réserves qu'environ 84% du  $^{13}\text{C}$  de ces réserves a été utilisé pour la respiration racinaire et que seulement 5% de ce dernier était retrouvé dans les nouvelles feuilles et les nouvelles tiges après 30 jours de repousse. De plus, ces auteurs ont montré qu'une forte proportion du  $^{15}\text{N}$  des réserves était retrouvée dans les organes foliaires en croissance pour la même période (soit 34%), et que 58% du  $^{13}\text{C}$  présent dans ces organes pouvait provenir des protéines solubles et des acides aminés mobilisés (Avice *et al.*, 1996b ; Volenec *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces observations a donc révélé que **le rôle des réserves carbonées semble être déterminant pour la fourniture d'énergie aux organes en repousse. Cependant, la contribution de ces composés à la fourniture en carbone nécessaire à l'élaboration des nouveaux organes aériens est plus faible que ce qui était classiquement admis. Devant un tel constat, le rôle des réserves azotées a alors été reconsidéré.**

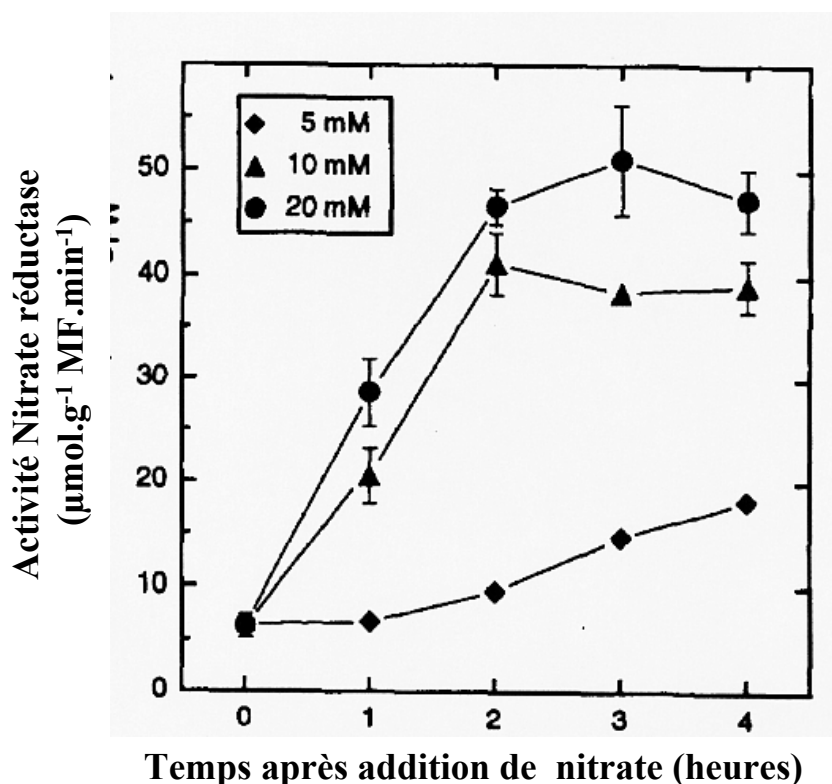
### **C.3- Contribution des réserves azotées à la reconstitution des organes aériens**

#### **C.3.1 Composition biochimique des réserves azotées**

De nombreux travaux réalisés au cours des dernières années sur diverses espèces ont permis de montrer l'importance des réserves azotées quant à la fourniture de substrats azotés (et carbonés) lors de phases critiques de croissance telles que le passage d'un stade végétatif à un stade reproducteur, la reprise de la croissance au printemps, ou bien la repousse après la coupe (Millard, 1993; Chapin *et al.*, 1990; Staswick, 1994; Stépien *et al.*, 1994; Volenec *et al.*, 1996 ; Ourry *et al.*, 2001). Chez la luzerne, ces réserves sont principalement localisées au niveau des organes pérennes souterrains, et plus particulièrement au niveau du pivot. Elles sont majoritairement constituées, par ordre croissant d'importance, par le nitrate, par les acides aminés libres et les protéines solubles. Le nitrate et les acides aminés libres peuvent être transitoirement stockés dans la plante, néanmoins ces réserves sont quantitativement

**Tableau I.4:** Concentration en nitrate et activité de la nitrate réductase dans des cellules de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*) cultivées pendant 3 jours dans un milieu contenant 5, 10 ou 20 mM de nitrate (d'après Zhang et Mac Kown, 1993).

Milieu de Culture (mM NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Concentration en nitrate (μmol.g <sup>-1</sup> MF)	Activité nitrate réductase (μmol.g <sup>-1</sup> MF.min <sup>-1</sup> )
5	0.06	8.8 ±1.1
10	1.68	12.5 ±0.4
20	12.20	18.4 ±2.6



**Figure I.16:** Induction de la nitrate réductase dans des cellules de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*) pré-cultivées pendant 3 jours dans un milieu privé en azote, puis transférées sur un milieu contenant 5, 10 ou 20 mM de nitrate. Les barres verticales représentent ± E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  (Zhang et Mac Kown, 1993).

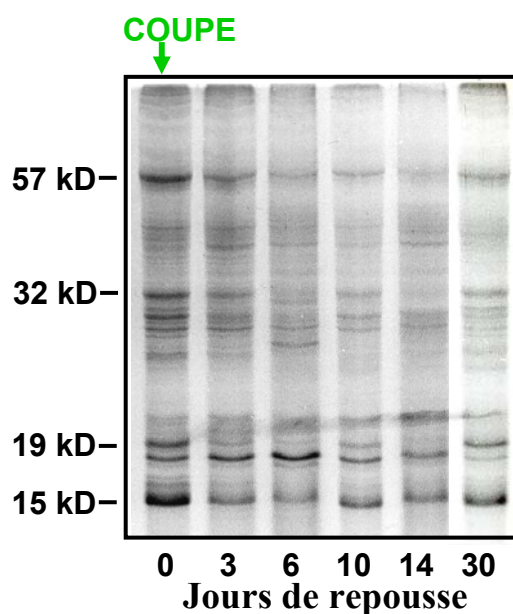
limitées et sont ainsi rapidement utilisées lorsque la plante doit puiser dans ses réserves azotées lors de phases de croissance intense (Ourry *et al.*, 2001).

Le nitrate peut être transitoirement accumulé au niveau vacuolaire, jusqu'à des concentrations voisines de 100 mM lorsque les plantes sont cultivées sur des milieux riches en azote (Miller et Smith, 1996). Il représente en général entre 1 et 6% de l'azote total chez la plupart des légumineuses (Smirnoff et Stewart, 1985), et jusqu'à près de 10% de la matière sèche de certaines plantes telle que *Xanthium* (Mac Kee, 1962). Par ailleurs, une accumulation vacuolaire de nitrate en tant qu'osmoticum peut aussi jouer un rôle non négligeable dans l'osmorégulation de la plante, en réaction à des déficits hydriques induits par la sécheresse ou par un stress salin (Tischner, 2000). Cependant, le nitrate est en général peu accumulé dans la plante car ce dernier est rapidement métabolisé par la nitrate réductase et finalement assimilé en acides aminés. La réduction du nitrate est essentiellement racinaire chez la luzerne, à la différence d'autres espèces telles que le concombre (*Cucumis sativa* L. ; Pate, 1980) où cette réduction est majoritairement aérienne, et semble être influencée par la concentration en nitrate du milieu de culture (Wallace, 1986). En effet, comme l'ont montré Zhang et Mac Kown (1993) sur des cellules de feuilles de tabac (*Nicotiana plumbaginifolia*), lorsque les plantes sont cultivées sur des milieux de concentrations croissantes en azote, la réduction du nitrate devient maximale du fait de la saturation enzymatique par le substrat des systèmes chargés de sa réduction, et la teneur en nitrate augmente alors dans les tissus (Tableau I.4). Cette accumulation transitoire induit en retour la synthèse de nitrate réductase (Zhang et Mac Kown, 1993 ; Figure I.16). Un mécanisme similaire est observé chez la luzerne, notamment au niveau des parties aériennes, où l'on observe une augmentation de la réduction du nitrate dans ces organes suite à l'augmentation de sa teneur intracellulaire (Pate, 1980 ; Andrews *et al.*, 1984 ; Tischner, 2000).

Des études portant sur la distribution sub-cellulaire des métabolites azotés ont montré que les acides aminés sont principalement localisés au niveau du cytoplasme et du stroma chloroplastique dans les tissus photosynthétiques, alors que cette localisation est principalement vacuolaire pour les tissus non photosynthétiques souterrains (Sakano et Tazawa, 1984 ; Riens *et al.*, 1991). Chez la luzerne, l'aspartate, et plus particulièrement l'asparagine, sont les deux acides aminés majeurs et peuvent ainsi représenter plus de 50% du total des acides aminés du pivot (Tableau I.5 ; Hendershot et Volenec, 1993b). Ce sont par ailleurs les deux métabolites majeurs impliqués dans le transport d'azote à longue distance

**Tableau I.5:** Evolution au cours de la repousse après la coupe du pourcentage moyen des différents acides aminés par rapport au total des acides aminés du pivot de luzerne nodulée (Hendershot et Volenec, 1993). LSD, Least Standard Deviation.

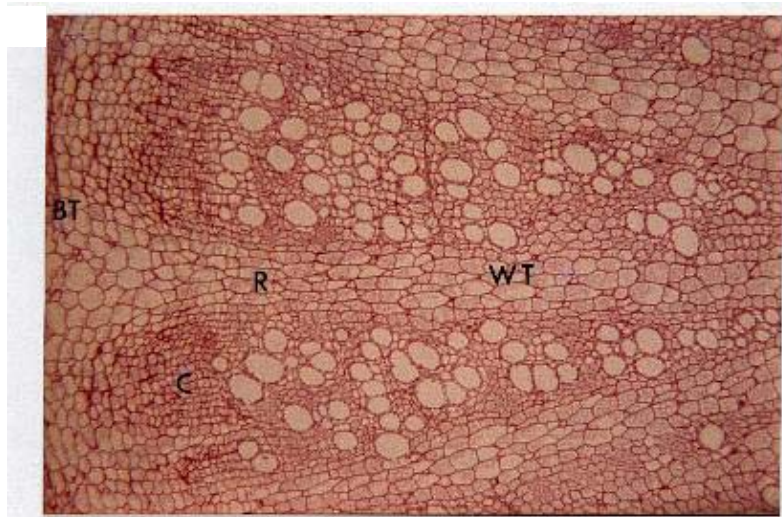
	Pourcentage du pool total d'acides aminés							LSD
	0	3	7	10	14	17	21	
<b>Alanine</b>	2.54	3.44	3.11	4.21	4.17	4.32	4.48	0.35
<b>Glycine</b>	0.48	0.66	0.75	0.89	0.82	0.85	0.61	0.09
<b>Valine</b>	5.78	9.67	8.00	8.46	10.21	10.31	6.51	2.05
<b>Thréonine</b>	1.30	1.74	2.49	2.72	2.43	2.19	2.15	0.55
<b>Sérine</b>	3.56	3.83	4.11	5.53	5.68	6.52	6.63	0.60
<b>Leucine</b>	0.11	1.65	0.86	0.86	1.02	0.33	0.90	0.13
<b>Iso-Leucine</b>	0.22	1.33	1.00	0.93	0.90	0.45	0.86	0.15
<b>GABA</b>	6.58	9.33	4.80	8.74	7.04	10.83	12.74	0.91
<b>Proline</b>	5.68	4.72	2.83	3.55	2.47	2.47	3.20	1.00
<b>Méthionine</b>	0.30	0.33	0.31	0.63	0.81	0.68	0.83	NS
<b>Aspartate + Asparagine</b>	<b>59.35</b>	<b>51.20</b>	<b>54.23</b>	<b>44.32</b>	<b>40.55</b>	<b>47.94</b>	<b>48.64</b>	<b>3.59</b>
<b>Phénylalanine</b>	0.49	0.78	0.95	1.22	1.46	1.03	0.85	0.23
<b>Glutamate + Glutamine</b>	4.84	1.58	7.70	8.21	13.98	7.72	4.59	1.18
<b>Lysine</b>	0.10	0.74	0.39	0.62	0.64	0.32	0.44	0.09
<b>Tyrosine</b>	0.27	0.76	0.77	1.18	0.94	0.27	0.23	0.10
<b>Arginine</b>	1.49	2.04	2.19	3.02	1.68	0.76	0.71	0.95
<b>Histidine</b>	2.34	3.16	2.82	2.38	1.19	0.90	1.19	0.53
<b>Cystéine</b>	0.05	0.04	0.04	0.08	0.04	0.09	0.04	NS
<b>Autres</b>	4.61	3.04	2.79	2.41	4.01	1.96	4.40	0.15



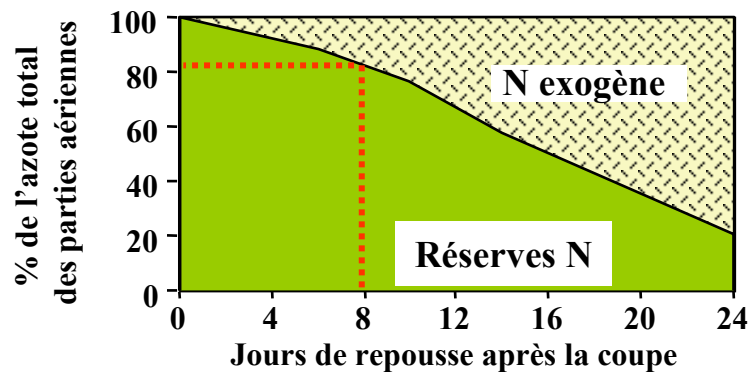
**Figure I.17:** Profil électrophorétique (SDS-PAGE) des protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) de 15, 19, 32 et 57 kda du pivot de luzerne au cours de la repousse après la coupe (Avice et *al.*, 1996b).

entre les différents organes de la plante (Pate, 1980). Des concentrations en asparagine de l'ordre de 273 mM sont mesurées dans des exsudats de sève phloémienne collectée après stylectomie de pucerons chez la luzerne, ce qui représente plus de 70 % de l'ensemble des acides aminés totaux (Girousse *et al.*, 1996). La prédominance de cet acide aminé semble être expliquée par le fait que ce dernier présente un rapport N/C des plus élevés (Mifflin et Lea, 1977).

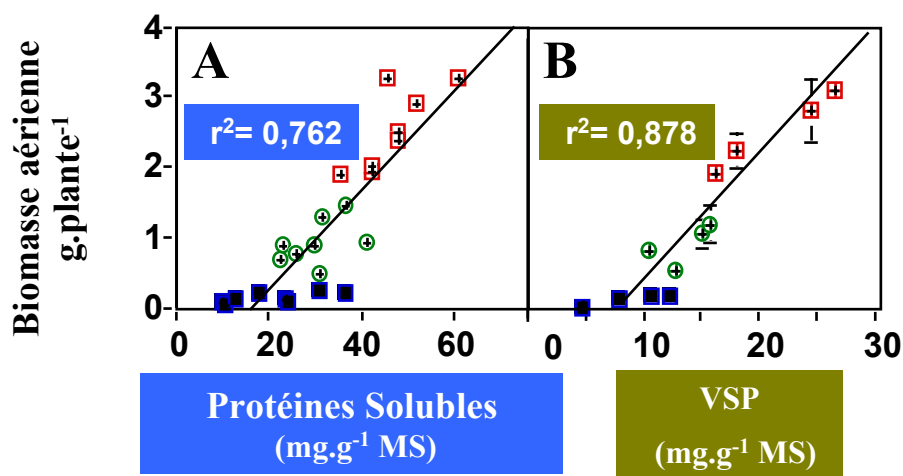
Les protéines solubles représentent un des pools azotés majeurs. De nombreux travaux ont montré leur importance quant à la fourniture d'azote lors de phases de croissance intense. Les plus fortes teneurs en protéines solubles sont tout d'abord retrouvées dans les tissus photosynthétiques aériens, où la RuBisCO peut représenter jusqu'à 80% de l'ensemble des protéines solubles et jusqu'à 70% de l'azote total foliaire (Huffaker, 1982). Le pivot est également un organe majeur de mise en réserve de protéines solubles, où ces dernières peuvent représenter plus de 20% de l'azote total, et plus de 50% de l'azote soluble total (Hendershot et Volenec, 1993b ; Barber *et al.*, 1996 ; Meuriot *et al.*, 2004). Parmi ces protéines, des travaux récents ont montré que quatre polypeptides particuliers de 15, 19, 32 et 57 kDa jouent un rôle important lors des phases de croissance intense (Figure I.17 ; Hendershot et Volenec, 1993a, b ; Gana *et al.*, 1998). Les polypeptides de 15, 19 et 32 kDa sont stockés dans le compartiment vacuolaire des cellules du parenchyme rayonnant du xylème ainsi que dans les tissus parenchymateux du phloème du pivot de la luzerne (Figure I.18 ; Avice *et al.*, 1996a). Ils sont soumis à des cycles très marqués d'accumulation (lors de la phase automno-hivernale ou bien lors de la fin de la repousse après une coupe) et d'hydrolyse (lors de la croissance au printemps ou après une coupe ; Hendershot et Volenec, 1993a, b ; Avice *et al.*, 1996a). Enfin, ils présentent des niveaux d'accumulation qui peuvent représenter, dans des conditions normales de culture, jusqu'à 40% du total des protéines solubles du pivot. De plus, ils présentent des taux de mobilisation très supérieurs à l'ensemble des protéines solubles : ces protéines sont ainsi mobilisées à plus de 80% pendant les 6 premiers jours de repousse après la coupe, contre 40% pour les protéines solubles totales. L'ensemble de ces caractéristiques, en accord avec la définition de Cyr et Bewley (1990) puis Staswick (1994), a alors permis de classer ces polypeptides particuliers parmi les protéines de réserve des organes végétatifs ou VSP (Vegetative Storage Protein).



**Figure I.18:** Immunolocalisation tissulaire des VSP du pivot de luzerne. **BT**, tissu du phloème; **C**, Cambium; **R**, cellules du parenchyme rayonnant du xylème; **WT**, tissu du xylème. La coloration brune révèle la présence des VSP. (Avicé *et al.*, 1996a)



**Figure I.19:** Contribution de l'azote des réserves et de l'azote exogène (fixation symbiotique et / ou absorption) à l'azote total des parties aériennes au cours de la repousse après la coupe chez la luzerne (Kim *et al.*, 1993). Les données sont exprimées en % de l'azote total des nouveaux organes aériens au jour de récolte.



**Figure I.20:** Corrélations entre la biomasse aérienne produite après 35 jours de repousse par 2 variétés de luzerne (Lodi et Europe) et les teneurs racinaires initiales en protéines solubles (A) et VSP (B) du pivot (D'après Avicé *et al.*, 1997b).

### **C.3.2 Contribution des réserves azotées lors de la repousse**

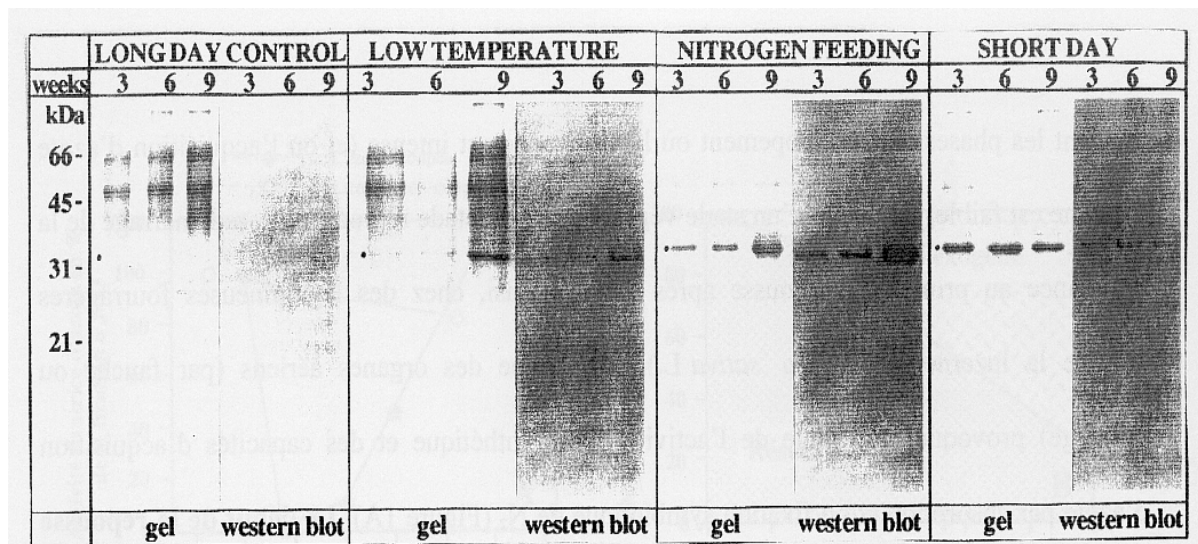
L'utilisation de l'isotope stable  $^{15}\text{N}$  a permis de montrer que 81% de l'azote total exporté vers les nouvelles feuilles et les nouvelles tiges de la luzerne provient des réserves azotées des organes pérennes, et notamment du pivot, après 8 jours de repousse (Avice *et al.*, 1996b ; Figure I.19). Cette contribution des réserves azotées est néanmoins variable selon l'espèce étudiée et peut représenter près de 57 % pour le ray-grass après 8 jours de repousse. Les pools d'acides aminés et de protéines solubles contribuent pour plus de 80% à cette fourniture d'azote aux parties aériennes en croissance au début de la repousse chez la luzerne (Kim *et al.*, 1993). D'autres travaux effectués chez cette espèce ont également montré que l'activité aminopeptidasique chute alors que l'activité endopeptidasique augmentait très significativement dans les parties racinaires pendant la première semaine après la coupe (Vance *et al.*, 1979 ; Groat et Vance, 1981), ce qui contribue à libérer de nombreux peptides et acides aminés mobilisables. Enfin, toujours chez la luzerne, de récents travaux ont montré le rôle crucial joué par les protéines solubles, et notamment par les VSP lors de la repousse après la coupe (Avice *et al.*, 1997b ; Justes *et al.*, 2002 ; Dhont *et al.*, 2003). Avice *et al.* (1997b) ont montré qu'il existait une corrélation significative entre la biomasse aérienne produite après 35 jours de repousse et les teneurs initiales en protéines solubles du pivot, et plus particulièrement en VSP (Figure I.20). Ces protéines de réserve des organes végétatifs, d'abord caractérisées chez les ligneux comme le peuplier (*Populus deltoïdes* ; Stépien *et al.*, 1994), ont été ensuite mises en évidence chez de nombreuses espèces herbacées telles que le soja (*Glycine max* L. Merr.), le pissenlit (*Taraxacum officinale* L.) et la luzerne (Tableau I.6). Leurs taux de dégradation bien supérieurs à l'ensemble des protéines solubles et leur abondance par rapport aux protéines solubles du pivot font qu'elles contribuent significativement à la fourniture d'azote sous forme d'acides aminés aux parties aériennes en repousse lorsque les besoins de la plante ne peuvent être satisfaits par les autres pools azotés de réserve. Les réserves azotées jouent donc un rôle déterminant lors de la repousse après la coupe et des traitements conduisant à diminuer leur accumulation, tels que des rythmes de coupe élevés ou des hauteurs de coupe basses, pénalisent la production de la culture (Lemaire et Allirand, 1993 ; Dhont *et al.*, 2003).

### **C.3.3 Facteurs inducteurs de l'accumulation des VSP**

Compte tenu du rôle crucial joué chez de nombreuses espèces par les réserves azotées, et notamment par les VSP, plusieurs études se sont attachées à déterminer les conditions

**Tableau I.6:** Masse moléculaire, localisation et fonctions des protéines de réserve des organes végétatifs chez les plantes herbacées. (PR protéine; Pathogenesis Related protein).

Espèces	Tissu de réserve	Masse Moléculaire (kD)	Fonctions	Références
<i>Glycine max</i> L. Merr.	Feuille	27, 29	Phosphatase acide	Wittenbach, 1983
<i>Glycine max</i> L. Merr.	Feuille	94	Lipoxygénase	Tranbarger <i>et al.</i> , 1991
<i>Taraxacum officinale</i> Weber	Racine	18	PR protéine	Cyr and Bewley, 1990a
<i>Medicago sativa</i> L.	Pivot	15, 19, 32	Chitinase Classe III (32 kD)	Meuriot <i>et al.</i> , 2004
<i>Medicago sativa</i> L.	Pivot	57	$\beta$ -amylase	Gana <i>et al.</i> , 1997
<i>Brassica napus</i> L.	Pivot	23	inconnue	Rossato <i>et al.</i> , 2002
<i>Euphorbia escula</i> L.	Racine	26	inconnue	Cyr et Bewley, 1990b



**Figure I.21:** Effet de la photopériode (Jour Long = 16 h ou Jour Court = 8 h à 22°C), de l'abaissement de la température (de 22 à 14°C) et du niveau de la nutrition azotée (4 mM de  $\text{NH}_4^+$ , 20 mM de  $\text{NO}_3^-$ ) sur le niveau d'accumulation de la protéine de réserve de 32 kDa du peuplier. Gel: Profils électrophorétiques des protéines solubles après SDS-PAGE et coloration au bleu de coomassie. Western blots: Immunodétection de la protéine de 32 kDa. Les standards de masse moléculaire sont indiqués sur le côté gauche du gel (Van Cleve et Apel, 1993).



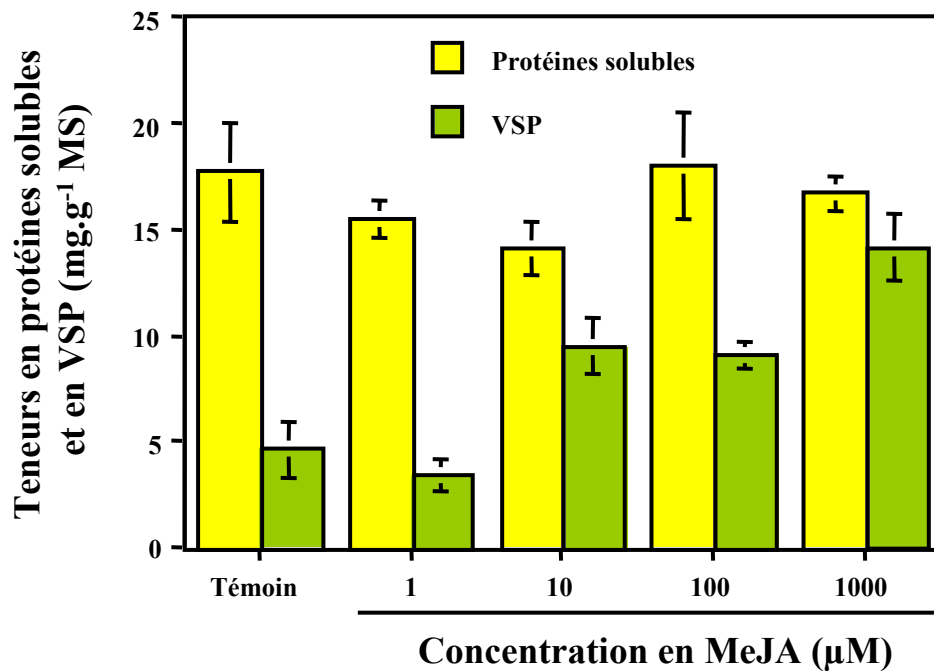
favorables à l'accumulation de ces protéines particulières. Il a par exemple été montré chez le peuplier (*Populus deltoides*), le soja (*Glycine max* L. Merr.) ou encore la luzerne, que des signaux environnementaux tels que les basses températures ou la photopériode (Van Cleve et Apel, 1993, Coleman *et al.*, 1993, Noquet *et al.*, 2001, 2003) étaient fortement impliqués dans la régulation de l'accumulation de VSP. Des luzernes cultivées en conditions de jour court (8 heures d'éclairement journalier) présentent une plus forte accumulation de VSP (plus de 70% pour la variété Europe) que des plantes cultivées en conditions de jour long (16 heures d'éclairement journalier), et ce dès 4 semaines de traitement (Noquet *et al.*, 2003). Une accumulation de VSP est aussi observée chez le soja lorsque les plantes sont cultivées sur des milieux riches en azote (Staswick *et al.*, 1991) et chez le peuplier si la fertilisation azotée est élevée ou lorsque la durée du jour ou la température sont réduites (Van Cleve et Apel, 1993 ; Fig I.21). Cependant une augmentation de la fertilisation azotée entre 1 et 5 mM de KNO<sub>3</sub> ne conduit pas à l'accumulation de VSP après 35 jours de repousse chez la luzerne (Noquet *et al.*, 2001). **Le niveau de nutrition azotée semble donc particulièrement impliqué dans la régulation de l'accumulation de réserves azotées sous la forme de VSP, mais son rôle n'a pas encore pu être totalement compris chez la luzerne et reste ainsi à préciser.**

L'ensemble de ces signaux environnementaux sont par la suite relayés au sein de la plante par des signaux endogènes comme l'auxine, l'acide abscissique, le méthyl-jasmonate, les gibbérellines, les sucres solubles ou encore les acides aminés (De Wald *et al.*, 1994 ; Staswick, 1994 ; Zhu et Coleman, 2001 ; Meuriot *et al.*, 2004) qui semblent agir plus directement sur l'expression des gènes des VSP. Par exemple, des luzernes cultivées pendant 7 jours en présence de 100µM de méthyl jasmonate apporté au niveau racinaire présentent des niveaux accrus d'accumulation des transcrits codant les VSP, et des teneurs en VSP augmentées de près de 50% par rapport à des luzernes non traitées (Figure I.22 ; Meuriot *et al.*, 2004).

## **D- Modélisation des flux carbonés et azotés chez les végétaux**

### **D.1- Intérêts et limites actuelles des modèles de distribution des ressources carbonées et azotées :**

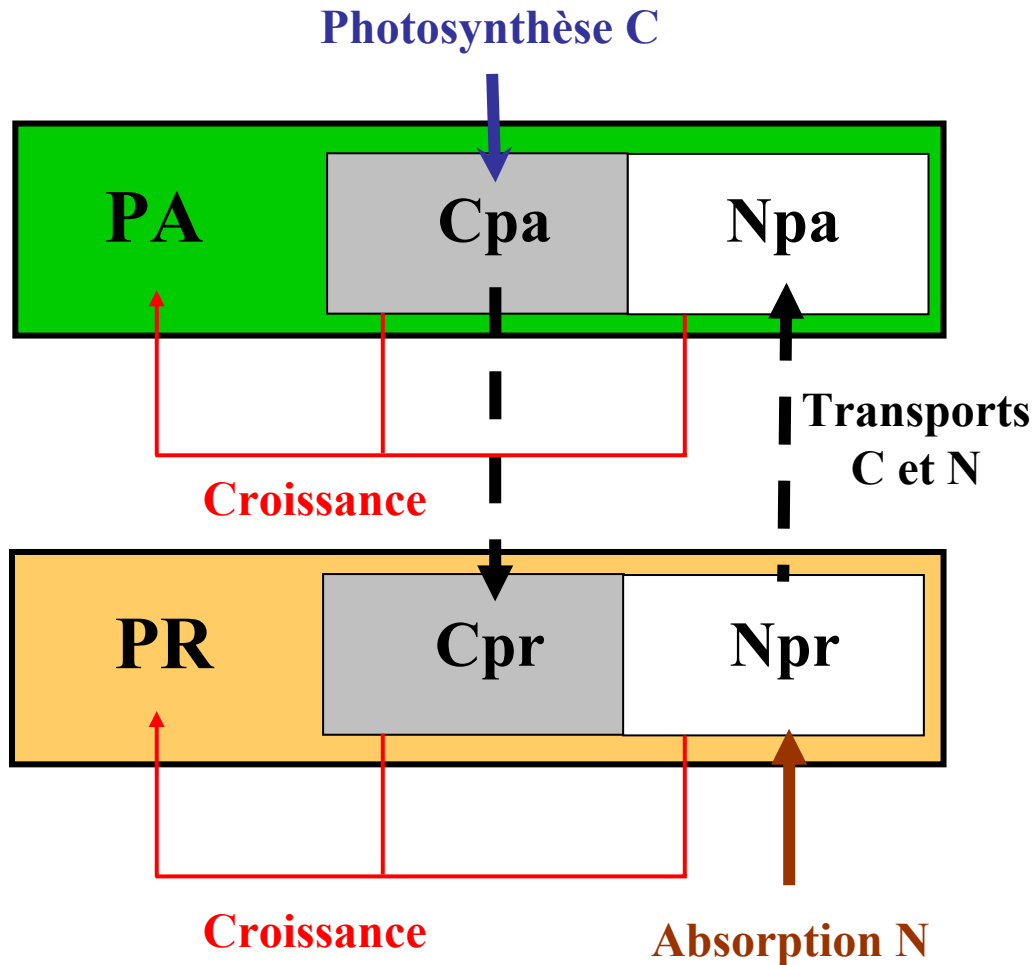
Au cours des parties précédentes, nous avons pu voir que l'optimisation de la gestion de la production de fourrage et la pérennité de la culture passe essentiellement par une meilleure connaissance des mécanismes régulant le stockage et l'utilisation des réserves, notamment azotées, lors de la repousse après la coupe. Cependant, ces mécanismes restent



**Figure I.22:** Teneurs en protéines solubles et en VSP du pivot de luzerne après 7 jours de traitement avec 0 (Témoin), 1, 10, 100 ou 1000 µM de méthyl-jasmonate (MeJA). Les barres verticales indiquent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  (Meuriot *et al.*, 2004)

encore imparfaitement compris et sont particulièrement difficiles à intégrer au niveau de la plante entière en raison de l'interaction entre différents niveaux d'organisation (cellule, organe, plante...), et de la multiplicité des organes sources et / ou puits, dont le statut est fortement modifié par la coupe et évolue au cours de la repousse. **La modélisation constitue alors un outil d'étude privilégié d'un tel phénomène car elle permet d'intégrer et de hiérarchiser les différents processus adaptatifs mis en œuvre par la plante.** De ce fait, un modèle permet de faire une analyse qualitative du problème à traiter, et permet de synthétiser les connaissances acquises sur le fonctionnement du végétal ainsi que d'en révéler les limites. Les modèles mathématiques, et en particulier les modèles dynamiques de culture, sont ainsi devenus des outils incontournables en agronomie et en physiologie, que ce soit pour la recherche fondamentale ou pour des développements plus appliqués.

Durant les deux dernières décennies, de nombreux modèles statistiques (descriptifs) de fonctionnement et de croissance ont été développés (Pate, 1980 ; Van Keulen et Seilman, 1987 ; Penning de Vries *et al.*, 1989 ; Hildbert et Reynolds, 1991). Ils ont ensuite évolué vers une démarche moins empirique et plus mécaniste basée sur une description plus détaillée des différentes fonctions physiologiques sous-jacentes (Le Roux *et al.*, 2001). C'est dans ce contexte que l'étude des processus élémentaires comme la photosynthèse, la respiration, ou encore la croissance foliaire, a fait des progrès significatifs. Cependant, il reste toujours à comprendre comment ces différents processus interagissent pour déterminer le comportement au niveau de la plante entière (Dewar, 1993). **Un élément central de cette compréhension réside dans la connaissance de la distribution des ressources entre les différents organes de la plante et sur le rôle de ces composés dans la régulation de la production de biomasse. Néanmoins, le manque de connaissances concernant les mécanismes régulant la distribution des ressources est une des principales limites du développement de modèles mécanistes de fonctionnement au niveau de la plante entière** (Landsberg *et al.*, 1991 ; Cannell et Dewar, 1993). En effet, la distribution des ressources résulte de nombreux processus (respiration, assimilation, absorption, transport...) qui agissent sur des échelles de temps différentes (allant de la seconde à la journée), et dont la connaissance reste encore parfois inégale et parcellaire (Marcelis, 1993).

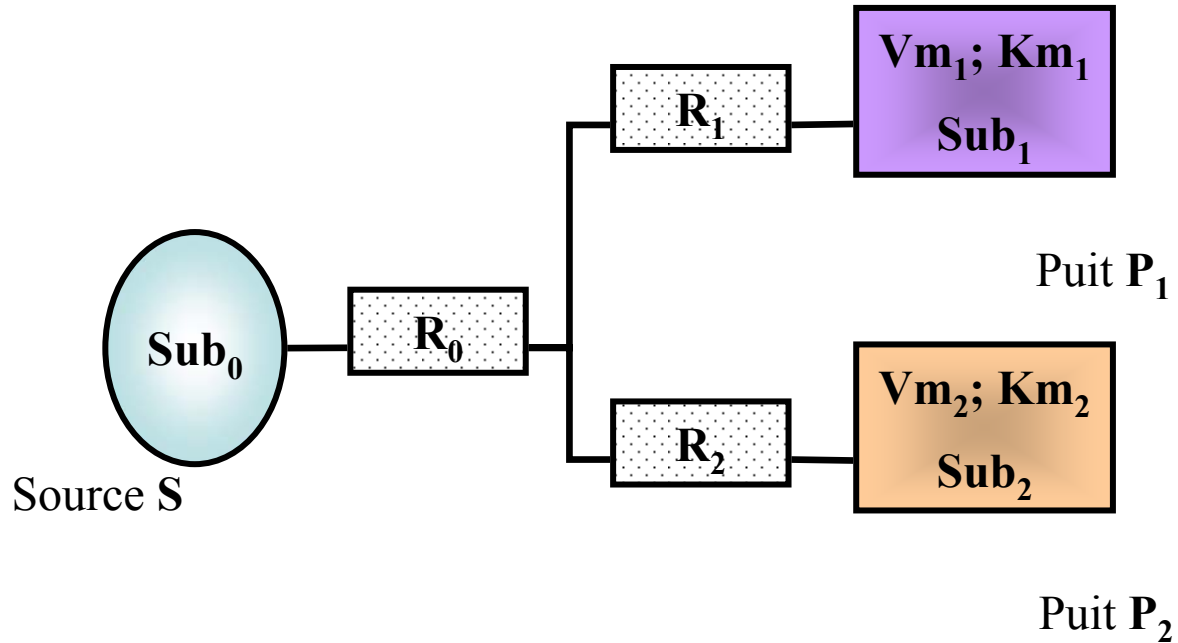


**Figure I.23:** Modèle conceptuel d'allocation entre parties aériennes et parties racinaires de Thornley (1972). La croissance des parties aériennes (PA) et des parties racinaires (PR) est proportionnelle au produit des concentrations locales en substrats carbonés (C) et azotés (N). Le transport de substrats carbonés des parties aériennes vers les parties racinaires est proportionnel au gradient de concentration en substrats carbonés ( $C_{pa} - C_{pr}$ ). Le transport de substrats azotés des parties racinaires vers les parties aériennes est proportionnel au gradient de concentration en substrats azotés ( $N_{pr} - N_{pa}$ ).

## **D.2- La modélisation de la distribution des ressources**

Du fait du rôle central de la distribution des ressources vis-à-vis de la production de biomasse, rôle par ailleurs démontré depuis longtemps dans la littérature (Brouwer, 1963), de nombreux modèles ont été développés afin d'améliorer les connaissances des mécanismes impliqués dans cette distribution au sein de la plante. Un des tous premiers modèles de distribution, proposé par Thornley en 1972, a ainsi impliqué les trois processus suivants : i) l'acquisition respective du carbone et de l'azote par les feuilles et les racines, ii) leur transport dans la plante, et iii) leur incorporation dans la structure de la plante. Cet auteur a proposé que le transport soit modélisé en fonction de gradients de concentration des substrats carbonés et d'azotés au travers de résistances entre les organes aériens et souterrains selon la théorie dérivée de Münch (1930), et que la croissance de chaque organe soit co-limitée par la concentration locale en substrats carbonés et azotés (Figure I.23). La croissance agit alors comme un puits local pour les substrats, vers lequel les autres substrats diffusent à partir de leurs sources (les feuilles pour le carbone et les racines pour l'azote). Ce modèle rend ainsi compte de l'augmentation de biomasse des parties aériennes en réponse à une diminution de ressources carbonées, ou une augmentation de la biomasse des racines en réponse à une diminution de la fourniture d'azote.

Cette approche de la distribution entre parties aériennes et souterraines a ensuite été développée et intégrée dans plusieurs modèles, notamment pour les écosystèmes forestiers (Rastetter *et al.*, 1991 ; Thornley et Cannell, 1992). Cependant, ces modèles sont basés sur le principe d'un équilibre fonctionnel entre parties aériennes et souterraines (Davidson, 1969) et bien qu'ils soient basés sur des données expérimentales (Fisher, 1978 ; Magnuson *et al.*, 1986) et théoriques (Münch, 1930), ils ont du mal à rendre fidèlement compte de la distribution de l'azote dans la plante. En effet, ce n'est pas par un mécanisme de diffusion que l'azote est exporté des racines vers les feuilles. Les deux voies principales du transport à longue distance de l'azote dans la plante font plutôt intervenir i) un flux de masse dans les vaisseaux du xylème entraîné par l'évapotranspiration, et ii) un transfert à partir du phloème vers les parties aériennes et les sites de croissance ou de stockage (Tischner, 2000 ; Ortiz-Lopez, 2000). **Ces deux mécanismes rendent donc difficile la modélisation de la distribution de l'azote dans la plante, c'est en partie pourquoi les modèles de distribution des assimilats azotés ont été peu développés**, comparativement à ceux concernant le carbone. Des efforts ont toutefois été réalisés au cours de ces dernières années



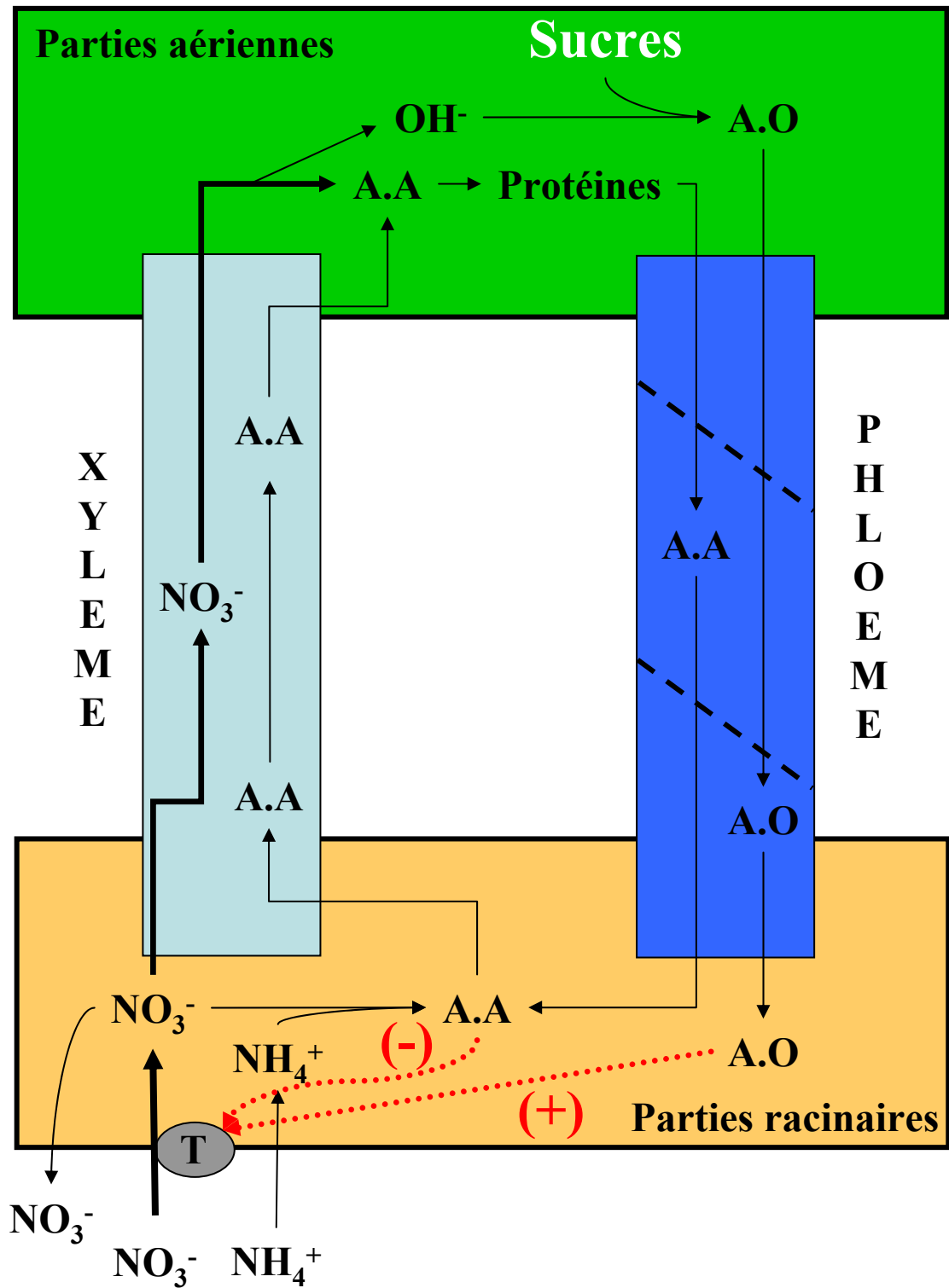
**Figure I.24:** Modèle conceptuel de répartition entre une source (S), et deux puits (P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>). Le transport entre la source et les puits dépend de la différence de concentration en substrat entre la source et chacun des puits (**Sub<sub>0</sub>-Sub<sub>1</sub>**; **Sub<sub>0</sub>-Sub<sub>2</sub>**), et des résistances rencontrées (**R<sub>0</sub>+R<sub>1</sub>** pour P<sub>1</sub>, et **R<sub>0</sub>+R<sub>2</sub>** pour P<sub>2</sub>). Les propriétés des puits dans la répartition sont décrites par deux paramètres, **V<sub>m</sub>** et **K<sub>m</sub>**, qui caractérisent une cinétique d'utilisation de type mickaelienne (d'après Minchin *et al.*, 1993).

pour développer des modèles mécanistes plus informatifs et performants que les modèles statistiques descriptifs tel que celui de Pate (1980) chez la luzerne. Cependant, ces modèles ont peu évolué à partir du modèle à deux compartiments (parties aériennes et parties souterraines) développé par Thornley (1972), et ne considèrent en général qu'une ou deux sources et un ou deux puits en fonctionnement (Johnson et Thornley, 1983 ; Mäkelä et Sievänen, 1987 ; Minchin *et al.*, 1993 ; Levy, 2000 ; Figure I.24). De même, la plupart des modèles de type « Thornley » ont été très rarement confrontés à des données précises en termes de compartiments physiologiques. **Le développement et la validation d'un modèle gérant la répartition et l'allocation de l'azote au cours de la repousse semble donc essentiel, même si ce développement ne permet qu'une approche théorique dans un premier temps (Dewar, 1993).** Un tel modèle permettrait alors de compléter, au niveau de la plante isolée en repousse, le cadre conceptuel général proposé par Lemaire et Millard (1999), concernant plus particulièrement l'étude de l'impact de la compétition entre plantes pour l'acquisition et la distribution des ressources.

Dans la littérature, le terme « répartition » est souvent confondu avec le terme « allocation » (Thornley, 1995). D'un point de vue physiologique, **la répartition** correspond à la compartimentation du carbone ou de l'azote entre **différentes formes biochimiques** (acides aminés, protéines, saccharose, amidon...) au sein d'un même organe. **L'allocation** correspond à la distribution des assimilats entre **différents organes** de la plante et recouvre des mécanismes aussi divers que le transport à plus ou moins longue distance, l'accumulation et l'utilisation des assimilats (Touraine *et al.*, 1994 ; Figure I.25).

## ***E- Conclusion et objectifs de la recherche***

L'analyse bibliographique met en évidence que **l'optimisation de l'équilibre fragile existant entre la production, la qualité et la pérennité de la culture, reste difficile à maîtriser chez la luzerne. Cette optimisation doit passer par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la distribution des ressources carbonées et azotées au niveau de la plante entière lors de la repousse après la coupe.** De nombreuses études ont permis de montrer que les réserves azotées du pivot, souvent plus limitantes que les réserves carbonées, sont déterminantes au début de la repousse après coupe pour la production et le maintien de la pérennité de la plante. **Cependant, les mécanismes**



**Figure I.25:** Représentation schématique de la répartition et de l'allocation de l'azote dans la plante. A.A, Acides Aminés;  $\text{NO}_3^-$ , Nitrate;  $\text{NH}_4^+$ , Ammonium; A.O, Acides Organiques; et régulation positive (+) ou négative (-) du transporteur (T) de nitrate (adapté de Touraine, 1994).



**favorisant la mobilisation et la ré-accumulation des réserves azotées sont encore mal connus chez la luzerne et restent à préciser.**

L'analyse bibliographique souligne par ailleurs que la luzerne est particulièrement sensible aux effets des deux paramètres agronomiques représentés par l'intensité et la fréquence de la coupe. **Cependant, les effets individuels et combinés de ces deux paramètres** sur la dynamique du carbone et de l'azote au sein du végétal, et leurs conséquences sur la production et la pérennité de la culture **sont encore imparfaitement compris**. Par exemple, alors que les effets potentiels de l'intensité de la coupe sur la vitesse de la repousse ont été particulièrement étudiés *via* la variation de la hauteur de la coupe, **aucune étude n'a encore vraiment démontré le rôle spécifique de la surface foliaire résiduelle sur le potentiel de repousse et sur la dynamique d'utilisation des réserves C et N ainsi que sur les capacités de prélèvement de l'azote après la coupe**. De même, alors que de nombreuses études ont montré le rôle de la fréquence de la coupe sur le potentiel de repousse de la luzerne, l'analyse bibliographique a permis de montrer que **la fréquence semble moduler à la fois le niveau des réserves organiques et la morphologie de la plante**, ce qui induit des difficultés d'interprétation des résultats obtenus.

Ces différentes observations nous ont alors conduit à définir les objectifs de recherche suivants :

1) **Etudier la mise en réserve d'azote**, notamment sous la forme de VSP, dans l'organe majeur de stockage représenté par le pivot, **en réponse à des niveaux d'alimentation azotée décroissants**. Cette première étude fait ainsi l'objet de l'article A du chapitre II « Résultats ».

2) **Déterminer et hiérarchiser le poids des variables modulées par la coupe (niveau des réserves C et N, hauteur de coupe et surface foliaire résiduelle) sur la production de la luzerne après 28 jours de repousse.**

3) **Déterminer et hiérarchiser l'importance du niveau des réserves C et N, de la hauteur de coupe et de la surface foliaire résiduelle sur la mobilisation et la ré-accumulation des réserves organiques des chaumes et du pivot au cours de la repousse.**

Ces deux derniers points font plus particulièrement l'objet des articles B et C du chapitre II « résultats ».

Par ailleurs, nous avons pu voir que la connaissance de la distribution des ressources C-N entre les différents organes de la plante ainsi que leur rôle dans la régulation de la production de biomasse était difficile à appréhender, ce qui a **limité le développement de modèles mécanistes d'allocation des assimilats dans la plante. A fortiori, peu de modèles se sont intéressés à décrire cette allocation dans le cadre particulier de la repousse après coupe, notamment en ce qui concerne l'azote. De même, le développement de modèles de répartition entre des fractions métaboliques est souvent resté centré sur l'allocation du carbone dans des organes sources foliaires ou dans des semences et a été assez peu étendu à la dynamique de l'azote.** Nous avons donc développé un modèle dynamique déterministe simulant la répartition et l'allocation de l'azote dans la plante afin de permettre l'intégration, la hiérarchisation et la quantification des différents mécanismes impliqués dans l'optimisation à plus ou moins long terme, de la production, de la qualité, et de la pérennité de la culture. Le développement et l'utilisation de ce modèle fait l'objet du chapitre III de la thèse.

Enfin, l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit sera repris dans un chapitre de discussion générale. Des perspectives de recherche seront ensuite dressées. L'ensemble des références bibliographiques utilisées dans les différents chapitres de ce manuscrit sera finalement présenté dans un dernier chapitre.

## **CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

### ***Introduction***

Les différentes recherches entreprises sur la luzerne dans le cadre de cette thèse ont visé à une meilleure compréhension de la distribution des ressources C et N ainsi que des mécanismes impliqués dans l'acquisition et la mobilisation et la mise en réserve de ces ressources, en particulier azotées, lors de la repousse après la coupe. Elles se sont appuyées sur trois expérimentations conduites à une même échelle d'approche et avec des techniques communes :

- **échelle de temps : la repousse**, exprimée en jours (repousse antérieure ou postérieure à un état initial) ;
- **échelle végétale : la plante entière** (isolée et non-nodulée) ;
- **conditions contrôlées fixées** : température, PAR, humidité relative, alimentation minérale et photopériode ;
- **techniques homogènes** : culture en serre puis en hydroponie, marquages isotopiques  $^{15}\text{N}$ , mesures en IRMS, fractionnement biochimique et quantification des composés de réserve C et N.

Ces travaux se rapportent à trois problématiques principales :

- **1/ L'importance et la place particulière des VSP dans les mécanismes de mobilisation / ré-accumulation des réserves organiques lors de la repousse selon le niveau d'alimentation N antérieur et la sévérité de la coupe (hauteur et surface foliaire résiduelle) ;**
- **2/ Les effets de l'état initial de la plante après coupe (niveau des réserves C-N initiales du pivot et des chaumes et surface foliaire résiduelle) sur i) la physiologie de la plante, ii) l'absorption de l'azote, iii) la dynamique du carbone et de l'azote et iv) le potentiel de repousse final ;**

- **3) La modélisation dynamique quantitative de la distribution de l'azote entre les différents organes et pools biochimiques azotés de la luzerne lors de la repousse après la coupe.**

Pour répondre aux différentes questions posées, nous avons alors conduit trois expérimentations visant à étudier les effets :

- 1) **du niveau de l'alimentation azotée antérieure à la coupe** sur les conditions de mise en réserve de composés C et N, notamment de VSP, dans les organes pérennes. Cette expérimentation fait l'objet de l'article A du chapitre II « Résultats »,
- 2) **d'une combinaison de statuts N initiaux et de surfaces foliaires résiduelles initiales contrastées** sur l'absorption d'azote et sur les contributions de l'azote exogène et endogène à la production de biomasse finale Cette expérimentation fait l'objet de l'article B du chapitre II « Résultats »,
- 3) **de statuts N initiaux, de hauteurs de coupe et de surfaces foliaires résiduelles initiales contrastées** sur le potentiel de croissance et sur la dynamique du carbone et de l'azote au cours de la repousse après la coupe. Cette expérimentation fait l'objet de l'article C du chapitre II « Résultats »,

Cette dernière expérimentation a fourni les données de base permettant le développement du modèle présenté dans le chapitre III.

***A- Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability.***

**L'accumulation de réserves azotées et de protéines de réserve des organes végétatifs (VSP) dans les pivots de luzerne (*Medicago sativa* L.) non-nodulée est affectée par le niveau de la disponibilité minérale en azote.**

**Authors:** Frédéric Meuriot<sup>(1)</sup>, Jean-Christophe Avice<sup>(1)</sup>, Marie-Laure Decau<sup>(1)</sup>, Jean-Claude Simon<sup>(1)</sup>, Philippe Lainé<sup>(1)</sup>, Jeffrey J Volenec<sup>(2)</sup>, Alain Ourry<sup>(1)</sup>.

*(1) UMR INRA / UCBN, Physiologie et Biochimie Végétales, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France.*

*(2) Department of Agronomy, Lilly Hall of Life Sciences, 915 W. State St., Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2054, USA*

*Correspondance to:* AVICE Jean-Christophe, UMR INRA / UCBN, Physiologie et Biochimie Végétales, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France, Phone : 33 (0) 2 31 56 56 53, Fax : 33 (0) 2 31 56 53 60. When calling from outside France, don't dial (0)

e-mail: [avice@ibba.unicaen.fr](mailto:avice@ibba.unicaen.fr)

Article publié dans *Plant Science* 2003, vol **165**, 709-718.

### **A.1- Abstract**

Our objective was to understand how mineral N availability alters accumulation of N reserves (nitrate, amino acids, soluble proteins and vegetative storage proteins known as VSP) in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv Lodi) taproots. The effects of variation in  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  availability were followed by studying non-nodulated plants grown under hydroponic conditions during 21 d with i) different N supplies which corresponded to N-replete plants (N100% = optimal N) and N-limited plants receiving only 50% (N50%) or 25% (N25%) of optimal N (Experiment I), or ii) decreasing concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1000, 250, 100 or 50  $\mu\text{M}$ , Experiment II). Regardless of the N-limitation mode (Experiments I or II), and compared to higher N treatments (N100 or 1000  $\mu\text{M}$ ), there was a significant reduction of total shoot dry matter per plant for lowest N treatments (N25 or 50  $\mu\text{M}$ ). This was accentuated by the degree of N deficiency in Experiment I only. In Experiment II, taproot biomass significantly increased for low N treatments. In both experiments, total N, nitrate and amino acid concentrations in taproots increased for high N treatments, while the concentration of soluble proteins, and particularly VSP, increased for low N treatments. These results indicated that non-nodulated alfalfa was able to accumulate N reserves (mainly as VSPs), even under N-limited conditions, while under high mineral N availability, taproot amino acid concentrations (mainly asparagine) increased without a corresponding increase in soluble protein concentration. These results show that alfalfa was capable of optimizing N cycling and storage as a function of mineral N availability. These adaptive responses to low soil N environments also allow alfalfa to go dormant and perenniate, while awaiting more favorable conditions for shoot growth.

*Authors key-words:* *Medicago sativa* L., N availability, N reserves, amino acids, nitrate, vegetative storage protein, roots

*Abbreviations:* HPLC: High Performance Liquid Chromatography; PVDF: polyvinylidene difluoride; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TCA: trichloroacetic acid; VSP: vegetative storage protein.

## **A.2- Résumé**

Notre objectif a consisté à comprendre comment la disponibilité en azote minéral altère l'accumulation des réserves azotées (nitrate, acides aminés, protéines solubles et protéines de réserve des organes végétatifs; VSP) dans le pivot de la luzerne (*Medicago sativa* L.). Les effets de la variation de la disponibilité en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ont été suivis sur des plantes non-nodulées cultivées en hydroponie pendant 21 jours avec i) une alimentation azotée optimale (N100%) ou réduite de 50% (N50%) et 75% (N25% ; Expérimentation I), ou avec ii) des concentrations décroissantes en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1000, 250, 100 et 50  $\mu\text{M}$  ; Expérimentation II). Quel que soit le mode de limitation en azote minéral (expérimentation I et II), et par comparaison avec les traitements en azote les plus forts (N100% ou 1000  $\mu\text{M}$ ), il y a une diminution significative de la matière sèche totale aérienne par plante pour les traitements les plus faibles en azote (N25% ou 50  $\mu\text{M}$ ). Cet effet est accentué par le degré de la déficience en azote dans l'expérimentation I seulement. Dans l'expérimentation II, la biomasse du pivot augmente significativement pour les traitements faibles en azote. Dans les deux expérimentations, les teneurs en azote total, en nitrate et en acides aminés du pivot augmentent pour les alimentations N les plus élevées, alors que les teneurs en protéines solubles, et particulièrement en VSP, augmentent pour les alimentations N les plus basses. Ces résultats indiquent que la luzerne non-nodulée est capable d'accumuler des réserves azotées (principalement sous la forme de VSP), même en conditions d'alimentations azotées faibles, alors que pour des disponibilités en azote fortes, les teneurs en acides aminés du pivot (principalement l'asparagine) augmentent sans accroissement correspondant des teneurs en protéines solubles. Ces résultats montrent que la luzerne est capable d'optimiser le recyclage de l'azote en fonction de la disponibilité en azote minéral. Ces réponses adaptatives induites par les faibles alimentations N permettent aussi à la luzerne de rester dormante et de maintenir une bonne pérennité en attendant des conditions pour une croissance aérienne plus favorables.

Mots-clés : *Medicago sativa* L. ; disponibilité en N ; réserves N ; acides aminés ; nitrate ; Protéines de réserve des organes végétatifs ; racines.

### **A.3- Introduction**

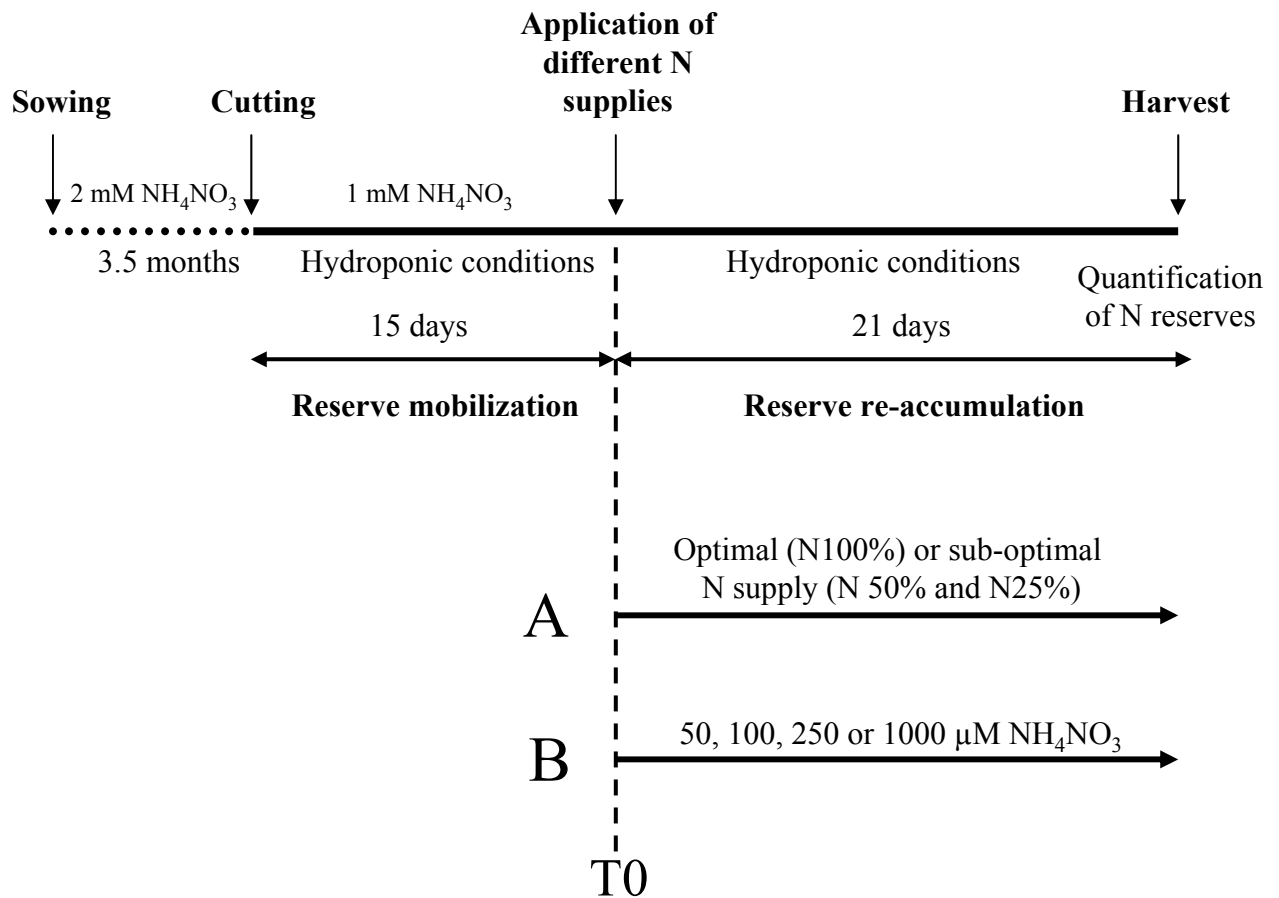
Over the last decade, many studies on woody and herbaceous species have shown a key role of N reserves during crucial phases of plant development such as initial spring growth, post-defoliation herbage regrowth, and grain filling (Millard, 1988, 1993; Chapin *et al.*, 1990; Stépien *et al.*, 1994; Ourry *et al.*, 2001). Although carbohydrates were the predominant storage compounds in terms of mass in underground storage organs, several results have shown that N reserve compounds (nitrate, amino acids, proteins) were more important than carbohydrate reserves in determining growth responses of herbaceous plants (Cyr *et al.*, 1990; Fouldrin and Limami, 1993; Heilmeyer and Monson, 1994; Volenec *et al.*, 1996) and water-soluble proteins represented the largest N fraction in taproots. Particular proteins were very abundant and were largely hydrolyzed during initiation of shoot growth in spring (Hendershot and Volenec, 1993a) or during shoot regrowth after cutting (Hendershot and Volenec, 1993b; Avice *et al.*, 1996a, b). In addition, these proteins re-accumulated rapidly and to high concentrations during autumn or at the end of shoot regrowth prior to alfalfa being cut for forage. Because of their abundance (about 40% of the total soluble protein) and their atypical patterns of extensive mobilization/accumulation (greater than the other soluble proteins), these proteins possess characteristics associated with vegetative storage protein (VSP), as previously described by Cyr and Bewley (1990) and Staswick (1994). Three VSPs with molecular masses of 15, 19 and 32 kDa have been identified in alfalfa taproots (Hendershot and Volence, 1993a). These VSPs were specifically stored in vacuoles of parenchyma cells of wood rays in alfalfa taproots (Avice *et al.*, 1996b). In addition, Gana *et al.* (1998) have recently characterised another VSP of 57 kDa, which possess high amino acid sequence homology to  $\beta$ -amylase.

Chapin *et al.* (1990) divided the storage process into i) reserve formation, which was in competition for nutrients with growth and ii) reserve accumulation, which occurred when resource supply exceeded demand (without competition with growth). Moreover, it is now well established that N acquisition by uptake or symbiotic N<sub>2</sub> fixation, N partitioning within the plant and N reserve accumulation can vary as a function of resource availability. Several studies, mostly in poplar (*Populus deltoides*) and soybean (*Glycine max* L. Merr.), suggested that environmental factors (photoperiod, light intensity, temperature) and endogenous molecular signals (soluble sugars, jasmonic acid) that modified N source/sink relationships within the plant also regulated the N reserve accumulation, particularly as VSPs (Staswick, 1990, 1994; Coleman *et al.*, 1991; Langheinrich and Tischner, 1991; Mason *et al.*, 1992; Van



Cleve and Apel, 1993). Soil or nutrient solution N availability and tissue N status also affected VSP accumulation. In soybean leaves (Staswick *et al.*, 1991) and poplar bark (Van Cleve and Apel, 1993), VSP transcript accumulation increased in parallel with N supply. Removal of pods also modified the N partitioning between source and sink tissues during reproductive development of soybean and induced VSP gene expression in leaves (Stephenson *et al.*, 1998). However, Staswick (1994) suggested that the available mineral N level may have an indirect effect on VSP gene induction of soybean leaves. Nevertheless, it appeared that VSP accumulation did not always increase with enhanced high mineral N supply. For example, altering N nutrition had no significant effect on VSP accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.; Améziane *et al.*, 1997). Similarly, increasing the N concentration in nutrient solution from 1 to 5 mM KNO<sub>3</sub> increased shoot growth in alfalfa, but did not change N partitioning in the different organs or alter taproot VSP concentrations (Noquet *et al.*, 2001). Moreover, Kalengamaliro *et al.* (1997) have shown that high N fertilization (10 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) increased total plant growth, but did not influence root protein concentrations or the onset of VSP accumulation in young alfalfa seedlings. Ourry *et al.* (1994) also reported that decreased mineral N supply to alfalfa (from 1 to 0.2 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) over 15 d decreased shoot growth rates and the amount of total N in taproots. However, these authors did not investigate the impact of N deficiency on the partitioning of N reserves among taproot N pools.

Because alfalfa is a widely grown perennial legume adapted to low N environments, and because the role of the mineral N level on the accumulation of N-storage compounds has not been extensively evaluated in alfalfa, our objectives were to study the effects of different levels of mineral N availability on the accumulation and partitioning of N reserves (amino acids, total soluble proteins and VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa. Our results indicate that alfalfa is able to accumulate N reserves (particularly VSPs) in taproots even if the mineral N nutrition is low.



**Figure II.A.1.** Cultural conditions and experimental protocol used to provide different N concentrations to hydroponically grown alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi). **A**: Experiment I: Optimal (N100%) or sub-optimal (N50% or N25%)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  feeding; **B**: Experiment II: Plants were provided with decreasing  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentrations (1000, 250, 100 or  $50 \mu\text{M}$ ) beginning 15 d after cutting and continuing for 21 d.

**Figure II.A.1.** Conditions de culture et protocole expérimental utilisés pour la fourniture de deux concentrations différentes en azote à des luzernes (*Medicago sativa* L., cv Lodi) cultivées en hydroponie. **A**: Expérimentation I: Fourniture en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  optimale (N100%) ou sous-optimale (N50% ou N25%); **B**: Expérimentation II: Les plantes ont été alimentées avec des concentrations décroissantes en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1000, 250, 100 ou  $50 \mu\text{M}$ ) 15 jours après la coupe et pendant 21 jours de repousse.

## **A.4- Materials and Methods**

### **A.4.1 Plant Material**

Experiment I was initiated in January 1999 and alfalfa (*Medicago sativa* L. cv Lodi) seeds were germinated on sand. For Experiment II, alfalfa seeds (cv Lodi) were sown on a synthetic substrate (Oasis pinpot growing medium, Agrimedia, France) in March 2000. After 15 d, when the primary trifoliolate leaves appeared, seedlings were transplanted to plastic pots filled with sand (four plants per pot). Each pot was irrigated three times per week with 300 mL of a nutrient solution containing 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM Fe-Na EDTA, and 14 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 µM MnSO<sub>4</sub>, 3 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.7 µM CuSO<sub>4</sub>, 0.7 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>, and 0.1 µM CoCl<sub>2</sub> (Kim *et al.*, 1991). Nitrogen was added to the nutrient solution (1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) to repress nodule formation. Plants were grown under greenhouse conditions with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night) and a photoperiod of 16 h (day) and 8 h (night). After 3.5 months, plants were defoliated 6 cm above crown level, crowns and roots removed from pots, and transferred to 8 L plastic containers containing a continuously aerated nutrient solution. During the initial 15 d after transfer, this nutrient solution containing 1 mM of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, was renewed every 3 d to avoid N deficiency. In addition, 25 mL of 1 mM CaCO<sub>3</sub> were added to maintain pH value close to 6.5.

Because previous results (Kim *et al.*, 1993; Hendershot and Volenec, 1993b; Avice *et al.*, 1996b) have shown that the depletion of N storage occurs during the first two weeks following shoot removal, the N-limiting treatments (see Experiments I and II described below) were applied after 15 d of shoot regrowth (Day 0), when the re-accumulation of proteins begins. During the experiments, light was supplemented with high-pressure sodium lamps (400 W phytoclaude) supplying approximately 400 µmoles of photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 15 cm above crown level.

### **A.4.2 Experiment I: Application of optimal and sub-optimal N feeding**

This experiment started on the 15<sup>th</sup> day of regrowth after defoliation and continued for 21 d (Fig. II.A.1). At Day 0 (first day of treatments), one-third of the plants received 1 mM of

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  in the nutrient solution and the depletion of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in the nutrient solution was measured daily in order to determine the daily N uptake.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  disappearance was determined from 1 mL of nutrient solution by high performance anionic (Ionpac AS9 analytical column) and cationic (Ionpac CS12 analytical column) chromatography (HPLC, DX100, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), respectively. Based on these results,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was directly added to the nutrient solution to compensate for daily N uptake by the plants (control plants corresponding to treatment **N100%**). The remaining plants were divided into two groups that received either 50% (treatment **N50%**) or 25% (treatment **N25%**) of the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  taken up daily by the control plants (N100%). During the 21 d of treatments, the nutrient solution without N (see the composition above) was renewed every 3 d.

#### **A.4.3 Experiment II: Application of decreasing concentrations of $\text{NH}_4\text{NO}_3$**

In this study, plants were grown during 21 d in nutrient solution containing four different concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (**1000, 250, 100 or 50  $\mu\text{M}$** ), renewed every three days (Fig. II.A.1). Moreover, in order to study the partitioning of N derived from uptake within the plant as a function of the reduction of mineral N availability, the N ( $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ ) was labelled with 2.5 atom %  $^{15}\text{N}$  excess.

#### **A.4.4 Tissue sampling**

In both experiments, plants were harvested at the end of the 21 d treatment period and were separated into lateral roots, taproots, leaves and stems. Taproot samples were immediately frozen in liquid  $\text{N}_2$ . After freeze drying, taproot samples were ground into a fine powder and kept at  $-80^\circ\text{C}$  for further N fraction analysis. Lateral roots and shoot tissues were dried at  $70^\circ\text{C}$  for 72 h. The dry weight of each sample was determined.

#### **A.4.5 Analysis of N, nitrate, amino acids, soluble proteins and VSP concentrations in taproots**

N concentrations in taproots were measured in continuous flow using a C/N analyzer linked to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa Scientific Ltd., Crewe, UK).

Extraction of nitrate, amino acids and soluble proteins was adapted from Barber et al. (1996) and Cunningham and Volenec (1998). Proteins were extracted at 4°C by suspending 300 mg of ground freeze-dried taproot tissue in 5 ml of extraction buffer (pH 7) containing 100 mM sodium-phosphate and 10 µM β-mercaptoethanol. After centrifugation (3200 x g, 4°C for 20 min), the pellet was re-extracted in 5 ml of extraction buffer, and after a second centrifugation, the supernatants were pooled. An aliquot of the resulting supernatants was used to determine nitrate and soluble protein concentrations. Nitrate concentration of the root extract was determined by the sulfanilamide method after reduction of nitrate to nitrite using a continuous-flow autoanalyzer (Bran + Luebbe, Noderstedt, Germany). Soluble protein concentrations were quantified by protein dye-binding (Bradford, 1976) and VSP quantification by the ELISA method as previously described by Noquet et al. (2001). One milliliter of protein extract was precipitated using the sodium deoxycholate-trichloroacetic acid protocol described by Peterson (1983). After centrifugation (10 000 x g, 4°C for 10 min), the supernatant was used for amino acid analysis as described below. The resulting pellet was air-dried and resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), resuspended in Laemmli lysis buffer (1970) and boiled for 5 min to denature proteins. SDS-PAGE was performed using a 150 g. L<sup>-1</sup> acrylamide separation gel. Separated proteins were blotted onto PVDF membrane for western blotting analysis using the anti-32, -19 and -15 kDa VSP antibodies (Bradford, 1976; Kalengamaliro *et al.*, 1997).

Amino acids were analyzed using HPLC on a Beckman Gold 8.0 system (Beckman, Roissy, France). The remaining supernatant obtained after protein precipitation was freeze-dried, resuspended in 1 mL of water and then filtered on 0.45 µm membrane. After dilution (1/5000), the extract was derivatized for 2 min with 50 mM o-phthalaldehyde and separated on a C18 Bio-Rad column (150 x 4.5 mm). The amino acids were detected by using a Shimadzu R-F 551 fluorimeter. The internal standard was α-amino butyric acid (2.5 mM). The separation was performed using a gradient of pure methanol in Na-acetate buffer (50 mM, pH 5.9).

#### **A.4.6 Calculation of N partitioning in plants**

N content (Experiments I and II) and <sup>15</sup>N abundance (Experiment II) in all organs were measured in continuous flow using a C/N analyzer linked to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa Scientific, Crewe,

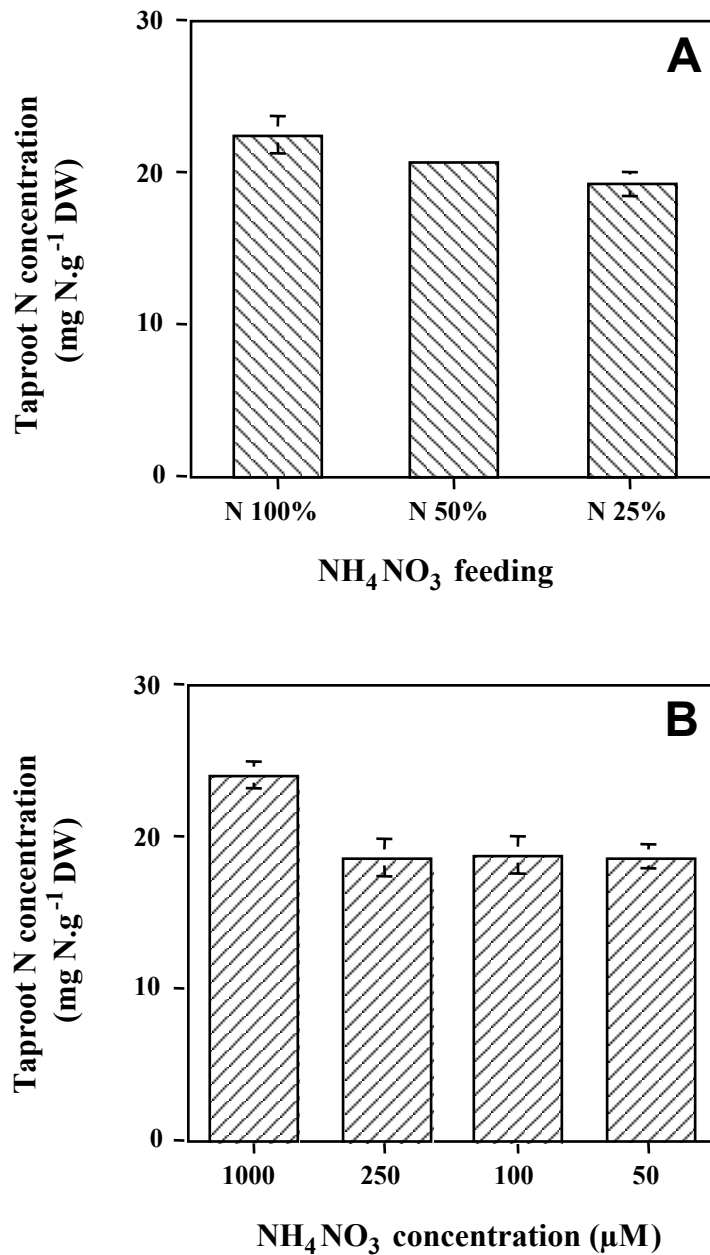
## **A.5- Results**

### **A.5.1 Total biomass and shoot root ratio**

In Experiment I, total biomass was significantly reduced by sub-optimal  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  supply. Compared to plants provided with optimal N (N100%), total dry matter was 44% (N50%) and 50% (N25%) less after 21 d of treatment (Fig. II.A.2A). In Experiment II (Fig. II.A.2B), irrespective of the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration used, the total biomass was not significantly modified and averaged 13 g.plant<sup>-1</sup> after 21 d. Total biomass at Day 0 in Experiment II was also higher than in Experiment I because of different greenhouse plant culture conditions (for details, see Materials and Methods). Therefore, the biomass partitioning between shoots and roots was significantly altered by the level of N deficiency (Fig. II.A.2, numerals above bars). The more N availability decreased in the nutrient solution, the greater the decline in shoot/root ratio. For example, in Experiment I, the shoot/root ratio reached 3.06 for N100% treatment, while this ratio markedly decreased for plants provided a sub-optimal N feeding (1.92 for N25%). N limitation had different effects on taproot biomass in both experiments. In Experiment II, taproot biomass was significantly increased as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration in nutrient solution decreased from 1 mM to 250 or 100  $\mu\text{M}$  (Fig. II.A.2B), while in Experiment I, taproot biomass was not affected by  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration of the nutrient solution (Fig. II.A.2A).

### **A.5.2 Total N concentrations in taproot**

In Experiment I, the taproot N concentration gradually decreased with the reduction of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  availability (Fig. II.A.3A). For example, when N supply was reduced by 75% (N25%) during 21 d, the taproot N concentration declined by 16% in comparison with control (N100%) plants (Fig. II.A.3A). In Experiment II, a reduction of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration in the nutrient solution from 1000 to 250  $\mu\text{M}$  (Fig. II.A.3B) also severely decreased the taproot N concentration after 21 d of treatment. Taproot N concentrations of plants grown with 50 to 250  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentrations were similar (Fig. II.A.3B).



**Figure II.A.3.** Taproot N concentration of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi) after 21 d growth at different N concentrations. **A:** Experiment I, and **B:** Experiment II. Details about Experiments I and II are provided in Figure 1. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$ .

**Figure II.A.3.** Concentration en azote du pivot de luzerne (*Medicago sativa* L., cv Lodi) après 21 jours de repousse sur différentes concentrations en azote. **A:** Expérimentation I, et **B:** Expérimentation II. Les détails concernant ces deux expérimentations sont donnés pour la figure II.A.1. Les barres verticales représentent  $\pm$  S.E de la moyenne pour  $n = 4$ .

UK). Natural  $^{15}\text{N}$  abundance ( $0.3663\% \pm 0.0004$ ) of atmospheric  $\text{N}_2$  was used as a reference for  $^{15}\text{N}$  analysis.

In Experiment II, nitrogen derived from current N uptake ( $N_{\text{Up}}$ ) between Day 0 and Day 21 in a given organ was calculated as follows:

$$N_{\text{Up}} = N_{\text{T}} \times (E (\%) / E_{\text{S}} (\%))$$

where  $N_{\text{T}}$  is the total nitrogen in the organ ( $\text{mg}\cdot\text{plant}^{-1}$ ),

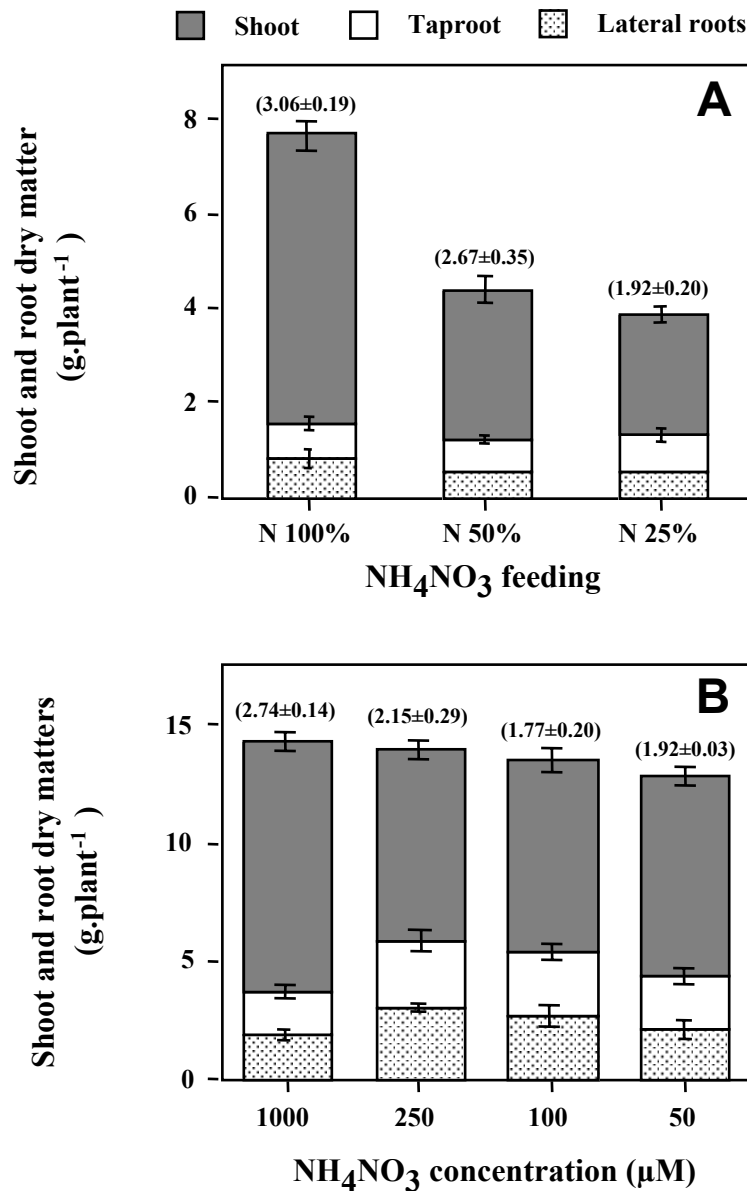
$E (\%)$  is the atom %  $^{15}\text{N}$  excess in a given organ

and  $E_{\text{S}}$  is the nutrient solution atom %  $^{15}\text{N}$  excess (2.5%)

#### **A.4.7 Statistical analysis**

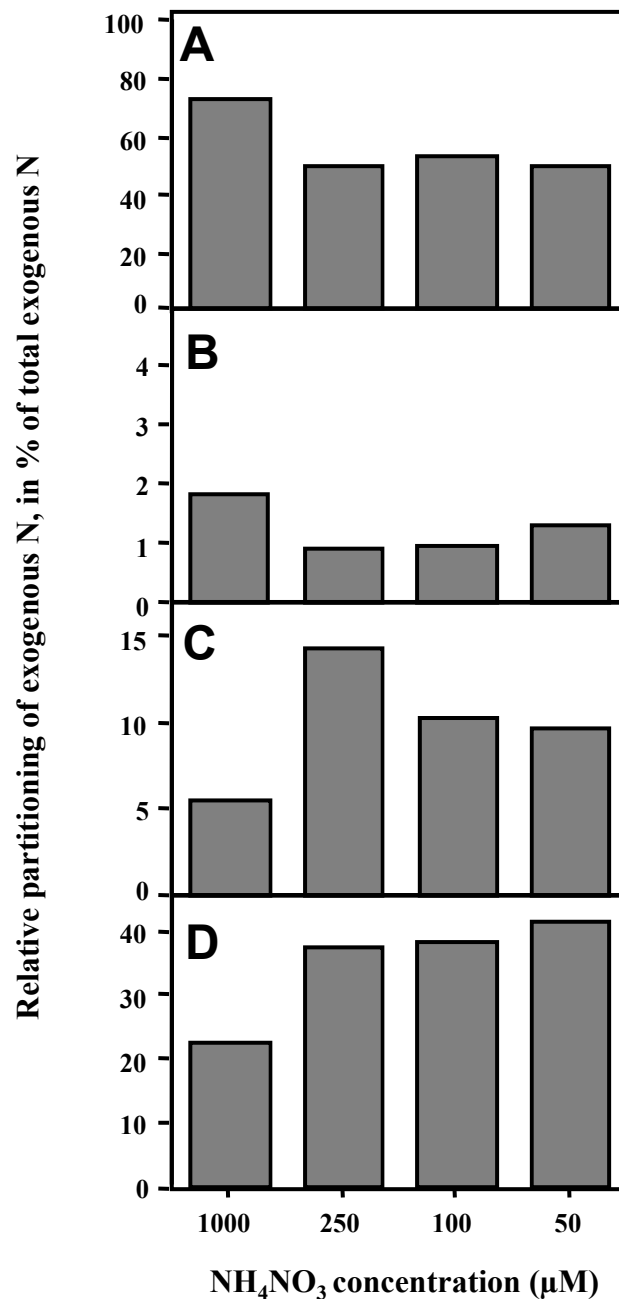
The experiments were replicated four times (each replicate containing three or four plants). Results represented the mean  $\pm$  S.E. for  $n=4$ . The effects of the N supply were tested using  $t$ -tests (Statview Student Software, Abacus Concepts, Berkeley, USA).





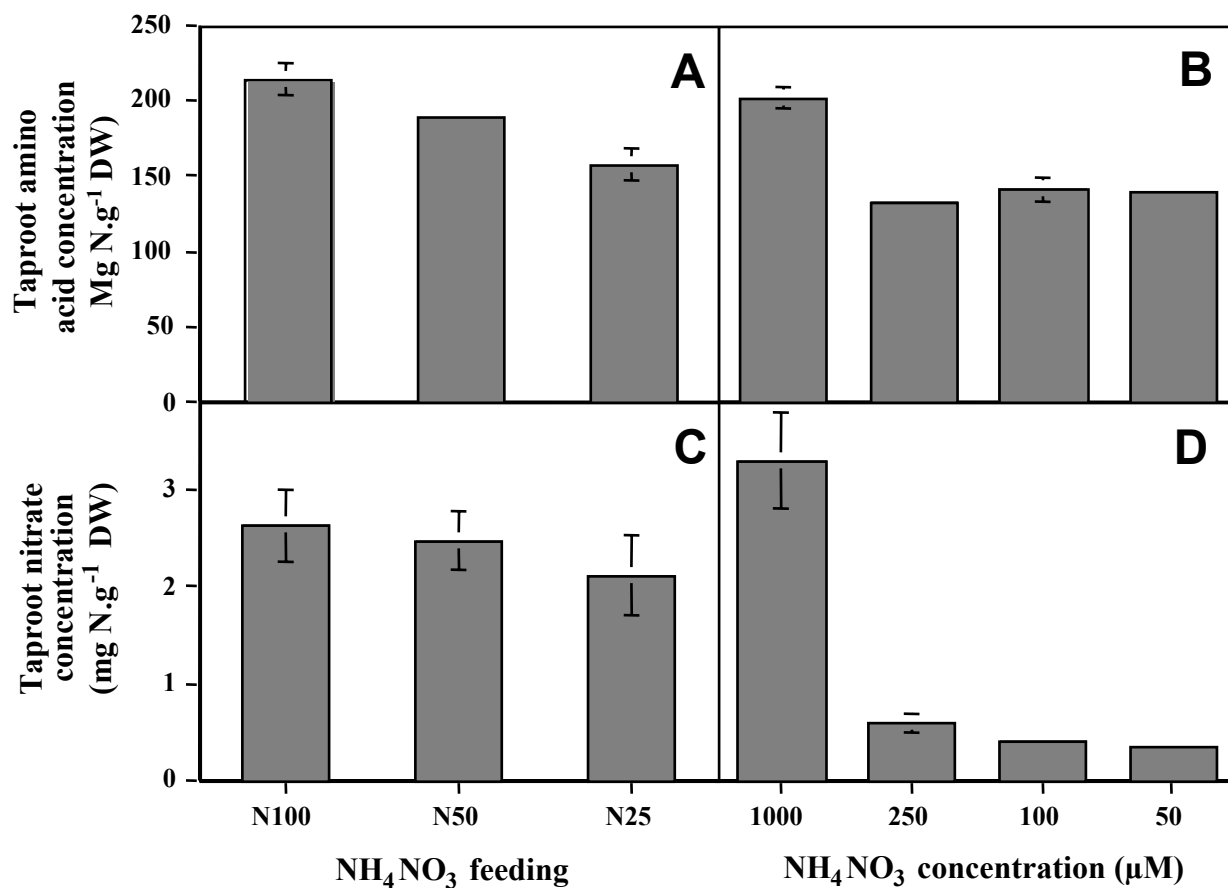
**Figure II.A.2.** Shoot, taproot and lateral root dry matter of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi) after 21 d growth at different N concentrations. **A:** Experiment I, and **B:** Experiment II. Details about Experiments I and II are provided in Figure 1. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$ . Numbers in parentheses are the mean  $\pm$  S.E. of the shoot to root dry matter ratio.

**Figure II.A.2.** Matière sèche des parties aériennes, du pivot et des racines latérales de luzerne (*Medicago sativa* L., cv Lodi) après 21 jours de repousse sur différentes concentrations en azote. **A:** Expérimentation I, et **B:** Expérimentation II. Les détails concernant ces deux expérimentations sont donnés pour la figure II.A.1. Les barres verticales représentent  $\pm$  S.E de la moyenne pour  $n = 4$ . Les nombres entre parenthèses représentent la moyenne  $\pm$  S.E du rapport des parties aériennes sur les parties racinaires.



**Figure II.A.4.** Relative partitioning of N derived from the N uptake (as % of total N uptake) in different organs of alfalfa provided decreasing NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> concentrations (Experiment II: 1000, 250, 100 and 50 μM). **A:** Regrowing shoots; **B:** Remaining shoots; **C:** Taproots and **D:** Lateral roots. Vertical bars indicate ± S.E. of the mean for  $n = 4$ .

**Figure II.A.4.** Répartition relative de l'azote dérivé de l'absorption (en % de l'azote total absorbé) dans les différents organes de luzernes alimentées avec des concentrations décroissantes en azote (expérimentation II: 1000, 250, 100 et 50 μM). **A:** Parties aériennes en repousse, **B:** Chaumes, **C:** Pivot et **D:** Racines latérales. Les barres verticales représentent ± S.E. de la moyenne pour  $n = 4$ .



**Figure II.A.5.** Concentrations of amino acids (**A, B**) and nitrate (**C, D**) in taproots of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi) after 21 d growth at different N concentrations. **A, C**: Experiment I, and **B, D**: Experiment II. Details of Experiments I and II are provided in Figure 1. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 4$ .

**Figure II.A.5.** Concentrations en acides aminés (**A, B**) et en nitrate (**C, D**) dans le pivot de la luzerne (*Medicago sativa* L., cv Lodi) après 21 jours de repousse sur des concentrations décroissantes en azote. **A, C**: Expérimentation I, et **B, D**: Expérimentation II. Les détails concernant ces deux expérimentations sont donnés pour la figure II.A.1. Les barres verticales représentent  $\pm$  S.E de la moyenne pour  $n = 4$ .

### **A.5.3 Exogenous N partitioning within the plant**

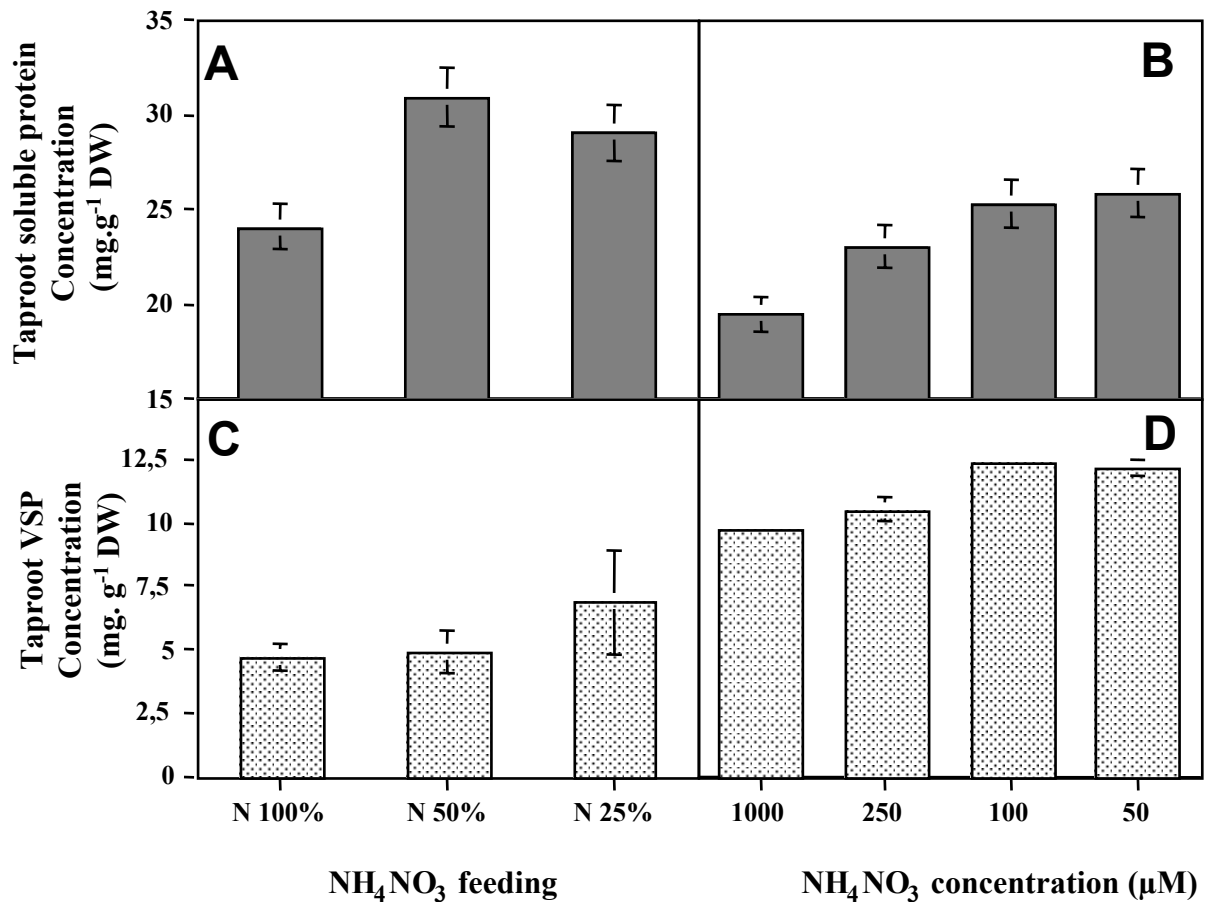
The utilization of  $^{15}\text{N}$  labelling methods during Experiment II showed that the relative partitioning of exogenous N derived from the nutrient solution was significantly altered by changes in  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration of the nutrient solution (Fig. II.A.4). The N taken up after 21 d was primarily found in regrowing shoots (up to 75% for 1000  $\mu\text{M}$  plants, Fig. II.A.4A) whereas the reduction in nutrient solution N supply decreased the allocation of exogenous N to shoots. Consequently, the reduction of N fertilization resulted in preferential N allocation to roots (taproots and lateral roots) at the expense of regrowing shoots. For example, when compared to plants provided with 1000  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Fig. II.A.4C), the allocation of exogenous N to taproots was doubled and reached approximately 10% of the total exogenous N for treatments supplied 50 to 250  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in the nutrient solution.

### **A.5.4 Amino acid and nitrate concentrations in taproots**

In both experiments, the extent of N deficiency strongly affected the concentration of amino acids in taproots (Fig. II.A.5A and 5B). Compared to control plants (N100% or 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), the concentration in amino acids decreased by 29% after 21 d for plants provided low N (N25% or 250  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Fig. II.A.5A and 5B). Asparagine was the most abundant amino acid and represented between 55 and 65% of the total amino acid pool in taproot irrespective of treatment (data not shown). Taproot nitrate concentration was also altered by N concentration of the nutrient solution (Fig. II.A.5C and 5D). Compared to control plants, reducing  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration of the nutrient solution from N100% to N25% (Fig. II.A.5C) resulted in a slight decline in taproot nitrate concentration. In Experiment II (Fig. II.A.5D) the taproot nitrate concentration was strongly reduced by decreasing mineral N from 1000  $\mu\text{M}$  (3.39 mg N.g<sup>-1</sup>DW) to 250  $\mu\text{M}$  (0.61 mg N.g<sup>-1</sup>DW) of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

### **A.5.5 Soluble protein and VSP concentrations in taproots**

In comparison with total N, nitrate, and amino acid concentrations, the taproot protein concentration responded differently depending on the extent of N deprivation. For both experiments, the lowest soluble protein concentration was observed in taproots of control plants (Fig. II.A.6A and 6B). The concentrations of soluble proteins increased with increasing

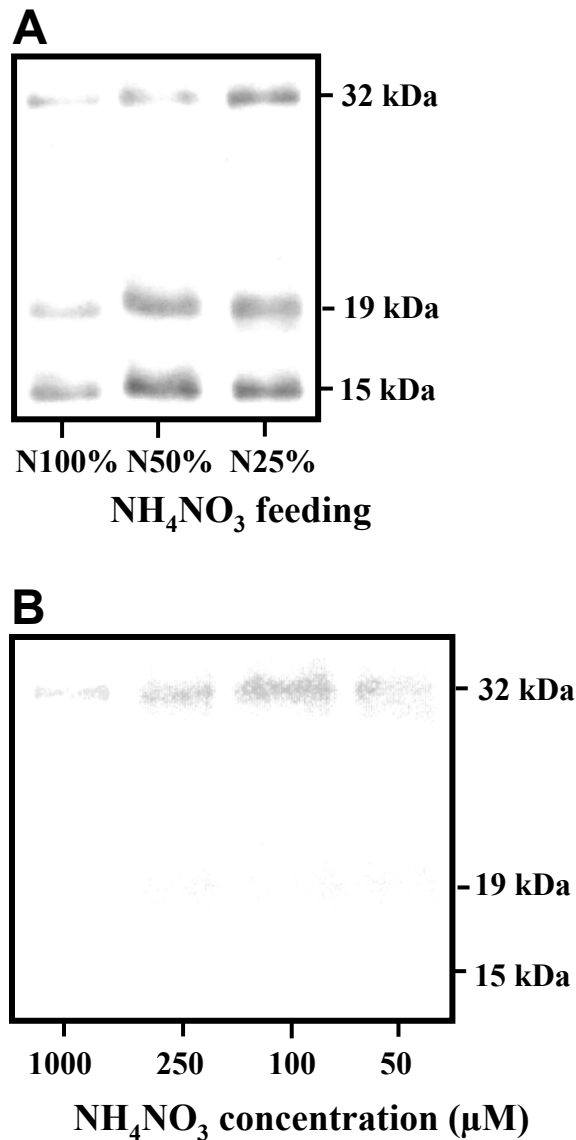


**Figure II.A.6.** Concentrations of total soluble protein (A, B) and vegetative storage protein (VSP, C, D) in taproots of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi) after 21 d growth at different N concentrations. A, C: Experiment I, and B, D: Experiment II. Details of Experiments I and II are provided in Figure 1. Vertical bars indicate ± S.E. of the mean for  $n = 4$ .

**Figure II.A.6.** Concentrations en protéines solubles totales (A, B) et en protéines de réserve de organes végétatifs (VSP; C,D) dans les pivots de luzerne (*Medicago sativa* L., cv Lodi) après 21 jours de repousse sur des concentrations décroissantes en azote. A, C: Expérimentation I, B: Expérimentation II. Les détails concernant ces deux expérimentations sont donnés pour la figure II.A.1. Les barres verticales représentent ± S.E de la moyenne pour  $n = 4$ .

N deprivation. The highest soluble protein concentrations were observed in taproots of plants grown at N50% and N25% (Experiment I, Fig. II.A.6A) or when the nutrient solution only contained 50  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Experiment II, Fig. II.A.6B).

The effect of a restricted N supply on the pattern of VSP accumulation in taproots (Fig. II.A.6C and 6D) was similar to that described for total soluble proteins (Fig. II.A.6A and 6B). Compared to alfalfa grown with nutrient solution containing 1mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , the reduction of mineral N availability to 100 or 50  $\mu\text{M}$  of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  increased the soluble protein concentration by 22% (Fig. II.A.6B) and the VSP concentration by 36% (Fig. II.A.6D). These trends were confirmed using western blot analysis of VSPs (Fig. II.A.7A and 7B). For both experiments, western blots showed that as N deprivation increased, that VSP increased markedly. In addition, accumulation of 32 kD VSP was more extensive than the other VSPs as the intensity of N deprivation increased (Fig. II.A.7).



**Figure II.A.7.** Western blotting analysis of VSP (32, 19 and 15 kilodaltons) accumulation in taproots of alfalfa (*Medicago sativa* L., cv Lodi) after 21 d growth at different N concentrations. **A:** Experiment I, and **B:** Experiment II. Details of Experiments I and II are provided in Figure 1. Equal protein mass (30  $\mu\text{g}$ ) was loaded per lane. Values of molecular weight are indicated in kilodalton on the right side of the PVDF membrane.

**Figure II.A.7.** Analyse par Western blotting de l'accumulation des VSP (de 32, 19 et 15 kilodaltons) dans les pivots de la luzerne (*Medicago sativa* L., cv Lodi) après 21 jours de repousse sur des concentrations en azote décroissantes. **A:** Expérimentation I, **B:** Expérimentation II. Les détails concernant ces deux expérimentations sont donnés dans la figure II.A.1. Une masse égale de protéines (30  $\mu\text{g}$ ) a été déposée par piste. Les valeurs de masse moléculaire sont indiquées en kilodalton sur le côté droit de chaque membrane PVDF.

## **A.6- Discussion**

In both experiments, there was a significant reduction of shoot dry matter per plant and this was accentuated by the degree of N deficiency in the nutrient solution for the Experiment I only. This effect of N deprivation in reducing shoot biomass agrees with results obtained with field-grown alfalfa (Kunelius, 1974; Bélanger and Richards, 2000) and alfalfa grown under controlled conditions (Fishbeck and Philips, 1981; Cherney and Duxbury, 1994; Ourry *et al.*, 1994). In Experiment II, the total dry matter was not significantly affected by the 250 or 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  treatments when compared to the plants receiving 1000  $\mu\text{M}$  of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Fig. II.A.2B). These data suggest that the level of mineral N in nutrient solution containing 250 or 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was not completely taken up by the plants between two renewals of nutrient solution (which occurred every three days in the Experiment II). This also indicates that, in our conditions of culture, the application of 250 or 100  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  is not limitant for mineral N and does not result in a reduction of total growth. Moreover, in Experiment II our results showed that N deficiency reduced shoot/root dry weight ratio, and this effect was primarily due to an increase in root mass (taproot and lateral roots, Fig. II.A.2B). This increase of root growth suggests that the plant is able to increase its capacity of N exploration when the availability of mineral N decreases. This change in biomass partitioning in favor of roots under N stress also agrees with previous results observed in alfalfa (Fishbeck and Philips, 1981; MacDowall, 1983; Kalengamaliro *et al.*, 1997), other legumes such as white clover (*Trifolium repens* L.; Davidson, 1969) or soybean (Rufty *et al.*, 1984), in chicory (*Cichorium intybus* L.; Améziane *et al.*, 1997), and in perennial grasses (Bélanger *et al.*, 1992).

Results using  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  labelling gave us the opportunity to study the effect of N availability on the partitioning of N among different organs of alfalfa. These results showed that the relative partitioning of N to taproots increased at the expense of shoot tissues when N fertilization was reduced. Thus, N availability modified the partitioning of biomass and N, and led to changes in N partitioning within alfalfa taproots. However, total N, nitrate, and amino acid concentrations in taproots decreased as N concentration of the nutrient solution declined. Similar trends in taproot N concentration in response to N application have been reported previously by Trimble *et al.* (1987) and Bélanger and Richards (2000). As previously reported by Girousse *et al.* (1996) and Dhont *et al.* (2003), asparagine represented the most abundant amino acid in taproots (up to 65% of the total amino acid pool) in both experiments



(data not shown). This data confirmed that asparagine is an important form of stored N in alfalfa taproots. In contrast, we showed that the soluble protein concentrations in taproots (including VSP) increased with incremental increases in N deficiency. These results indicated that non-nodulated alfalfa was able to accumulate N reserves (mainly as VSPs) even when N concentration of nutrient solution was reduced. Similar results were obtained by Li et al. (1996) who reported that N fertilizer did not change protein N concentration of alfalfa whereas root total N concentration increased. In the taproot of oilseed rape (*Brassica napus* L.), Rossato et al. (2002) recently showed that increasing the supply of N from 1 to 50 mM KNO<sub>3</sub> in the nutrient solution did not increase the accumulation of a putative 23 kD VSP. In chicory (*Cichorium intybus* L.), Améziane et al. (1997) reported that VSP accumulation was unaffected by the increase of N supply. During chicory senescence, the remobilization of previously absorbed N from the shoot to the tuberized root greatly increased in N-limited plants, whereas it increased only slightly in N-sufficient plants (Améziane *et al.*, 1997). As a consequence, these authors reported the accumulation of the N reserves (mainly as VSP and arginine) also occurred in N-limited plants. The present study contradicts results obtained in soybean (Staswick *et al.*, 1991; Staswick, 1989) and poplar (Van Cleve and Apel, 1993) where accumulation of VSP polypeptide and transcript significantly increased with improved N availability. For example, Staswick (1989) has showed that soybean leaf VSP and VSP mRNA levels correlated with the amount of N provided for non-nodulated plants. Under N deficiency, steady-state transcript levels for soybean leaf VSP was nearly undetectable whereas, at near toxic concentrations of N, soybean VSP transcript levels were greater than in N<sub>2</sub> fixing control plants (Staswick, 1990). These different responses to high N fertilization could be explained by the specific tissue localization of VSP, which are stored in the leaf of soybean (representing a strong sink for N) versus the taproot of alfalfa (representing a low sink for N). However, because there was less need to mobilize N from leaves to pods of soybean when mineral N was plentiful, Staswick (1994) suggested that the effect of N availability during plant growth was related to altered source/sink relationships for N, rather than having a direct regulatory role. In alfalfa, our results suggested that VSP accumulation in taproots was not directly regulated by availability of N, but controlled indirectly *via* the changes of N partitioning and demand between source and sink organs.

Regardless of the mineral N limitation method used, both of our experiments showed that N deficiency led to increase taproot soluble protein (particularly VSP) concentrations. However, this positive effect of low N availability on VSP concentrations could be concomitant with an increase of taproot biomass (Experiment II) or not (Experiment I).

Previous field experiments (Avice *et al.*, 1997; Justes *et al.*, 2002) also reported that root dry matter and concentrations of soluble proteins and VSP in roots may fluctuate together. For example, Justes *et al.* (2002) have shown that N fertilization (100 kg per ha) at sowing did not improve root mass, total N, soluble protein, or VSP concentrations of roots when compared with alfalfa grown without mineral N supply, and that this resulted in similar shoot growth rates the following spring. However, under hydroponic conditions, our previous studies (Noquet *et al.*, 2001; Avice *et al.*, 2001) showed that the increase of taproot dry matter did not parallel increases in taproot soluble protein or VSP concentrations. These studies showed that the increase in N concentration of the hydroponic solution from 1 to 5 mM KNO<sub>3</sub> (Noquet *et al.*, 2001) or 1 to 20 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Avice *et al.*, 2001) during 21 d strongly increased the total dry matter production (and root biomass) of four-month-old alfalfa plants, but did not significantly affect N partitioning between shoots and roots, and had no influence on root VSP concentration. Our results also showed that non-nodulated alfalfa was capable of adjusting its N storage as a function of the level of mineral N availability. With high mineral N availability, alfalfa could increase N reserves by increasing the amino acid and nitrate concentrations without changing in the concentration of soluble protein pools. In the case of N deficiency, alfalfa could increase the size of N reserves in taproots by increasing soluble protein (including VSP) concentrations and/or the size of this storage organ. As previously suggested by Millard (1988), N storage as protein in N-deficient plants may have several advantages for plants. For example, the storage of N in the form of protein in vacuoles of taproot cells avoids the potential osmotic problems that accompany the accumulation of N as nitrate. This makes it possible to sequester N for extended periods without major consequences for cellular metabolism.

In conclusion, increasing exogenous N concentrations did not increase N reserve accumulation as VSP in alfalfa taproots. Protein N storage appeared to be controlled by the source/sink status and by the N demand of roots. Overall these results agree with the hypothesis of Chapin *et al.* (1990) who suggested that, from an ecological point of view, optimized N cycling and storage within a plant were required in species adapted to low N environments. Moreover, because it was reported that alfalfa regrowth in spring or after defoliation was linearly correlated with taproot soluble protein concentrations (Volenc *et al.*, 1996; Justes *et al.*, 2002), this adaptive response to low soil N environments also makes it possible for alfalfa to go dormant and perenniate, while awaiting more favorable conditions before resuming growth.

## ***Acknowledgments***

The authors would like to thank Ms. Marie-Paule Henry for her invaluable help in sample acquisition, IRMS and nitrate analysis, and Patrick Beauclair for his contribution to N reserve extraction and analysis. The authors also thank Dr. P. Rottili (Lodi, Italy) and Dr. G. Lemaire for supplying the seeds of *Medicago sativa* L. cv Lodi. This work was supported by a grant for F. Meuriot from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) and the Conseil Régional de Basse Normandie.

***B- Influence of the initial organic N reserves and residual leaf area on growth, N uptake, N partitioning and N storage in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during post-cutting regrowth.***

**Influence des réserves organiques initiales et de la surface foliaire résiduelle sur la croissance, l'absorption, la répartition et la mise en réserve de l'azote chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) lors de la repousse après la coupe.**

**Authors:** MEURIOT F, AVICE J-C, SIMON J-C, LAINE P, DECAU M-L, OURRY A.

**Address:**

*UMR INRA / UCBN, Physiologie et Biochimie Végétales, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France.*

*To whom correspondance should be addressed:* AVICE Jean-Christophe, UMR INRA / UCBN, Physiologie et Biochimie Végétales, Institut de Recherche en Biologie Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France, Phone : 00 33 2 31 56 56 53, Fax : 00 33 2 31 56 53 60, email : [avice@ibba.unicaen.fr](mailto:avice@ibba.unicaen.fr)

Article accepté pour publication dans *Annals of Botany* (sous presse)

## **B.1- Abstract**

- The influence of initial residual leaf area and initial N reserves on N uptake, final N distribution, and yield in alfalfa regrowing after cutting, were studied.
- The effects of two levels of initial residual leaf area (plants cut to 15 cm, with (L+) or without (L-) their leaves) and two initial N status (high N; HN or low N; LN) on growth, N uptake, and N partitioning, allocation and storage after 29 d of post-cutting regrowth were analysed.
- During most of the regrowth period (8-29d after the initial harvest), HN and L+ plants had higher net N uptake rates than LN and L- plants, respectively, resulting in a greater final mineral N uptake for these treatments. However, the final allocation of exogenous N into the regrowing shoots was the same for all treatments (67% of total exogenous N on average). Final shoot growth, total plant N content, and N partitioning to the different taproot N pools were significantly lower in plants with reduced initial leaf area and initial N reserve status.
- Although both initial residual leaf area and initial N reserves influenced alfalfa regrowth, the residual leaf area had a greater effect on final forage production and N composition in taproot, whereas the N uptake rate and final total N content in plant were more affected by the initial N reserve status than by the residual leaf area. Moreover, N storage as proteins (especially as vegetative storage proteins, rather than nitrate or amino acids) in the taproot allowed nitrate uptake to occur at significant rates. This suggests that protein storage is not only a means of sequestering N in a tissue for further mobilization, utilization for growth or tissue maintenance, but may also indirectly influence both N acquisition and reduction capacities.

*Key-words:* ***Medicago sativa* L., defoliation, leaf area, regrowth, N uptake, N reserves, VSP.**

*Abbreviations:* LA, leaf area; PAR, photosynthetic active radiation; TCA, trichloroacetic acid; VSP, vegetative storage protein.

## **B.2- Résumé**

- Nous avons étudié l'influence de la surface foliaire résiduelle et des réserves N initiales sur l'absorption de l'azote et sur la distribution de l'N et la productivité finales de la luzerne.
- Les effets de deux surfaces foliaires résiduelles initiales (plantes coupées à 15 cm avec (L+) ou sans (L-) leurs feuilles résiduelles) et deux statuts N initiaux (high N; HN ou low N; LN) ont été étudiés sur la croissance, l'absorption de l'N, et sur la répartition, l'allocation et la mise en réserve de l'N après 29 jours de repousse après coupe.
- Durant la majeure partie de la repousse (entre 8 et 29 jours après la coupe), les plantes HN ou L+ présentent les plus grandes vitesses d'absorption nettes de l'N, par comparaison respective avec les plantes LN et L-. Ceci entraîne des quantités d'N absorbé finales plus fortes. Cependant, la productivité et l'allocation de l'N finales restent inchangées pour tous les traitements (avec en moyenne 67% de l'azote total exogène des parties aériennes en croissance). La croissance aérienne finale, le contenu en N total et la répartition de l'N entre les différentes fractions N du pivot sont significativement diminuées par la réduction de la surface foliaire résiduelle et par le niveau des réserves azotées initiales.
- Bien que la surface foliaire résiduelle et le niveau des réserves azotées initiales modulent la repousse de la luzerne, la surface foliaire est plus déterminante pour la production finale de fourrage et la composition en azote du pivot, alors que l'absorption de l'azote et le contenu final en azote dans la plante sont plus significativement affectés par le niveau des réserves azotées initiales. De plus, la mise en réserve d'azote sous la forme de protéines (en particulier de VSP) dans le pivot (plutôt que du nitrate ou des acides aminés) permet une absorption de nitrate à des vitesses significatives. Ceci suggère que la mise en réserve d'azote sous la forme de protéines n'est pas seulement un moyen de séquestrer de l'azote dans un tissu pour une mobilisation, une utilisation pour la croissance ou une maintenance des tissus ultérieure, mais peut aussi moduler indirectement à la fois l'acquisition et les capacités de réduction de l'azote.

*Mots-clés:* *Medicago sativa* L.; defoliation surface foliaire ; repousse ; absorption ; réserves N ; VSP.

### **B.3- Introduction**

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial forage legume, commonly subjected to repeated cycles of defoliation and regrowth that are agronomically characterized by cutting frequency (determined by the regrowth period between two successive harvests) and cutting intensity (determined by the cutting height). At the whole plant level, each of these parameters affects C and N organic reserve levels in the remaining organs (roots and crown), and alters both plant morphogenesis and residual leaf area during regrowth (Richards, 1993; Lemaire, 2001). However, although cutting frequency has long been recognized as a critical factor for long-term alfalfa management (Hodgkinson, 1969; Constable *et al.*, 1977; Gramshaw *et al.*, 1993), several studies have shown that the short-term effects of defoliation are also of great importance for yield and management of perenniality. These immediate effects depend mainly on the cutting intensity which, through the more or less severe removal of leaf and stem tissues, results in a loss of meristematic tissue, a reduction of whole plant photosynthesis, and a transient reduction of phloem and xylem fluxes through the respective decrease of phloem loading activity and evapotranspiration (Richards, 1993). Cutting also induces a transient decrease in N uptake until carbon supply to the roots is restored through new leaf area expansion and increased photosynthetic capacity (Lemaire and Millard, 1999). Symbiotic N<sub>2</sub> fixation (Vance and Heichel, 1981; Kim *et al.*, 1993), as well as ammonium and nitrate uptake (Ourry *et al.*, 1994), are thus severely reduced during early regrowth after defoliation. For example, Vance and Heichel (1981) reported that the addition of 40 or 80 kg.ha<sup>-1</sup> nitrate fertilizer immediately after defoliation had no effect on the rate of shoot regrowth in alfalfa plants. Rapid recovery from defoliation, therefore, requires the mobilization of endogenous C and N reserves in perennial organs such as roots and crowns (Hodgkinson, 1969). Moreover, it is now well established that, in alfalfa, endogenous N pools are largely used to support regrowth (Ourry *et al.*, 1994; Avice *et al.*, 1996b; Barber *et al.*, 1996), whereas endogenous C pools are mainly used to support the respiration of the remaining plant organs (Ta *et al.*, 1990; Avice *et al.*, 1996b). For example, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labelling studies have shown that 80 % of N, but only 6 % of C, in growing shoots of defoliated alfalfa had been mobilized from root and crown reserves 8 days after cutting, whereas about 40 % of initial C had been used for root respiration (Avice *et al.*, 1996b).

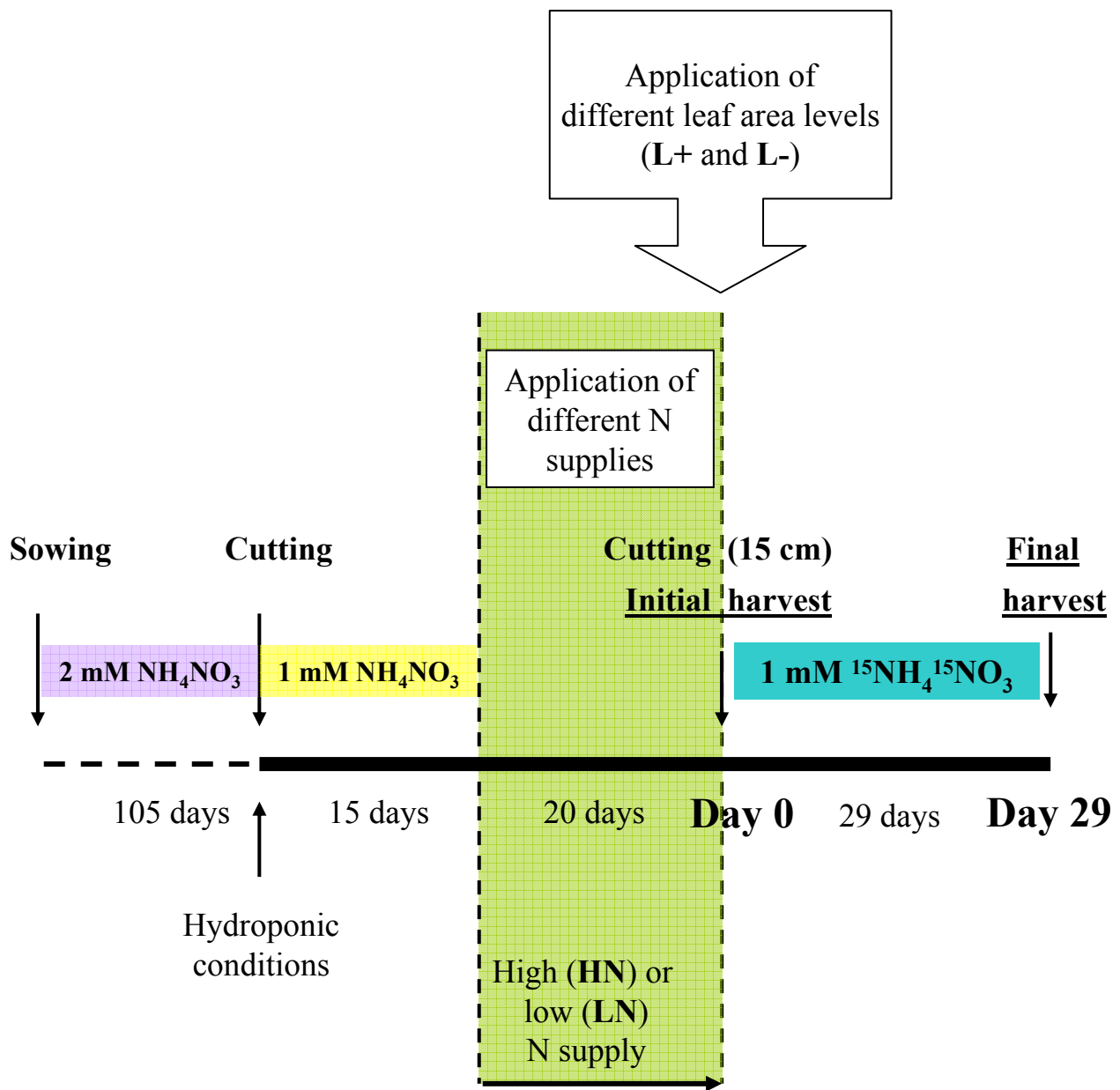
Several studies have focused on the particular role of N reserves in alfalfa productivity, quality and persistency. In the taproot, which is the main storage organ of alfalfa, amino acids

and soluble proteins represent the largest soluble N fractions (Hendershot and Volenec, 1993b). Four vegetative storage proteins (15, 17, 32 and 57 kD VSPs) have been identified in the soluble protein N pool in taproots (Hendershot and Volenec, 1993a; Avice *et al.*, 1996a; Gana *et al.*, 1998) and the rate of regeneration of new photosynthetic tissues has been linearly related to taproot VSP concentration on the day of cutting (Avice *et al.*, 1996b). It appears that the accumulation of VSP can be indirectly affected by changes in source-sink relationships in relation to N within the plant (Staswick, 1994, Ourry *et al.*, 2001), or directly by exogenous stimuli such as methyl-jasmonate (Noquet *et al.*, 2001; Meuriot *et al.*, 2004) or modifications of soil N availability. For example, recent studies have shown that non-nodulated alfalfa is able to store N reserves as VSP even when mineral N supply decreased from 1000 to 50  $\mu\text{M NH}_4\text{NO}_3$  (Meuriot *et al.*, 2003).

These results show that the initial taproot N reserves, and particularly VSP, are of great importance during early shoot regrowth in alfalfa. Because the re-accumulation of N reserves starts only 10 to 15 days after harvest in alfalfa (Avice *et al.*, 1996b), the cutting frequency can influence the level of N storage directly and, as a consequence affect shoot yield. For example, an increase of cutting frequency led to a decrease in N reserve accumulation (Avice *et al.*, 1997), and also a modified shoot morphology (development of more leaves and stems under the level of cutting), according to the “defoliation avoidance” strategy described by Briske (1996). This mechanism also interacts with the cutting intensity.

The initial quantity of stored N and residual leaf area are both affected by the cutting management (frequency or intensity) and have important implications for regrowth potential, but their individual effects on forage yield and the perenniality of alfalfa stands have not been clearly separated. In order to determine the particular effects of these two parameters, the regrowth of plants differing only in their initial N reserve level (and not by their remaining shoot structure), and by their initial leaf area levels (same cutting height and remaining plant structure) were studied. This work focused on the individual and combined effects of two parameters on biomass production and partitioning, N uptake kinetics, N allocation between the different organs, and N reserve formation in the taproot during a single cycle of defoliation and regrowth.





**Figure II.B.1:** Descriptive scheme of the experimental protocol. The different N supplies (HN or LN) were performed during 21 d before the day of clipping (Day 0). The different residual leaf area levels (L+ and L-) were measured on the day of clipping (Day 0).

**Figure II.B.1:** Schéma descriptif du protocole expérimental utilisé. Les différentes alimentations azotées (HN ou LN) ont été appliquées pendant 21 jours avant le jour de coupe (Day 0). Les différentes surfaces foliaires résiduelles (L+ et L-) ont été générées au jour de coupe (Day 0).

## **B.4- Materials and Methods**

### **B.4.1 Plant Material**

Seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Lodi) were germinated in containers of sand in January 1999. When the primary trifoliolate leaves appeared, the seedlings were transplanted to plastic pots filled with sand in order to have well developed taproots. To repress nodule formation, the plants were irrigated three times each week with 300 mL of a full nutrient solution obtained by the addition of 2mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to a basic nutrient solution. This basic nutrient solution contained, in mM, 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 3.0  $\text{CaCl}_2$ , 0.5  $\text{MgSO}_4$ , 0.15  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 Fe-Na EDTA; and, in  $\mu\text{M}$ , 14.0  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5.0  $\text{MnSO}_4$ , 3.0  $\text{ZnSO}_4$ , 0.7  $\text{CuSO}_4$ , 0.7  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$ , and 0.1  $\text{CoCl}_2$  (Kim *et al.* 1991). The plants were grown under greenhouse conditions (Fig. III.B.1) at 20°C (day) and 18°C (night) and with a photoperiod of 16 h (day) and 8 h (night). Natural light was supplemented with Neon tubes (Philips TLD 36W) supplying an average PAR of  $150 \pm 20 \mu\text{moles photons. m}^{-2} \text{. s}^{-1}$  at canopy height. After 105 days, the plants were cut at 6 cm above the level of crown (*i.e.* 6 cm cutting height) and were transferred to 8 L plastic containers of continuously aerated nutrient solution under hydroponic conditions (Fig. III.B.1). These containers (4 plants per container) were placed in a growth chamber with the same controlled growth conditions, except for light which was now provided by sodium high pressure lamps (Phytoclaude 400W) supplying an average PAR of  $400 \pm 30 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at canopy height. During the first 15 days of regrowth (Fig. 1), plants were supplied with a basic nutrient solution containing 1 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (renewed every 3 d). Thereafter, plants were submitted to two different levels of N availability as described below.

### **B.4.2 Application of different N supplies and residual leaf areas**

Previous results (Kim *et al.*, 1993; Avice *et al.*, 1996a) have shown that alfalfa regrowth is characterised by two different phases. During the first two weeks following shoot removal, there is an extensive mobilization of taproot organic N reserves (and especially VSPs). After this period of regrowth, soluble proteins, as well as VSPs, slowly re-accumulate; but taproot N reserves are quantitatively and qualitatively modified by the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  concentration in the nutrient solution (Meuriot *et al.*, 2003). Accordingly, in this experiment,

after the first 15d of regrowth, two different levels of N supply were applied for 21 d in order to produce plants with contrasting taproot N reserves (Fig. III.B.1). During this 21 d period (in the phase of N reserve re-accumulation), half of the plants received 1 mM of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in the nutrient solution. The depletion of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in the nutrient solution was measured daily in order to determine N uptake, and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  was added directly to the nutrient solution to compensate for daily N uptake (control plants corresponding to treatment **HN**). The remaining plants (treatment **LN**) received only 25% of the  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  daily taken up by the control plants (**HN**). During the 21 d of treatment, the nutrient solution was renewed at intervals of 3 days.

After 21 d of contrasting N treatments (Day 0, corresponding to the first day of the experiment; Fig. III.B.1), the plants were cut at 15 cm above the crown (*i.e.* 15 cm cutting height) to give two contrasting levels of defoliation: **L+**, plants retaining all their leaves between 0 and 15 cm, and **L-**, totally defoliated plants (between 0 and 15 cm). Cutting at 15 cm was necessary to produce clearly contrasting plant leaf areas. Plants of all treatments (**HNL+**, **HNL-**, **LNL+** and **LNL-**) were then arranged according to a randomized complete block design in the growth chamber and were supplied during the 29 d of regrowth with a basic nutrient solution containing 1 mM of  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  labelled with 2.5 atom %  $^{15}\text{N}$  excess to permit the study of N partitioning during regrowth (Fig. III.B.1).

#### **B.4.3 Tissue sampling**

Plants were harvested on the day of defoliation (Day 0) and 29 d after defoliation (Day 29). The root systems were carefully washed with cold demineralised water to remove any  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nutrient solution. Harvested plants were separated into lateral roots, taproots, remaining leaves and stems in the crown (*i.e.* leaves and stems present on the day of defoliation), and regrowing leaves and stems. The fresh weight of each sample was determined and the leaf area of the remaining and regrowing leaves was also measured immediately after harvest using a LI-3100 area meter (LI-COR *inc.*, Lincoln, Nebraska, USA). Root samples were frozen in liquid  $\text{N}_2$ . After freeze-drying, root samples were ground to fine powder and kept at  $-20^\circ\text{C}$  for further N analysis. Shoot tissues were dried at  $70^\circ\text{C}$  for 72 h, ground to fine powder, and stored under vacuum with desiccant for further N analysis.

#### **B.4.4 Analysis of taproot N pools at defoliation and after 29 d of regrowth**

Extraction of the different taproot N pools (insoluble N, nitrate, amino acids plus peptides and soluble proteins) was performed according to Barber *et al.* (1996) and Meuriot *et al.* (2003). Briefly, N pools were extracted twice from 300 mg of ground, freeze-dried taproot, with 5 mL of 100 mM sodium-phosphate buffer (pH 7.0). Tissue suspensions were vortexed four times for 1 min at 5-min intervals and centrifuged at 10.000 x g for 15 min (4°C). The resulting pellets represented the buffer-insoluble-N fraction. An aliquot of the resulting supernatant was used for soluble protein measurement by protein dye-binding (Bradford 1976) and VSP quantification by ELISA method (Noquet *et al.*, 2001).

Three mL of the resulting supernatants were also precipitated using the TCA protocol described by Peterson (1983). After centrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C), the pellet represented the buffer-soluble-protein-N fraction (including VSP), whereas the buffer-soluble N that remained dissolved in TCA was defined as the low molecular weight N fraction (mainly containing peptides, amino acids and nitrate). The nitrate concentration of the low molecular weight N fraction was determined by the sulfanilamide method, after reduction to nitrite using a continuous-flow autoanalyser (Bran + Luebbe, Noderstedt, Germany). The pool of amino acids plus peptides was deduced by subtraction of nitrate from the total low molecular weight N fraction. Except for nitrate, N concentrations in the different taproot N fractions were determined using an isotope ratio mass spectrometer (Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa Ltd., Crewe, UK).

#### **B.4.5 N uptake during regrowth after defoliation**

The amount of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  taken up by plants were calculated daily from their depletion in the nutrient solution.  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  disappearance was quantified from 1 mL of nutrient solution by high performance anionic (Ionpac AS9 analytical column) and cationic (Ionpac CS12 analytical column) chromatography (HPLC, DX100, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), respectively. The data were expressed as net N uptake per plant (Fig. II.B.4). The net N uptake rate (mean value obtained by the difference of total N uptake between two dates) was calculated for five specific regrowth periods (Table II.B.1).

#### **B.4.6 Calculation of N allocation in plants**

During post-cutting regrowth (Day 0 to Day 29), the experiment was conducted using a nutrient solution containing 1 mM  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  (with 2.5 atom%  $^{15}\text{N}$  excess). N content and  $^{15}\text{N}$  abundance in all organs and N fractions were measured in continuous flow using a C/N analyser linked to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa Scientific Ltd., Crewe, UK). Natural  $^{15}\text{N}$  abundance (0.3663 %  $\pm$  0.0004) of atmospheric  $\text{N}_2$  was used as reference for  $^{15}\text{N}$  analysis. When N was taken up by the plant, this N was labelled and the measurement of the  $^{15}\text{N}$  abundance in the different organs was used to determine the allocation of N derived from the mineral N taken up during the experiment as already described in several studies (Avice *et al.*, 1996b; Meuriot *et al.*, 2003b).

Therefore, the atom %  $^{15}\text{N}$  excess E (%) in a given organ was first obtained by the following equation:

$$E(\%) = A(\%) - 0.3663$$

where A(%) is the organ  $^{15}\text{N}$  abundance given by spectrometry.

Secondly, the nitrogen deriving from uptake (exogenous N;  $N_{\text{Exo}}$ ) in a given organ was calculated as follows:

$$N_{\text{Exo}} = N_{\text{T}} * (E(\%) / E_{\text{S}}(\%))$$

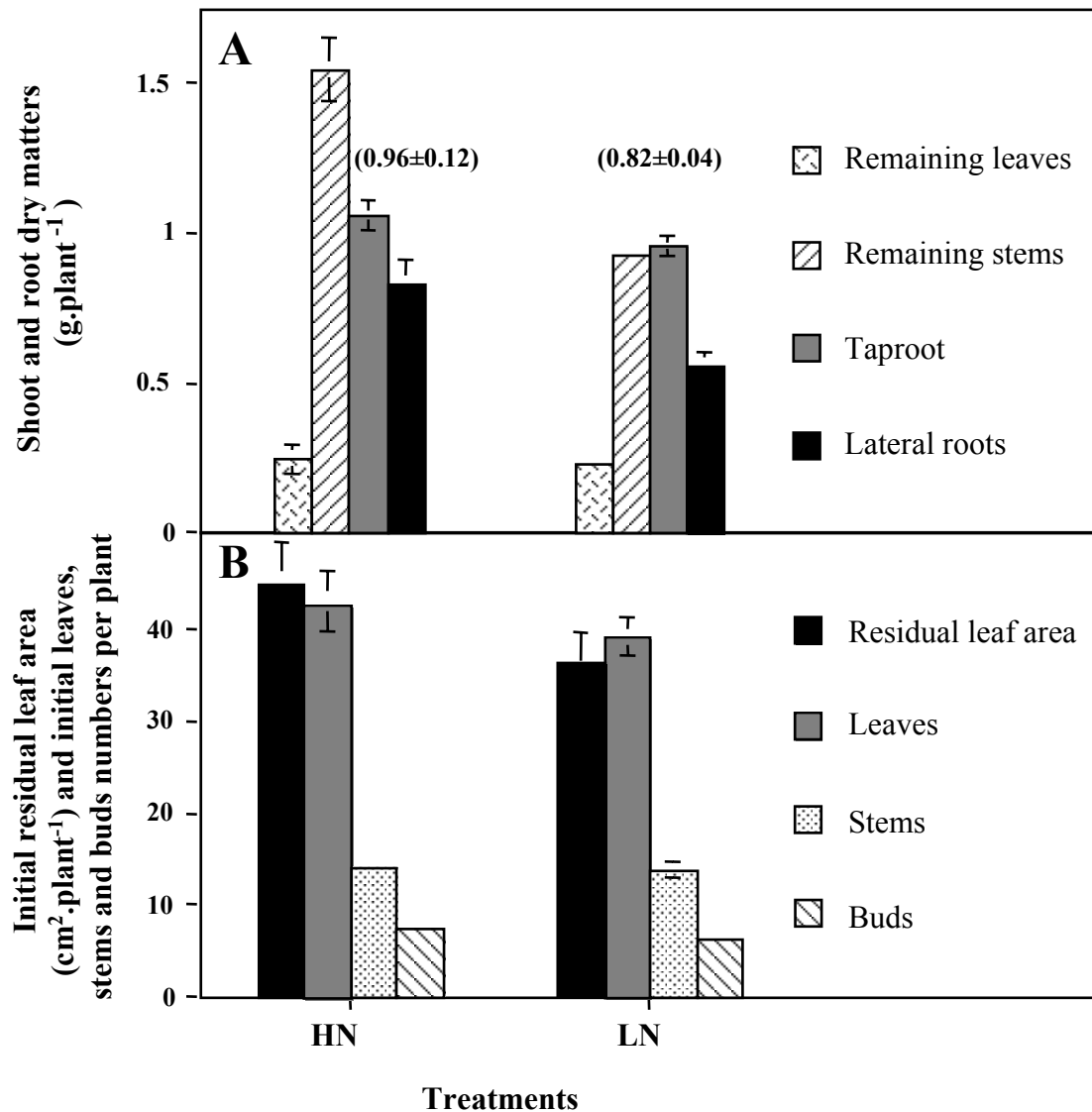
where  $N_{\text{T}}$  is total nitrogen in organ ( $\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$ )

and  $E_{\text{S}}$  the nutrient solution atom %  $^{15}\text{N}$  excess (2.5 %)

For determination of the relative allocation of  $N_{\text{Exo}}$  (Table 2) within the plant, results are expressed as percent of total  $N_{\text{Exo}}$  for each organ after 29 d of post-cutting regrowth. For nitrogen quantification in the different taproot N fractions (Fig. II.B.3 and II.B.6), results are expressed as percent of taproot total N content.

#### **B.4.7 Statistical analysis**

The experiments were performed with 3 replicates (each replicate containing 4 plants). Results represented the mean  $\pm$  S.E. for  $n=3$ . The effects of the different treatments were studied by comparison of the means using *t*-test (Statview Student software, Abacus Concepts, Berkeley, USA). Newman and Keuls's tests were realised for comparisons of means using the STAT-ITCF software.



**Figure II.B.2:** Total dry matter of lateral roots, taproot, remaining stems and leaves (A) and initial residual leaf area, number of leaves, stems and buds per plant (B) observed on the day of cutting (Day 0) in alfalfa previously submitted during 29 d to optimal (HN) or sub-optimal (LN) mineral N supplies. Values shown between brackets represent the mean  $\pm$  S.E. of the shoot to root dry matter ratio for  $n = 3$ . Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.B.2:** Matière sèche totale des racines latérales, du pivot, des tiges et feuilles des chaumes (A) et surface foliaire résiduelle initiale, nombre de feuilles, tiges et bourgeons par plante (B) observés au jour de coupe (Day 0) chez des luzernes préalablement soumises pendant 29 jours à des alimentations azotées optimales (HN) ou sous-optimales (LN). Les valeurs entre parenthèses représentent la moyenne  $\pm$  E.S. du rapport des parties aériennes sur les parties racinaires pour  $n = 3$ . Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

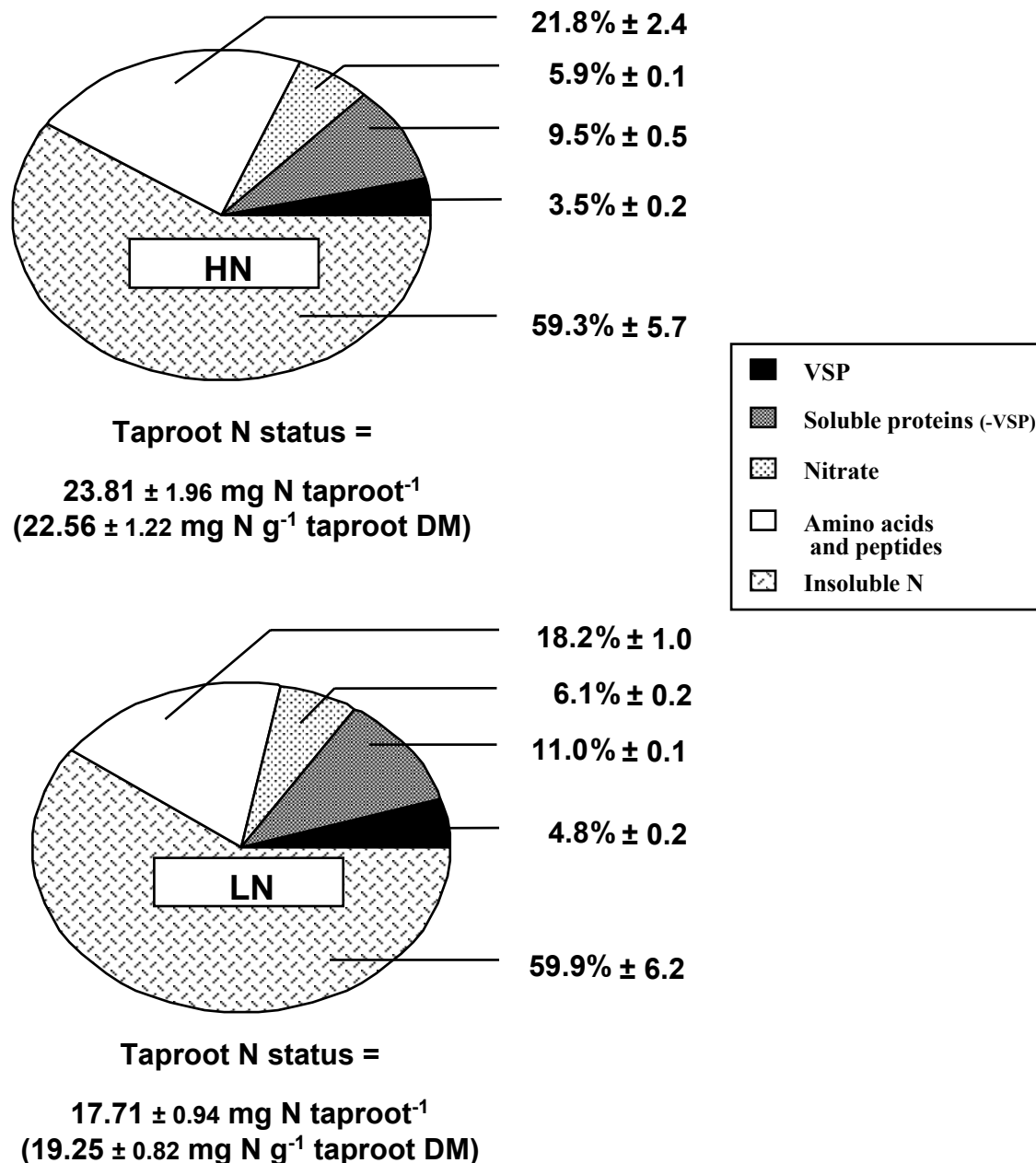
## **B.5- Results**

### **B.5.1 Biomass and morphological status on the day of cutting (Day 0)**

At Day 0 the reduced N supply during the previous 21 d (LN- plants) strongly decreased alfalfa total dry matter by 32% (Fig. II.B.2A), when compared to HN plants. Stem dry weight, which accounted for approximately 38% of total dry matter for both treatments at Day 0, was much higher in HN plants ( $1.62 \pm 0.23 \text{ g.plant}^{-1}$ ) than LN plants ( $0.91 \pm 0.16 \text{ g.plant}^{-1}$ ). Lateral root dry weight was also significantly higher in HN compared with LN plants. Nevertheless, the main determining morphological traits for post-cutting regrowth such as taproot dry matter, residual leaf area and the number of remaining leaves, were unchanged between LN and HN plants (Fig II.B.2A and 2B). Lastly, leaf dry matter, the number of buds and stems (Fig. II.B.2A and 2B), as well as the shoot / root dry matter ratio ( $p > 0.071$ ; Fig. II.B.2A) were not significantly affected by nitrogen availability in the nutrient solution.

### **B.5. Taproot N reserves on the day of cutting (Day 0)**

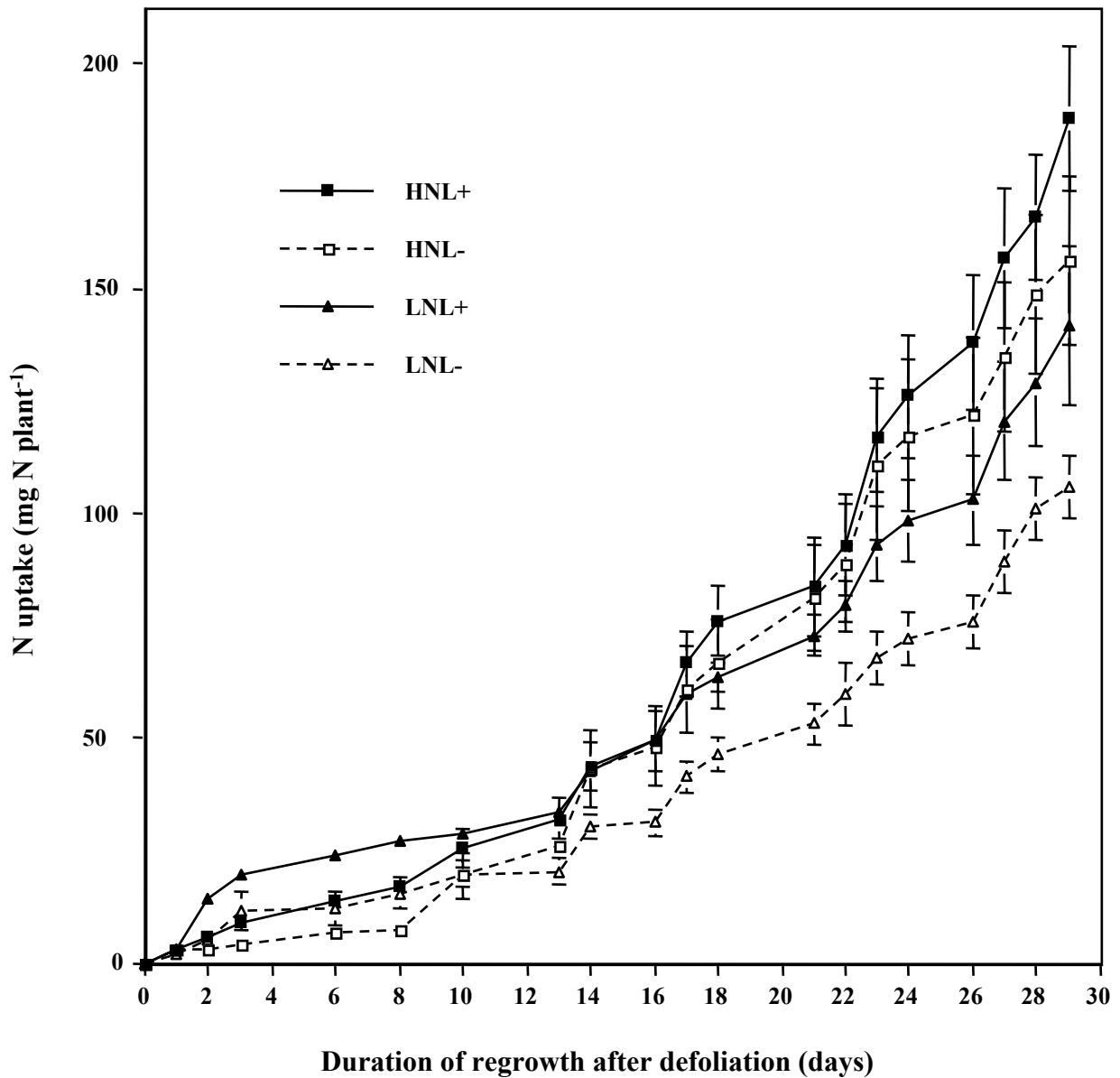
Because taproot N status is of particular importance during early regrowth, both taproot N status and taproot N reserve compounds were studied at Day 0 (Fig. II.B.3). Reduced N supply significantly decreased both taproot total N amount and concentration (by 25 and 15%, respectively). However, the reduced supply of N did not lead to a significant change in the proportion between insoluble and soluble N fractions, which approximately represented 60 and 40% of taproot total N for both N pre-treatments, respectively (Fig. II.B.3). In absolute quantity ( $\text{mg N.taproot}^{-1}$ ), the initial soluble N reserve compounds (nitrate, amino acids plus peptides, soluble proteins and VSP) were higher in plants previously supplied with high levels of mineral N. Nevertheless, when compared to HN plants, the reduction of mineral N supply caused only slight differences in N partitioning between the different soluble N pools. For example, the total soluble protein N pool (including VSP) represented  $13.04 \pm 0.72 \%$  of taproot total N for HN vs  $15.81 \pm 0.33 \%$  for LN treatment (Fig. II.B.3). However, the absolute amount of N as soluble protein (including VSP) was 3.1 (HN) and 2.8 (LN) mg per taproot. N partitioning between nitrate, amino acid plus peptides and insoluble N pool was not significantly different between N treatments.



**Figure II.B.3:** Taproot N status and N allocation between insoluble N, amino acids and peptides, nitrate, soluble protein and VSP N pools observed at cutting (Day 0) in alfalfa previously submitted during 29 d to optimal (HN) or sub-optimal (LN) mineral N supplies. Values shown between brackets represent the mean ± S.E. for  $n = 3$  of taproot N content. N allocation values are given as percent of taproot total N amounts ± S.E. of the mean for  $n = 3$ .

**Figure II.B.3:** Statut azoté et répartition de l'azote entre les pools azotés du pivot tels que l'N insoluble, les acides aminés et peptides, le nitrate, les protéines solubles et les VSP au jour de coupe (Day 0) chez des luzernes préalablement soumises pendant 29 jours à des alimentations azotées optimales (HN) ou sous-optimales (LN). Les valeurs entre parenthèses représentent la moyenne ± E.S. de la quantité d'azote du pivot pour  $n = 3$ . Les valeurs données pour l'allocation de l'azote sont données en pourcentage de la quantité totale de l'azote du pivot et représentent ± E.S. de la moyenne pour  $n = 3$ .





**Figure II.B.4:** Net N uptake kinetics of alfalfa plants during regrowth after defoliation for **HN** and **LN** pretreatments and/or **L+** and **L-** treatments. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.B.4:** Cinétique d'absorption nette de l'azote chez des plants de luzerne pendant la repousse après coupe pour les prétraitements **HN** ou **LN** croisés avec les traitements **L+** et **L-**. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

**Table II.B.1:** Kinetics of net uptake of N by alfalfa plants during five successive phases of post-cutting regrowth. Values represent means  $\pm$  S.E. for  $n=3$ . Values within rows without a common letter (a, b, c, or d) are significantly different, according to Newman and Keuls test, at  $P<0.05$ .

**Table II.B.1:** Vitesses d'absorption nettes de l'azote pendant les cinq phases successives de la repousse après la coupe. Les valeurs indiquent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ . Les valeurs en ligne suivies une lettre (a, b, c ou d) en indice sont significativement différentes selon un test de Newman et Keuls, avec  $P<0.05$

Post-cutting regrowth main intervals	N uptake (mg N. plant <sup>-1</sup> . day <sup>-1</sup> )			
	HNL+	HNL-	LNL+	LNL-
<b>0-3 d</b>	12.07 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	5.83 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	26.31 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	15.55 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>
<b>3-8 d</b>	6.26 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	2.54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	6.13 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	3.11 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
<b>8-13 d</b>	12.27 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>	14.75 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	4.84 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	3.90 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
<b>13-21 d</b>	25.80 $\pm$ 3.58 <sup>c</sup>	27.63 $\pm$ 1.68 <sup>c</sup>	19.74 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>	16.39 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>
<b>21-29 d</b>	51.96 $\pm$ 4.41 <sup>c</sup>	37.52 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	34.35 $\pm$ 3.56 <sup>b</sup>	26.37 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>

### **B.5.3 Net N uptake during regrowth after cutting**

During the 29 d of regrowth, the variation of N uptake (Fig. II.B.4) and net N uptake rates (Table II.B.1), which were both quantified thanks to HPLC analysis, were affected by the initial N reserve and residual leaf area levels.

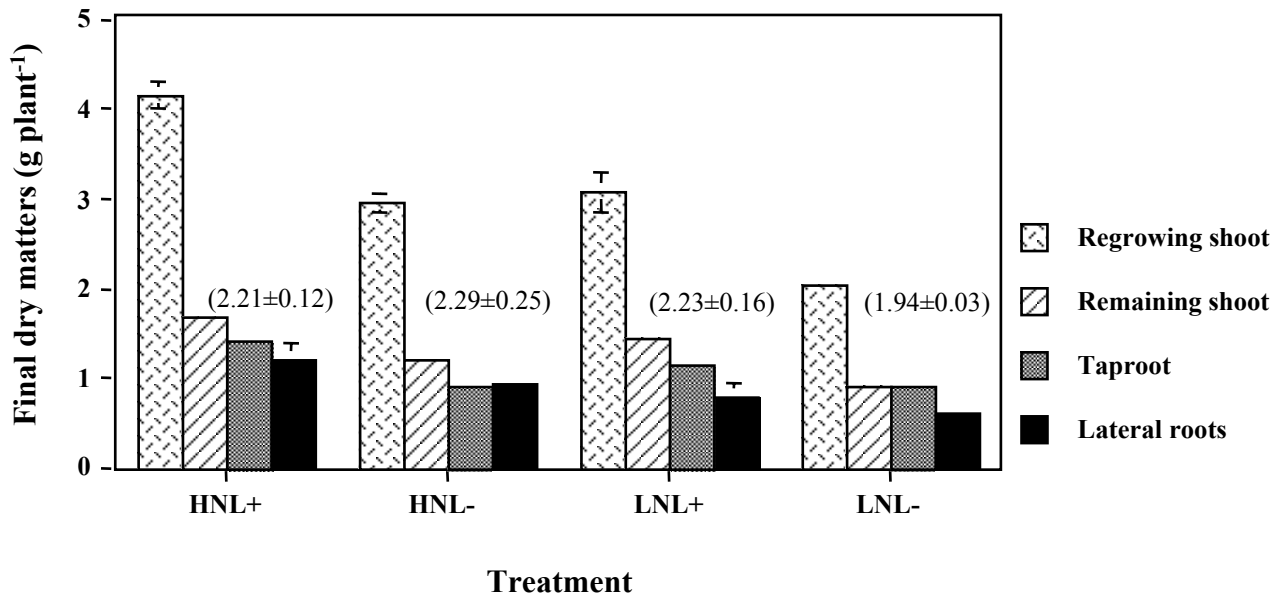
During the first 3 d of regrowth, both LN treatments (and particularly LNL+) had the greatest net N uptake rate, when compared to both HN treatments (Table II.B.1). Then, the net N uptake rate declined for all treatments between Day 3 and Day 8 of regrowth. During this first week of regrowth, the greatest reduction of the net N uptake rate was observed in the LNL- plants. Between Day 8 and Day 13 of regrowth, the net N uptake rate remained low for both LN treatments (from  $4.84 \pm 0.23$  to  $3.90 \pm 0.49$  mg N. plant<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> for LNL+ and LNL- treatments, respectively), while the net N uptake rate began to increase for both HN treatments (Table II.B.1).

During the phase from 13 to 29 d of regrowth, the net N uptake rate progressively increased in all treatments (Table II.B.1). Irrespective of the residual leaf area level, HN treatments had higher net N uptake rates than LN treatments. As a consequence, after 29 d of regrowth N uptake was  $187.73 \pm 28.82$  mg. plant<sup>-1</sup> for HNL+ plants compared with  $105.94 \pm 13.64$  mg. plant<sup>-1</sup> for LNL- plants (Fig. II.B.4).

### **B.5.4 Production and allocation of the biomass at the end of regrowth (Day 29)**

Final biomass dry weights were severely reduced in L- and LN treatments in comparison with HNL+ plants (Fig. II.B.5). Except for LNL- where dry matter allocation was shifted in favour of the roots (taproot and lateral roots), the different organs of the whole plant were affected in the same proportions by the different treatments. Thus, the shoot to root dry matter ratio reached approximately  $2.24 \pm 0.04$  in average vs  $1.94 \pm 0.03$  for LNL- (where the regrowing shoot DM was only 50% of HNL+ shoot DM). Moreover, final taproot DM was significantly greater ( $p=0.0267$ ) for L+ than for L- treatments (Fig. II.B.5).

### **B.5.5 N content and allocation within the plant at the end of regrowth (Day 29)**



**Figure II.B.5.** Dry matters of lateral roots, taproot, remaining shoot and regrowing shoot (A), and shoot-root ratio (B) of alfalfa plants under **HN** and **LN** pretreatments and/or **L+** and **L-** treatments at final harvest (Day 29). Values shown between brackets represent the mean  $\pm$  S.E. of the shoot to root dry matter ratio. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.B.5.** Matière sèche des racines latérales, du pivot, des chaumes et des organes aériens en croissance pour les prétraitements **HN** et **LN** croisés avec les traitements **L+** et/ou **L-**. Les valeurs entre parenthèses représentent la moyenne  $\pm$  E.S. du rapport des parties aériennes sur les parties racinaires pour  $n=3$ . Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Total N and total exogenous N (deriving from the N uptake and estimated by  $^{15}\text{N}$  IRMS analysis) were significantly reduced in L- or LN plants after 29 d of regrowth (Table II.B.2), in comparison with HNL+ plants. HNL-, LNL+ and LNL- plants had approximately 17, 23% and 46% lower amounts of total N, respectively than HNL+ plants. However, and irrespective of the different treatments, total exogenous N represented approximately 62% of total N found in the plants at the end of the experiment (Table II.B.2).

In addition, the relative allocation of total exogenous N within the regrowing shoots was unaffected by treatment (Table II.B.2). Most of the exogenous N was found in the regrowing shoot tissues ( $66.57 \pm 1.66\%$  of total exogenous N on average) and a very small part in the remaining shoot tissues present at Day 0 ( $5.25 \pm 0.38\%$  of total exogenous N on average). Allocation of N to taproots varied from 6.95 to 10.25%, while % N in lateral roots was significantly lower (11.52%) in LNL+ plants compared with other treatments (c.19%).

#### **B.5.6 N status and reserve compounds in taproot at the end of regrowth (Day 29)**

The taproot N status after 29 d of regrowth was significantly altered when leaves were totally removed (L-) and/or when N reserve status was low (LN) at Day 0 (Fig. II.B.6). However, leaf removal decreased taproot N concentrations only in HN plants:  $27.68 \pm 1.92$  (HNL+) vs  $21.68 \pm 0.64$  mg N.g<sup>-1</sup> DM (HNL-). Total N in taproot at the end of regrowth was similar in LNL- and HNL- plants (c. 21mg), while LNL+ plants had significantly lower total N than HNL+ plants (Fig. II.B.6).

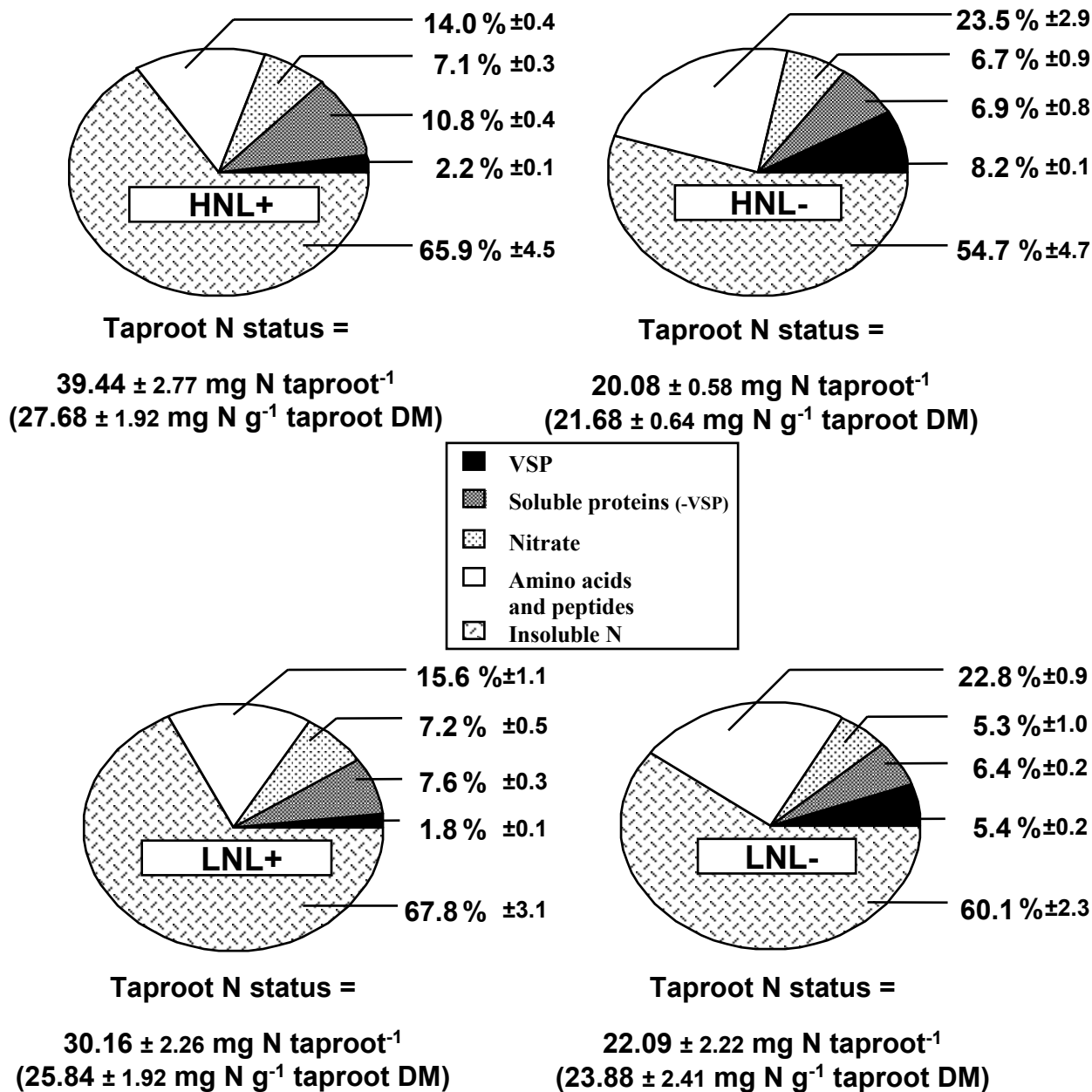
The final relative N partitioning between the different taproot N fractions was also modified by the different treatments (Fig. II.B.6). Irrespective of the initial N status, the proportion of soluble N fraction (nitrate, amino acids, proteins and VSP) significantly increased as a result of leaf removal (45.3% for HNL- vs 34.1% for HNL+ and 39.9% for LNL- vs 32.2% for LNL-). This was mainly due to the relative increase of N partitioning in the amino acid plus peptide N pool (up to 40% of increase for HNL- vs HNL+), whereas nitrate and soluble protein N pool decreased in the meanwhile (Fig. II.B.6). Compared to L+ plants, the VSP N pool also increased by more than 3-fold in both L- treatments (Fig. II.B.6). The VSP N pool represents about 50% of the soluble protein N pool for L- treatments vs only 20% for L+ treatments at Day 29 (Fig. II.B.6). Finally, and irrespective of the residual leaf area at Day 0, the initial N status did not induce large changes in N partitioning between the soluble and non soluble taproot N fractions, but significantly alters N partitioning within the

**Table II.B.2.** Total N, total exogenous N and exogenous N allocation within the plant after 29 d of regrowth following defoliation. Total N and total exogenous N values indicate the mean  $\pm$  S.E. for  $n = 3$ . Exogenous N allocation values are given as percent  $\pm$  S.E. of total exogenous N per plant for  $n = 3$ . Value within columns without a common letter (a, b, bc, or c) are significantly different, according to Newman and Keuls test with  $p < 0.05$ .

**Table II.B.2** Azote total, azote total absorbé et allocation de l'azote absorbé dans la plante après 29 jours de repousse après la coupe. Les valeurs de l'azote total et de l'azote total absorbé représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$ . Les valeurs représentant la répartition de l'azote absorbé sont données en pourcentage  $\pm$  E.S. de l'azote total absorbé par la plante pour  $n = 3$ . Les valeurs en colonne suivies par une lettre (a, b, bc ou c) en indice sont significativement différentes, selon un test de Newman et Keuls avec  $P < 0,05$ .

	Total N (mg N.plant <sup>-1</sup> )	Total exogenous N (mg N.plant <sup>-1</sup> )	Allocation of total exogenous N within the plant (% of total exogenous N)			
			Regrowing shoot	Remaining shoot	Taproot	Lateral roots
<b>HNL+</b>	<b>305.61<sup>c</sup></b> $\pm 16.83$	<b>187.73<sup>c</sup></b> $\pm 19.56$	<b>65.75<sup>a</sup></b> $\pm 4.29$	<b>5.68<sup>a</sup></b> $\pm 0.44$	<b>10.12<sup>c</sup></b> $\pm 0.32$	<b>18.45<sup>b</sup></b> $\pm 2.62$
<b>HNL-</b>	<b>254.22<sup>b</sup></b> $\pm 27.40$	<b>156.28<sup>bc</sup></b> $\pm 28.94$	<b>68.43<sup>a</sup></b> $\pm 5.78$	<b>5.07<sup>a</sup></b> $\pm 0.15$	<b>6.95<sup>a</sup></b> $\pm 0.12$	<b>19.55<sup>b</sup></b> $\pm 2.01$
<b>LNL+</b>	<b>235.41<sup>b</sup></b> $\pm 8.89$	<b>141.62<sup>b</sup></b> $\pm 2.346$	<b>71.46<sup>a</sup></b> $\pm 6.18$	<b>7.99<sup>b</sup></b> $\pm 0.96$	<b>9.03<sup>b</sup></b> $\pm 0.49$	<b>11.52<sup>a</sup></b> $\pm 1.99$
<b>LNL-</b>	<b>164.71<sup>a</sup></b> $\pm 14.35$	<b>105.94<sup>a</sup></b> $\pm 11.78$	<b>65.40<sup>a</sup></b> $\pm 3.67$	<b>4.99<sup>a</sup></b> $\pm 0.43$	<b>10.25<sup>c</sup></b> $\pm 0.09$	<b>19.36<sup>b</sup></b> $\pm 2.31$

different soluble N pools. Whereas the proportion of the VSP fraction in soluble protein N pool remained unchanged, the sum of these two N pools significantly decreased from  $13 \pm 0.5$  % for HNL+ to  $9.4 \pm 0.4$  % for LNL+ and from  $15.1 \pm 0.9$  % for HNL- to  $11.8 \pm 0.4$  % for LNL- respectively.



**Figure II.B.6.** Final N contents and N partitioning between insoluble N, amino acids and peptides, nitrate, soluble protein and VSP pools in alfalfa taproots under HN and LN pretreatments and L+ and L- treatments at the end of the experiment (Day 29). Values shown between brackets represent ± S.E. of the mean for  $n = 3$  of taproot N content. N allocation values are given as percent of taproot total N amounts ± S.E. of the mean for  $n = 3$ .

**Figure II.B.6.** Teneurs et répartitions finales de l'azote entre les pools azotés du pivot tels que l'N insoluble, les acides aminés et les peptides, le nitrate, les protéines solubles et les VSP chez la luzerne pour les pretraitements HN et LN croisés avec les traitements L+ et L- à la fin de l'expérimentation (Day 29). Les valeurs entre parenthèses représentent ± E.S. de la moyenne des quantités d'azote du pivot pour  $n = 3$ . Les valeurs données pour l'allocation de l'azote sont données en pourcentage de l'azote total du pivot et représentent ± E.S. de la moyenne pour  $n = 3$ .



## **B.6- Discussion**

The objective of this work was to study the influence of residual leaf area and initial taproot N reserves on N uptake and distribution and yield in alfalfa. The effects of two different residual leaf areas (shoots with (L+) or without (L-) their leaves) and plants with contrasting initial N status (high N; HN or low N; LN level of taproot N reserves) on growth, N uptake kinetics, and N partitioning, allocation and storage within the alfalfa plant (*cv. Lodi*) during post-cutting regrowth were analysed.

### **B.6.1 Effects of the N fertilization on initial biomass, plant morphology and N status**

As already observed in alfalfa (Fishbeck and Philips, 1981; Ourry *et al.*, 1994, Meuriot *et al.*, 2003), soybean (*Glycine max* L. Merr.; Rufty *et al.*, 1984), chicory (*Cichorium intybus*; Améziane *et al.*, 1997) and ryegrass (*Lolium perenne* L.; Clement *et al.*, 1978; Thornton *et al.*, 1993), low N supply limited total biomass production, and shoot growth in particular (Fig. III.B.2a). However, a more detailed study of the remaining organs showed that the reduction in N supply did not cause significant changes in taproot dry matter, residual leaf area, or the number of leaves, stems, and buds in the crown. The reduction of N supply resulted in significant decreases in both taproot total N content and concentration (Fig. III.B.3), although N partitioning between non-soluble and soluble N pools was unaffected. Nevertheless, the proportion of N in soluble protein and VSP pools increased while the proportion of N in the amino acid and peptide N pool declined. These results suggested that the reduction in N supply induced large changes in the source-sink relationships, in relation to N, within the plant, which led to quantitative and qualitative differences in taproot N status on the day of cutting (Day 0). The reduction in N supply did not, however, change the main C reserve compound, which is starch in alfalfa (data not shown). Thus, the alfalfa plants in this experiment differed only in their initial N reserve status, and not in their main morphological traits, which are known to play a part in post-cutting regrowth, and which would have interacted with the main variables of the experiment (*i.e.* initial N status and residual leaf area).

### **B.6.2 Effects of initial residual leaf area and N status on N uptake during post-cutting regrowth**

During the first 3 d of regrowth (corresponding to the re-supply of 1mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to LN plants), and despite a reduced lateral root biomass, N uptake by LN plants was more than twice that by HN plants (Fig. III.B.4 and Table III.B.1). Because the LN plants had lower amino acid and peptide levels at Day 0, the transient increase in N uptake seems to be in agreement with studies on soybean where Muller and Touraine (1992) showed that N uptake might be stimulated by decreasing phloem amino acid contents. Recent molecular studies also seem to support the hypothesis that N uptake feedback regulation is controlled by N products derived from nitrate assimilation ( $\text{NH}_4^+$ , amino acids) rather than by nitrate itself (Touraine *et al.*, 2001; Forde, 2002). Moreover, and as for some grass species like ryegrass (*Lolium perenne* L.), the pool of amino acids in roots could also influence N uptake and play a regulatory role in early regrowth (Mac Duff *et al.*, 1989; Louahlia *et al.*, 1999; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). The effects of the initial N reserve compounds and residual leaf area levels were cumulative for LNL- plants which showed the greatest decrease in net N uptake rates (reduction of 75%), when compared with HNL+ plants (Table III.B.1). In previous work, Hendershot and Volenec (1993b) reported that the relative concentrations of amino acids in the taproot increased transiently during the first 6 days following defoliation. This could be explained by the conjunction of the degradation of soluble proteins in the taproot and the reduction of phloem and xylem fluxes caused by the shoot removal (Richards, 1993). This phenomenon could be also related to the lack of amino acid transport. Overall, the data suggest that the high level of amino acids in the root could limit the mineral N uptake during the first 3 d of regrowth observed in HN plants in comparison with LN plants. Thereafter, and irrespective of the residual leaf area treatments, N uptake was always superior for LN plants than for HN plants during the first 8-10 d of regrowth. Thus, in agreement with data for ryegrass (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999; Louahlia *et al.*, 1999), where N uptake and N translocation were sustained after defoliation in low N plants growing under non-limiting N conditions, the present results show, for the first time, that alfalfa is also able to develop such a compensatory process. However, this seems to be a time-limited process and, irrespective of residual leaf area, HN plants showed greater net N uptake rates from Day 8 onwards. This second phase of N uptake also seemed to coincide with the re-accumulation of N reserves, which occurred after approximately 15 d of regrowth (Kim *et al.*, 1993; Avice *et al.*, 1996a) and when N supply was considered to exceed N demand for shoot growth. Overall the results

suggest that the initial N status and/or the residual leaf area level alter N uptake, and that initial N status seemed to be a dominant factor during early regrowth.

### **B.6.3 Effects of initial residual leaf area and N status on final biomass production, N allocation and N partitioning**

By the end of the experiment, the severity of the defoliation at Day 0 and/or the initial low N status had resulted in lower total biomass production. However, except for LNL-, these factors did not modify the shoot / root dry matter ratio significantly (Fig. III.B.5). These results are consistent with previous studies on alfalfa (Kim *et al.*, 1993; Avice *et al.*, 1996a) showing that yield is dependent on initial N status or cutting level. Complete defoliation (L-) and/or LN status at Day 0 also resulted in significantly lower total plant N and total N derived from mineral uptake after 29 d of regrowth (Table 2). Ourry *et al.* (1994) have also shown a significant correlation between the N reserve level in perennial organs and total exogenous N uptake, and shoot biomass production after 24 d of regrowth following defoliation. However, in the present experiment, after 29 d of regrowth under non-limiting N conditions, and except for LNL+ plants, the initial N status and/or the residual leaf area level on the day of cutting did not cause significant changes in the relative allocation of the absorbed N within the plant. Thus, approximately 65 % of total N was found in the regrowing shoot, as against 30 % in the roots. It appears that the final allocation of exogenous N within the plant (at Day 29) was more closely related to growth conditions (N availability, light, temperature...) during the regrowth period than to the initial N reserves or to the intensity of cutting. On the other hand, initial N reserves probably played a major role during early regrowth.

Low initial N status and low residual leaf area also caused significant reductions in the final N content of the taproot, and changes in N partitioning among the different taproot N fractions (Fig. III.B.6). Irrespective of the initial residual leaf area, the proportions of soluble and insoluble N pools remained constant, whereas the total soluble protein N pool (including VSP) decreased by more than 20% for both LN treatments, compared with HN plants. However, the proportion of the amino acid plus peptide N pool increased in L- plants compared with L+ plants, whereas the nitrate and soluble protein N pools were reduced for HN and LN plants. The VSP N pool represented about 50% of the soluble protein N pool for both L- treatments but only 20% for both L+ treatments. These effects of the severity of cutting or the level of initial N reserves on the final soluble N composition in taproots is of

great importance because this final status will become a new initial status if the alfalfa crop is cut again, and could have important consequences for the following regrowth.

In conclusion, the residual leaf area and/or the initial taproot N status - two parameters that are modulated by cutting intensity and frequency - had strong effects on the N source-sink relationships within the plant, and were sufficient to generate differences in plant N status, even after 29 d of regrowth under non-limiting N conditions. Thus, although shoot to root dry matter ratio and exogenous N allocation within the different organs of the plant remained constant at the end of the experiment, total biomass production, N uptake and N partitioning among the different taproot N pools were strongly modified, and particularly by the initial residual leaf area. When subjected to adverse conditions such as defoliation, alfalfa adapted by increasing N use efficiency and by the preferential mobilization of specific taproot N pools such as VSP or amino acids. Both the quantitative and qualitative composition of taproot N pools were also important factors determining yield and, in addition, the perenniality of the crop. Because it has been shown that nitrate reduction is essentially confined to alfalfa roots (Pate, 1980), this emphasizes the idea that N storage as protein in the taproot (rather than nitrate or amino acids forms) may allow nitrate uptake or reduction to occur at normal rates, as suggested by Millard (1988). Thus, this study suggests that protein storage is not only a means to sequester N in a tissue for further mobilization, utilization for growth or tissue maintenance, but may also indirectly influence both N acquisition and reduction capacities.

### ***Acknowledgments***

The authors wish to thank Marie-Paule Henry and Patrick Beauclair for their invaluable help in sample acquisition, nitrate and IRMS sample analysis. We also thank Dr Tony Gordon (IGER, Aberystwyth) for valuable comments on this work. Acknowledgments are extended to Prof. Jeffrey J. Volenec (Department of Agronomy, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2054, USA) for kindly providing the anti-VSP polyclonal antibodies. This work was supported by a Ph D grant from the INRA (National Institute for Agricultural Research, France) and the “Conseil Régional de Basse-Normandie” attributed to F. Meuriot.

***C- Contribution of initial C and N reserves in Medicago sativa L. recovering from defoliation: modulation by the cutting height and the residual leaf area.***

**Contribution des réserves C et N initiales chez la luzerne lors de la repousse après la coupe : modulation par la hauteur de coupe et par la surface foliaire résiduelle.**

**Authors:** MEURIOT<sup>1</sup> F., DECAU<sup>1</sup> M-L., MORVAN-BERTRAND<sup>1</sup> A., PRUD'HOMME<sup>1</sup> M-P., GASTAL<sup>2</sup> F., SIMON<sup>1</sup> J-C., VOLENEC<sup>3</sup> J.J. and AVICE<sup>1\*</sup> J-C.

**Address:**

<sup>(1)</sup> UMR INRA / UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N, C, S. Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France.

<sup>(2)</sup> UEPEF INRA, Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères, Domaine du Chêne, Route de Saintes, 86600 Lusignan, France.

<sup>(3)</sup> Department of Agronomy, Lilly Hall of Life Sciences, 915 W. State St., Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2054, USA

(\* ) To whom correspondance should be addressed: AVICE Jean-Christophe, UMR INRA / UCBN 950, Ecophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions N, C, S. Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Université, 14032 Caen Cedex, France, Phone : +33 02 31 56 56 65, Fax : +33 02 31 56 53 60, email : [avice@ibfa.unicaen.fr](mailto:avice@ibfa.unicaen.fr)

*Article soumis à Functional Plant Biology (Juin 2004)*

## **C.1- Abstract**

The main goal of this experiment was to study the role of stubble C-N reserves or residual leaf area (RLA) on the contribution of taproot C-N reserves to the regrowing shoot of *Medicago sativa* L. after defoliation. Consequently, plants with two cutting heights (6 or 15 cm), two RLAs (0 or 100% of the residual leaf area present under the level of cutting), and two initial C-N reserve levels (High N, HN or Low N, LN) were combined. We then studied the effects of these treatments on forage production, N distribution, and C-N reserve dynamics in both stubble and taproot tissues during 28 days of regrowth.

Our results showed that alfalfa forage production was mainly affected by the initial taproot C-N reserve levels. Despite a faster and greater relative mobilization of overall organic reserves like amino acids or VSPs during early regrowth, LN plants had a reduced forage production of more than 30% in average at Day 28, when compared to HN plants. However, we report that stubble initial organic reserves (and to a lesser extent the RLA) are also of particular importance for LN plants during early regrowth. The increase of the cutting height led to a parallel increase of the stubble C-N supply to the regrowing shoot, which partly counter-balanced the negative effect on forage production and on taproot C-N reserves depletion for LN plants. Nevertheless, and unlike within the taproot, there was no significant reconstitution of overall stubble organic reserves until the end of the experiment. The positive contribution of stubble organic reserves to shoot C-N supply then seemed solely effective on a single defoliation / regrowth cycle.

As a conclusion, alfalfa culture managements based on the increase of the cutting height (and the RLA) during the penultimate autumn harvest should be particularly considered in northern regions enduring cold and hard winters. This may limit the mobilization rate of organic reserves stored in taproots. The maintenance of high C-N reserves level in this organ should improve alfalfa winter survival and persistency, as well as spring herbage regrowth.

**Key-words:** Alfalfa, nitrogen, leaf area, partitioning, mobilization, starch, amino acids, vegetative storage protein.

**Abbreviations:** C, Carbon; DM, Dry Matter; ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; IRMS, Isotope Ratio Mass Spectrometer; N, Nitrogen; RLA, Residual Leaf Area; TNC, Total Non-structural Carbohydrates; VSP, Vegetative Storage Protein.

## **C.2- Résumé**

L'objectif principal de cette expérimentation a consisté à étudier le rôle de la surface foliaire résiduelle (RLA) et des réserves C-N des chaumes sur la contribution des réserves C-N du pivot aux parties aériennes en croissance de *Medicago sativa* L. après la coupe. Par conséquent, des traitements avec deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux RLA (0 ou 100 % de la surface foliaire présente au jour de coupe), et deux niveaux de réserves azotées initiales (N fort ; HN ou N faible ; LN) ont été combinés. Nous avons alors suivi les effets de ces traitements sur la biomasse produite, la distribution de l'azote, et la dynamique des réserves C-N, à la fois dans les tissus des chaumes et du pivot, pendant 28 jours de repousse.

Nos résultats montrent que la biomasse produite chez la luzerne est davantage affectée par le niveau initial des réserves C-N du pivot que par la hauteur de coupe ou la surface foliaire résiduelle. En dépit d'une mobilisation relative plus rapide et plus grande de l'ensemble des réserves organiques telles que les acides aminés et les VSP pendant le début de la repousse, les plantes LN ont des biomasses réduites de plus de 30 % en moyenne à J28, par comparaison avec les plantes HN. Cependant, les réserves organiques initiales des chaumes (et dans une certaine mesure la RLA) sont aussi d'une importance particulière, notamment pour les plantes LN, pendant le début de la repousse. L'augmentation de la hauteur de coupe entraîne une augmentation parallèle de la fourniture de ressources C-N issues des chaumes aux parties aériennes en croissance, ce qui contrebalance partiellement l'effet négatif observé sur la production de biomasse aérienne et sur la mobilisation des réserves C-N du pivot pour les plantes LN. Néanmoins, et à la différence du pivot, il n'y a pas de reconstitution significative des réserves organiques des chaumes jusqu'à la fin de l'expérimentation. La contribution positive des réserves organiques des chaumes à la fourniture C-N aux parties aériennes semble donc seulement effective sur un seul cycle de coupe / repousse.

En conclusion, des conduites de culture de luzerne reposant sur l'augmentation de la hauteur de coupe (et de la RLA) pendant l'avant-dernière récolte automnale devraient être particulièrement reconsidérées dans les régions septentrionales rencontrant des hivers froids et rigoureux. Ceci permettrait de limiter le taux de mobilisation des réserves organiques stockées dans le pivot. Le maintien d'un niveau élevé de réserves C-N dans cet organe pourrait améliorer la survie et la persistance hivernale, ainsi que la reprise de croissance au printemps.

**Mots-clés :** Luzerne, azote, surface foliaire, répartition, mobilisation, amidon, acides aminés, protéines de réserve des organes végétatifs.

### **C.3- Introduction**

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial forage legume of great agricultural importance which was increasingly grown over centuries for forage and subsequent animal feeding (Bolton *et al.*, 1972; Hill, 1987). However, there are strong difficulties to properly manage two interacting parameters like forage productivity and culture perenniality (Lemaire and Allirand, 1993). Even if a consensual management of the balance existing between these two agronomical parameters has long been done at the field level (Graber *et al.*, 1927; Hodgkinson, 1969; Brink and Marten, 1989), this management remains fairly empirical and should be improved through a detailed study of C-N resource distribution and utilization at the whole plant level (Philippot, 1990; Lemaire and Allirand, 1993).

During post-cutting regrowth, the reconstruction of new photosynthetic shoot tissues largely requires the mobilization of C and N reserves previously stored in perennial organs (Hodgkinson, 1969; Ta *et al.*, 1990; Volenec *et al.*, 1996; Avice *et al.*, 1996a). In alfalfa, the taproot represents the major storage organ. In addition to its soil anchoring role, this organ accumulates high concentrations of C and N compounds which will be hydrolyzed to sustain shoot growth in spring or after cutting (Volenec *et al.*, 1996; 1998). For example, total non-structural carbohydrates (TNC), mainly represented by soluble sugars and starch, can reach up to 100 and 580 mg.g<sup>-1</sup> taproot DM, respectively (Fankhauser *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1990; Boyce and Volenec, 1992; Ourry *et al.*, 1994). Because of their abundance during winter and their extensive mobilization during spring growth, numerous studies concluded that these TNC were essential for winter survival, persistency, and spring growth (Volenec *et al.*, 1996; 1998). Additionally, the cutting tolerance of forage legumes and grass species was historically attributed to the level of these TNC and to their rapid degradation during early post-cutting regrowth (Graber *et al.*, 1927; Granfield, 1943; Habben and Volenec, 1990; Volenec *et al.*, 1996). Nevertheless, results from field studies focusing on alfalfa genotypes differing by their root TNC concentrations (Volenec, 1985; Fankhauser *et al.*, 1989; Avice *et al.*, 1997b) and data obtained by modifications of the cutting frequency applied during summer or fall in alfalfa stands showed a poor relationship between root TNC concentration and shoot spring growth (Edminsten and Wolf, 1988; Sheaffer *et al.*, 1988; Avice *et al.*, 1997b; Dhont *et al.*, 2002).

Experiments using <sup>14</sup>C or <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N labeling have shown that endogenous alfalfa N pools are also largely used to support regrowth, while the endogenous C pools are mainly



used to support respiration of the remaining plant organs during early regrowth (Ta *et al.*, 1990; Ourry *et al.*, 1994; Avice *et al.*, 1996a; Barber *et al.*, 1996). Several studies then focused on the particular role of the different N reserve pools. It has been shown that taproot soluble proteins and, to a lesser extent amino acids, represent the quantitatively most important N reserve pools with more than 50 and 25% of total taproot soluble N compounds, respectively (Hendershot and Volenec, 1993b; Meuriot *et al.*, 2003, 2004). Moreover, four vegetative storage proteins (15, 17, 32 and 57 kD VSPs), which can together represent up to 40% of taproot total soluble proteins, were identified according to their important role in N storage (Hendershot and Volenec, 1993a; Avice *et al.*, 1996b; Gana *et al.*, 1998). 10 days after shoot removal, they are about two times more mobilized than the total soluble proteins, and they are re-accumulated until the end of regrowth (Avice *et al.*, 1996b). Using various management treatments applied under field conditions such as the cutting interval in summer (Avice *et al.*, 1997b), the timing of fall harvest (Dhont *et al.*, 2003; Haagensohn *et al.*, 2003), or the utilization of cultivars of contrasting growth potential (Cunningham and Volenec, 1998; Bouchart *et al.*, 1998; Dhont *et al.*, 2003), it has been shown that the concentrations in soluble proteins (and more specifically VSPs) are closely related to shoot regrowth in forage legumes such as alfalfa or white clover.

However, the contribution of taproot amino acids, soluble proteins and VSP to regrowing shoot C-N supply remains fairly unclear and it was long reported that the alfalfa cutting intensity also have decisive impacts on plant regrowth potential (Kust and Smith, 1961; Brink and Marten, 1989). Stubble leaves (through their residual leaf area) and stubble stems (through their C-N reserves and the number of intact meristematic tissues), which are strongly modified by the cutting intensity, may modulate the contribution of taproot C-N reserves to the regrowth of new photosynthetic shoot tissues. For example, the stubble leaves seem to rejuvenate during early post-cutting regrowth, and may serve as a source of C, together or instead of taproot C reserves, to sustain recovery from defoliation (Hodgkinson *et al.*, 1972; Hart *et al.*, 1978). However, most agronomical studies only reported the impact of the stubble leaves through contrasting cutting heights, and showed that an increased cutting height should be associated with a increased cutting frequency in order to avoid a reduced forage productivity and culture perennity (Langer and Steinke, 1965; Smith and Nelson, 1967; Brink and Marten, 1989). To our knowledge, only one study indirectly reported that the specific removal of stubble leaves induces a parallel reduction of forage productivity in alfalfa, but failed to explain their particular role (Quinn and Hall, 1996). Overall results show that the contribution of stubble tissues to the regrowing shoot regrowth should be re-evaluated

at the whole plant level, with particular attention to their influence on taproot C-N mobilization/ re-accumulation dynamics.

The main objective of this experiment was to study the role of stubble C-N reserves and / or residual leaf area on the contribution of taproot C-N reserves to the regrowing shoot in *Medicago sativa* L. after defoliation. The responses of plants differing by their initial level of C-N reserves to contrasting cutting heights and residual leaf areas were studied on shoot regrowth potential, biomass partitioning, and both stubble and taproot C-N reserves dynamics in non-nodulated alfalfa regrowing under non-limiting growth conditions. To our knowledge, the combined effects of overall treatments at the whole plant level was partly or even never found in literature, and then constitutes the core of this work.

## **C.4- Material and methods**

### **C.4.1 Plant material**

Seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Lodi) were sown on a synthetic substrate (Oasis pinpot growing medium, Agrimedia, France) in January 2001 and January 2002. Once the primary trifoliolate leaves appeared, seedlings were transplanted to plastic pots filled with perlite and irrigated three times a week with 300 mL of a nutrient solution supplemented with 2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  in order to repress nodule formation (Kim *et al.*, 1991). Plants were grown under greenhouse conditions during 75 days with a thermoperiod of 20°C (day) and 18°C (night), and a photoperiod of 16 h (day) and 8 h (night). Natural light was supplemented with Neon tubes (Philips TLD 36W) supplying an average PAR (Photosynthetic Active Radiations) of  $150 \pm 20 \mu\text{moles photons. m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  at the top of the canopy. The plants were then cut at 6 cm above their crown level. After 40 days of regrowth (i.e. 115 days after sowing), plants were submitted to a first sampling (taproot diameter at crown level of  $0.8 \pm 0.1$  mm and average canopy height of  $55.0 \pm 5.0$  cm), which allowed to obtain plants with similar morphological traits. The plants were cut a second time at 6 cm and were transferred to hydroponic conditions in 8 L plastic containers of continuously aerated nutrient solution in a growth chamber until the end of the experiment. The photothermoperiodic conditions remained unchanged but light was then provided with sodium high pressure lamps (Phytoclaude 400W) supplying an average PAR of  $300 \pm 25 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  15 cm at the top of the canopy. The composition of the nutrient solution remained also unchanged but 2.0 mM  $\text{KNO}_3$  were now supplied to prevent any putative ammonium toxicity in the flowing solution. Fifty milliliters of 1 mM  $\text{CaCO}_3$  were also added in each 8L container to prevent pH variation in the nutrient solution, which was renewed every 3 days. Plants were then finally (by day 130) submitted to two levels of N availabilities, two cutting heights, and two residual leaf areas (RLA) treatments as described below.

### **C.4.2 Application of different N supplies, cutting heights, and leaf areas treatments**

During the first 15 days following shoot removal, there is an extensive mobilization of taproot organic reserves (and especially VSPs), which slowly re-accumulate thereafter (Avicé *et al.*, 1996a, b). Additionally, Meuriot *et al.* (2003) recently reported that taproot N reserves

of alfalfa plants grown under hydroponic conditions are quantitatively and qualitatively modified by the mineral N concentration in the nutrient solution. According to these previous results, two different levels of N feeding were supplied during 21 days after the first 15 days of post-cutting regrowth (*i.e.* 130 to 151 days after sowing) in order that plants accumulate contrasting initial N reserve levels. During this 21 days period (in the phase of N reserve re-accumulation), the plants of year 2001 were supplied with 1 mM KNO<sub>3</sub> (*i.e.* plants corresponding to high N treatment; **HN**) and the plants of year 2002 with 0.2 mM KNO<sub>3</sub> (Low N treatment; **LN**). Additionally, internal control plants were grown each year (4 replicates of 4 plants grown in 2001 with 0.2 mM KNO<sub>3</sub>, and with 1.0 mM KNO<sub>3</sub> in 2002). No significant year-to-year differences on the perennial organ biomass production and partitioning, N content, taproot soluble protein and VSP content was reported, according to a Student's *t*-test with  $\alpha = 5\%$ .

Finally, after 21 days of treatment (*i.e.* 151 days after sowing), the plants were submitted to a second sampling: taproot diameter at crown level of  $0.8 \pm 0.1$  mm, average canopy height of  $55.0 \pm 5.0$  cm, and stubble stems number of  $8.0 \pm 1.0$ . The experiments were then undertaken with 3 replicates of 3 plants at each date. HN and LN plants were cut at **6** or **15** cm above their crown level. Moreover, half of the plants cut at 15 cm height were totally defoliated (*i.e.* plants without residual leaf area; RLA = **0%**) and half were not defoliated (RLA = 100%). This treatment allowed to have plants with contrasted initial RLAs, which could not have been achieved with 6 cm height cut plants with decreased RLAs. Plants of all treatments (**15HN**, **15HN0**, **6HN**, **15LN**, **15LN0** and **6LN**) were then transferred with the same photothermoperiodic (20°C day / 18°C night, with 16 h day / 8 h night) conditions into a growth cabinet (E15, Conviron, Winnipeg, Canada) modified for controlled CO<sub>2</sub> atmosphere and hygrometry ( $400 \pm 10$  ppm, Relative Humidity of  $85 \pm 5\%$ ). Plants were grown during 28 days (*i.e.* 151 to 179 days after sowing) on a nutrient solution containing 1 mM K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> labelled with 2.61 atom % <sup>15</sup>N excess to allow determination of N uptake and analysis of N assimilation and partitioning within the plant.

#### **C.4.3 Tissue sampling**

Plants were harvested on the day of cutting (Day 0; *i.e.* 151 days after sowing) and after 3, 6, 9, 13 and 28 days of regrowth. The root system was carefully washed with cold demineralised water. Harvested plants were then separated into lateral roots, taproots, stubble leaves and stems (*i.e.* remaining leaves and stems present at Day 0), regrowing leaves and

stems, and flowers (the sum of these three tissues then represents the regrowing shoot). Fresh weight of each sample was determined and the residual leaf area (RLA) of the stubble and the leaf area of the regrowing leaves (LA) were also immediately measured after harvest with a LI-3100 area meter (LI-COR *inc.*, Lincoln, Nebraska, USA). All samples were then frozen in liquid N<sub>2</sub>, ground to fine powder after freeze-drying, and stored under vacuum with desiccant for further C and N extraction and analysis.

#### **C.4.4 Extraction and analysis of C and N pools**

C and N pools were extracted by suspending 200 mg of ground, freeze-dried sample at 4°C with 2 mL of extraction buffer (pH 7) containing 100 mM Sodium-Phosphate in 14 mL Falcon tubes (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France), according to the protocol described by Meuriot *et al.* (2004). After centrifugation (3200 x g, 4°C, for 10 min), the pellet was re-extracted in 2 mL of extraction buffer and the two supernatants were pooled after centrifugation. The resulting supernatant (called S1) was completed to 4 mL with extraction buffer and was used for biochemical quantification of sucrose, nitrate, amino acids, soluble proteins and VSPs. The pellet (called P1) was kept at -20°C for further starch analysis.

Sucrose was analysed according to the protocol described by Birnberg and Brenner (1984) with sucrose phosphorylase (SIGMA, Saint Quentin Fallavier, France) at pH = 7.0. Nitrate was analysed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) using the DIONEX AI 450 system (DIONEX *corp.*, Sunnyvale, CA, USA) and total amino acids were analysed by spectrophotometry at 570 nm thanks to a colorimetric reaction with ninhydrine (80 mg SnCl<sub>2</sub> in 50 mL citrate buffer at 200 mM, pH 5.0, mixed with 2 g ninhydrine in 50 mL dimethyl sulfoxide). Total Soluble proteins were analysed after protein-dye binding (Bradford, 1976) and an ELISA procedure was performed for immuno-quantification of VSPs (32, 19 and 15 kDa), as described in details by Noquet *et al.* (2001).

Finally, the P1 pellet was extracted with 12 mL of 95% ethanol at 80°C for 15 min, and was centrifuged at 10000 x g, 4°C, for 10 min. The resulting pellet was air-dried and extracted with 2.5 mL of 0.2 N KOH at 95°C for 30 min. Total starch was then analyzed thanks to an enzymatic method using the Megazyme Total Starch kit and further spectrophotometric analysis at 510 nm (Megazyme International, Wicklow, Ireland).

#### **C.4.5 Calculation of N allocation within the plant**

N content and  $^{15}\text{N}$  abundance in all organs were measured in continuous flow using a C/N analyzer linked to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Roboprep CN and mass spectrometer, PDZ Europa Scientific Ltd., Crewe, UK). Natural  $^{15}\text{N}$  abundance ( $0.3663\% \pm 0.0004$ ) of atmospheric  $\text{N}_2$  was used as reference for  $^{15}\text{N}$  analysis. As already described in several studies (Avice *et al.*, 1996b; Meuriot *et al.*, 2004), the allocation within the different plant organs of the N derived from the mineral N taken up ( $\text{N}_{\text{Exo}}$ ) or from the N reserves ( $\text{N}_{\text{Endo}}$ ; *i.e.* N present at Day 0) was calculated as follows:

$$\text{N}_{\text{Exo}} = \text{N}_{\text{T}} * (\text{E} (\%) / \text{E}_{\text{S}} (\%))$$

where  $\text{N}_{\text{T}}$  is organ total nitrogen ( $\text{mg N.plant}^{-1}$ ),

E is atom %  $^{15}\text{N}$  excess,

$\text{E}_{\text{S}}$  is nutrient solution atom %  $^{15}\text{N}$  excess (2.61 %),

and where  $\text{N}_{\text{T}} = \text{N}_{\text{Endo}} + \text{N}_{\text{Exo}}$  ( $\text{mg N.plant}^{-1}$ )

The contribution of reserve-derived N to the regrowing shoot N supply during alfalfa post-cutting regrowth given in Fig. 2 was then calculated as follows:

$$\% \text{ contribution} = ((\text{N}_{\text{T}} - \text{N}_{\text{Exo}}) / \text{N}_{\text{T}}) * 100$$

#### **C.4.6 Statistical analysis**

The experiments were performed with 3 replicates (each replicate containing 3 plants) and the results then represented the mean  $\pm$  S.E. for  $n = 3$ . The effects of the treatments were studied by means comparison using Student's *t*-test with the Stat-ITCF software (Stat ITCF, v5.1, 1987, Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Paris, France). Newman and Keuls tests (Table 2), as well as step-by-step regressions, were also performed by the Stat-ITCF software. For the step-by-step regressions, the model seeks the factor responsible for the largest proportion of the variance of the studied parameter, calculates a  $r^2$  and adds a second factor that further explain the variance. A new  $r^2$  is then recalculated with two factors and so on with the remaining tested factors. This procedure allows a classification of the importance of the studied factors based on their significance in explaining the variance of the measured factors.

**Table II.C.1 :** Effect of the N supply, cutting height and residual leaf area on plant dry matter, stubble, taproot and lateral roots dry matters observed on the day of cutting (Day 0). Results are given as the mean  $\pm$  S.E. for each variable (N supply, cutting height or residual leaf area) and for  $n = 3$ . Values followed by a symbol are significantly different, according to Student's  $t$ -tests with  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

**Tableau II.C.1 :** Effet de l'alimentation azotée, de la hauteur de coupe et de la surface foliaire résiduelle sur la biomasse total résiduelle et la biomasse des chaumes, du pivot et des racines latérales observées au jour de coupe (J0). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  E.S pour chaque variable (alimentation N, hauteur de coupe et surface foliaire résiduelle), et pour  $n = 3$ . Les valeurs suivies par un symbole sont significativement différentes selon un test  $t$  de student avec  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) et  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

Treatment	N supply		Cutting Height		Residual Leaf Area	
	HN	LN	15 cm	6 cm	100%	0%
<b>Plant DM</b>	4.87 $\pm 0.22$	3.45 *** $\pm 0.22$	4.42 $\pm 0.17$	3.91 $\pm 0.30$	4.40 $\pm 0.17$	3.93 $\pm 0.30$
<b>Stubble DM</b>	1.30 $\pm 0.11$	0.98 * $\pm 0.11$	1.51 $\pm 0.08$	0.76 *** $\pm 0.15$	1.37 $\pm 0.09$	0.90 * $\pm 0.15$
<b>Taproot DM</b>	1.77 $\pm 0.11$	1.39 * $\pm 0.11$	1.52 $\pm 0.09$	1.63 $\pm 0.15$	1.58 $\pm 0.09$	1.58 $\pm 0.15$
<b>Lateral root DM</b>	1.80 $\pm 0.06$	1.08 *** $\pm 0.06$	1.37 $\pm 0.05$	1.52 $\pm 0.08$	1.44 $\pm 0.04$	1.44 $\pm 0.08$

## **C.5- Results**

### **C.5.1 Initial biomass and C-N reserve levels**

#### ***Initial biomass partitioning and residual leaf area:***

The reduction of the N supply significantly decreased the remaining plant biomass at the day of cutting (Day 0; Table II.C.1). This decline was mainly due to the strong decrease of root biomass (lateral roots and taproot). For example, taproot biomass was reduced from  $1.78 \pm 0.12$  for 15HN plants to  $1.28 \pm 0.17$  g.plant<sup>-1</sup> for 15LN plants (Fig. II.C.1). Irrespective of the cutting height, the reduction of the N supply also significantly reduced the remaining shoot biomass (Table II.C.1) but strongly increased the residual leaf area (RLA) in the meanwhile (Table II.C.2). The greatest RLA was thus observed for 15LN plants with  $78.6 \pm 10.7$  cm<sup>2</sup>.plant<sup>-1</sup> against  $23.9 \pm 2.5$  cm<sup>2</sup>.plant<sup>-1</sup> for 15HN plants (Table II.C.2).

The reduction of both cutting height and initial residual leaf area significantly decreased the stubble shoot biomass at Day 0 (Table II.C.1). The stubble leaves dry matter decreased from  $0.28 \pm 0.01$  to  $0.13 \pm 0.03$  g.plant<sup>-1</sup> for 15LN and 6LN plants, respectively, and stubble leaves represented 20% of stubble stems dry matter in average for overall treatments (except for 6LN where it declined to 13%) at Day 0 (data not shown). Furthermore, the reduction of the cutting height also strongly decreased the RLA of about four times in average at Day 0 (Table II.C.2).

#### ***Initial non-structural carbohydrates in stubble and taproot***

The taproot is the main storage organ of C reserve compounds, and starch represents the most important C reserve pool, far away beyond sucrose (Table II.C.2), or even glucose or fructose which both reached  $5.1 \pm 0.6$  mg.plant<sup>-1</sup> in average (data not shown). The taproot starch content was more than 3 and 7 fold higher in average for overall treatments, when compared to taproot sucrose and stubble starch contents, respectively. Therefore, the changes of the starch content and its contribution to shoot C supply will then solely be presented in this experiment.

The reduction of the N supply 21 days before cutting did not lead to a significant modification of overall C reserves within the taproot at Day 0 (Table II.C.2). Taproot starch and sucrose contents thus averaged  $214.2 \pm 16.2$  and  $58.8 \pm 8.3$  mg.plant<sup>-1</sup>, respectively. However, the reduction of the mineral N availability, as well as the cutting height, modified starch and sucrose contents within the stubble tissues. Compared to HN plants, both starch



**Table II.C.2:** Initial (Day 0) residual leaf area (RLA) and main alfalfa soluble C and N pools for both initial N levels (High N; **HN** or Low N; **LN**) and both cutting heights (**6** or **15** cm) treatments within the stubble (leaves + stems) and the taproot. Results are given as the mean  $\pm$  S.E. for  $n = 3$ . Values followed by a letter (a, b, c, or d) are significantly different, according to Newman and Keuls tests with  $p < 0.05$ .

**Tableau II.C.2:** Surface foliaire résiduelle et principales fractions C et N initiales (J0) de la luzerne pour deux niveaux de réserves N initiales (N fort; **HN** ou N faible; **LN**) et deux hauteurs de coupe (6 et 15 cm) dans les chaumes (tiges et feuilles) et dans le pivot. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  E.S pour  $n = 3$ . Les valeurs suivies par une lettre (a, b, c ou d) sont significativement différentes selon un test de Newman et Keuls avec  $p < 0.05$ .

<b>Day 0</b>		<b>15HN</b>	<b>6HN</b>	<b>15LN</b>	<b>6LN</b>
	<b>RLA</b> (cm <sup>2</sup> .plant <sup>-1</sup> )	23.89 $\pm$ 2.46 <sup>b</sup>	6.55 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>	78.63 $\pm$ 10.72 <sup>c</sup>	19.02 $\pm$ 5.25 <sup>b</sup>
	<b>Starch</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	14.31 $\pm$ 3.94 <sup>a</sup>	21.51 $\pm$ 2.66 <sup>b</sup>	57.78 $\pm$ 9.17 <sup>d</sup>	36.82 $\pm$ 7.25 <sup>c</sup>
	<b>Sucrose</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	15.84 $\pm$ 2.52 <sup>b</sup>	9.16 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	25.08 $\pm$ 0.74 <sup>d</sup>	19.55 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>
<b>Stubble</b> (leaves+stems)	<b>Nitrate</b> (mg N.plant <sup>-1</sup> )	1.88 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	1.36 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	0.76 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	<b>Amino acids</b> ( $\mu$ mol.plant <sup>-1</sup> )	150.35 $\pm$ 11.70 <sup>d</sup>	50.02 $\pm$ 9.25 <sup>b</sup>	65.26 $\pm$ 2.94 <sup>c</sup>	28.76 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>
	<b>Soluble proteins</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	28.25 $\pm$ 1.52 <sup>c</sup>	8.42 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	10.08 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	4.01 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
<b>Taproot</b>	<b>Starch</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	193.46 $\pm$ 36.94 <sup>a</sup>	232.38 $\pm$ 51.21 <sup>a</sup>	212.41 $\pm$ 44.44 <sup>a</sup>	218.57 $\pm$ 34.45 <sup>a</sup>
	<b>Sucrose</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	49.07 $\pm$ 12.05 <sup>a</sup>	54.93 $\pm$ 8.65 <sup>a</sup>	67.29 $\pm$ 14.44 <sup>a</sup>	63.83 $\pm$ 12.59 <sup>a</sup>
	<b>Nitrate</b> (mg N.plant <sup>-1</sup> )	0.75 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	<b>Amino acids</b> ( $\mu$ mol.plant <sup>-1</sup> )	333.02 $\pm$ 32.89 <sup>b</sup>	271.07 $\pm$ 43.15 <sup>b</sup>	102.36 $\pm$ 7.51 <sup>a</sup>	72.63 $\pm$ 15.85 <sup>a</sup>
	<b>Soluble proteins</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	88.35 $\pm$ 3.89 <sup>b</sup>	81.58 $\pm$ 4.99 <sup>b</sup>	34.89 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	33.57 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>
	<b>VSP</b> (mg.plant <sup>-1</sup> )	15.37 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>	12.46 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	17.00 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	16.58 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>

and sucrose contents significantly increased for LN plants. For example, 15LN stubble starch content increased four times when compared to 15HN plants.

### ***Initial nitrogen reserves in stubble and taproot***

Irrespective of the initial N status, the taproot is also the main N storage organ of alfalfa, with the greatest amino acids and soluble proteins contents at Day 0 (Table II.C.2). The taproot amino acid and soluble protein contents were 2 and 4 times more important in average than within the stubble, respectively. Moreover, nitrate was the lowest N pool within both tissues with  $0.87 \pm 0.39$  mg N.plant<sup>-1</sup> for overall treatments. Nitrate was therefore considered to be of neglectable importance for N supply in this experiment in regards to other N pools.

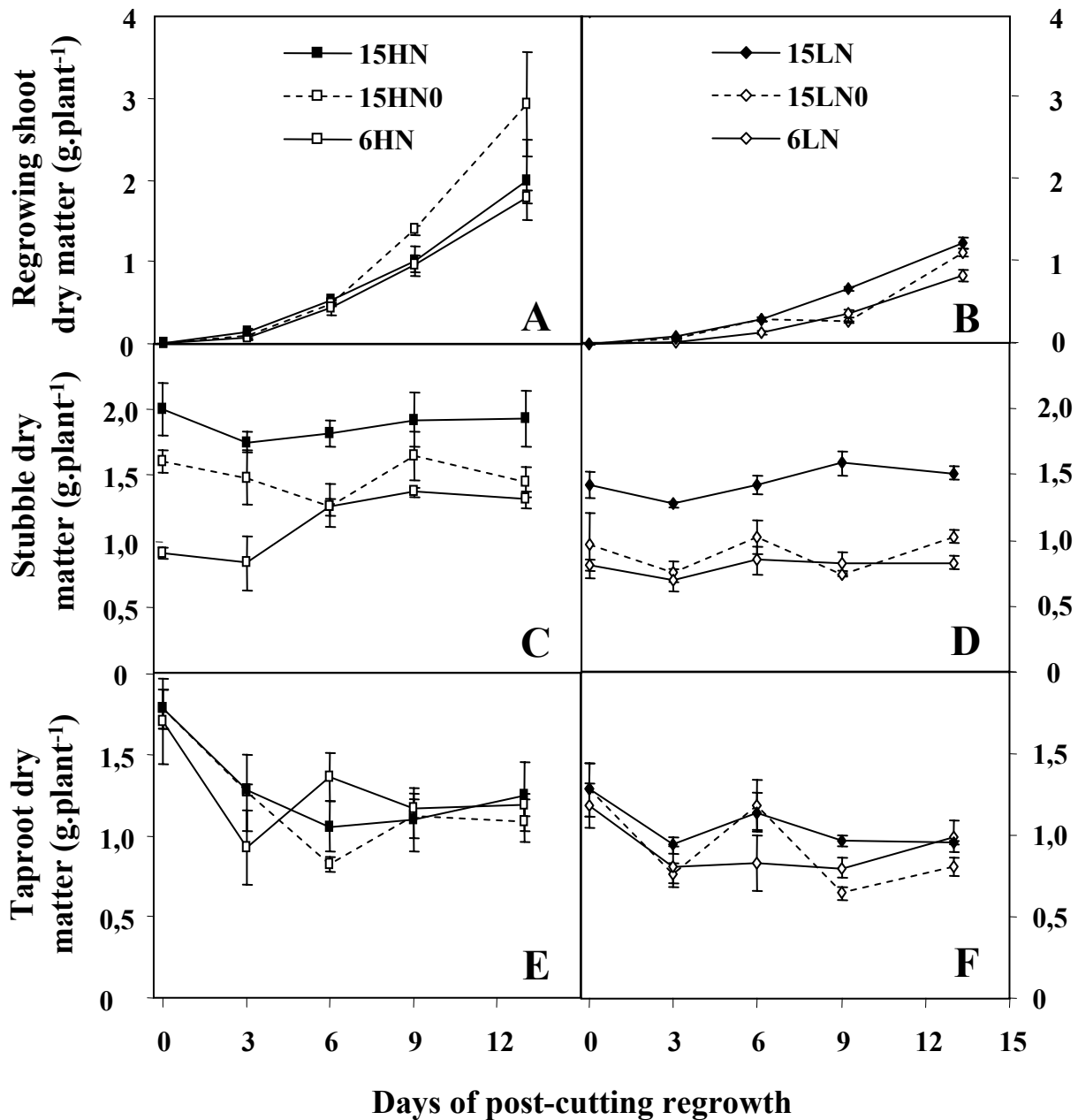
The reduction of the N supply strongly decreased nitrate, amino acids and soluble proteins contents in both taproot and stubble tissues at Day 0 (Table II.C.2). Taproot soluble protein contents reached  $84.9 \pm 4.8$  mg.plant<sup>-1</sup> in average for HN plants against only  $34.2 \pm 0.9$  mg.plant<sup>-1</sup> for LN plants while taproot VSP contents remained unchanged. In average, VSPs then represented about 50% of total soluble proteins within the taproot for LN plants versus only 16% for HN plants.

As expected, the reduction of the cutting height from 15 to 6 cm, (which is only affecting the stubble tissues) also decreased amino acid and soluble protein contents within the stubble by more than two times in average (Table II.C.2).

## **C.5.2 Regrowth potential and C-N reserves contribution**

### ***Regrowth potential (regrowing and remaining tissues):***

During early regrowth (between Day 0 and Day 13), the regrowth potential was mainly affected by the initial N status (Fig. II.C.1). The regrowing shoot biomass was more than 2 times increased in average for HN plants since Day 6, when compared to LN plants (Fig. II.C.1A and B). Neither the cutting height nor the stubble defoliation at Day 0 induced significant differences on the regrowing and remaining tissues biomass patterns. The stubble biomass remained fairly constant (Fig. II.C.1C and D), whereas the taproot biomass significantly decreased of more than 25% between Day 0 and Day 6 (Fig. II.C.1E and F). Due to their highest initial taproot biomass, the decrease of taproot DM was two times more



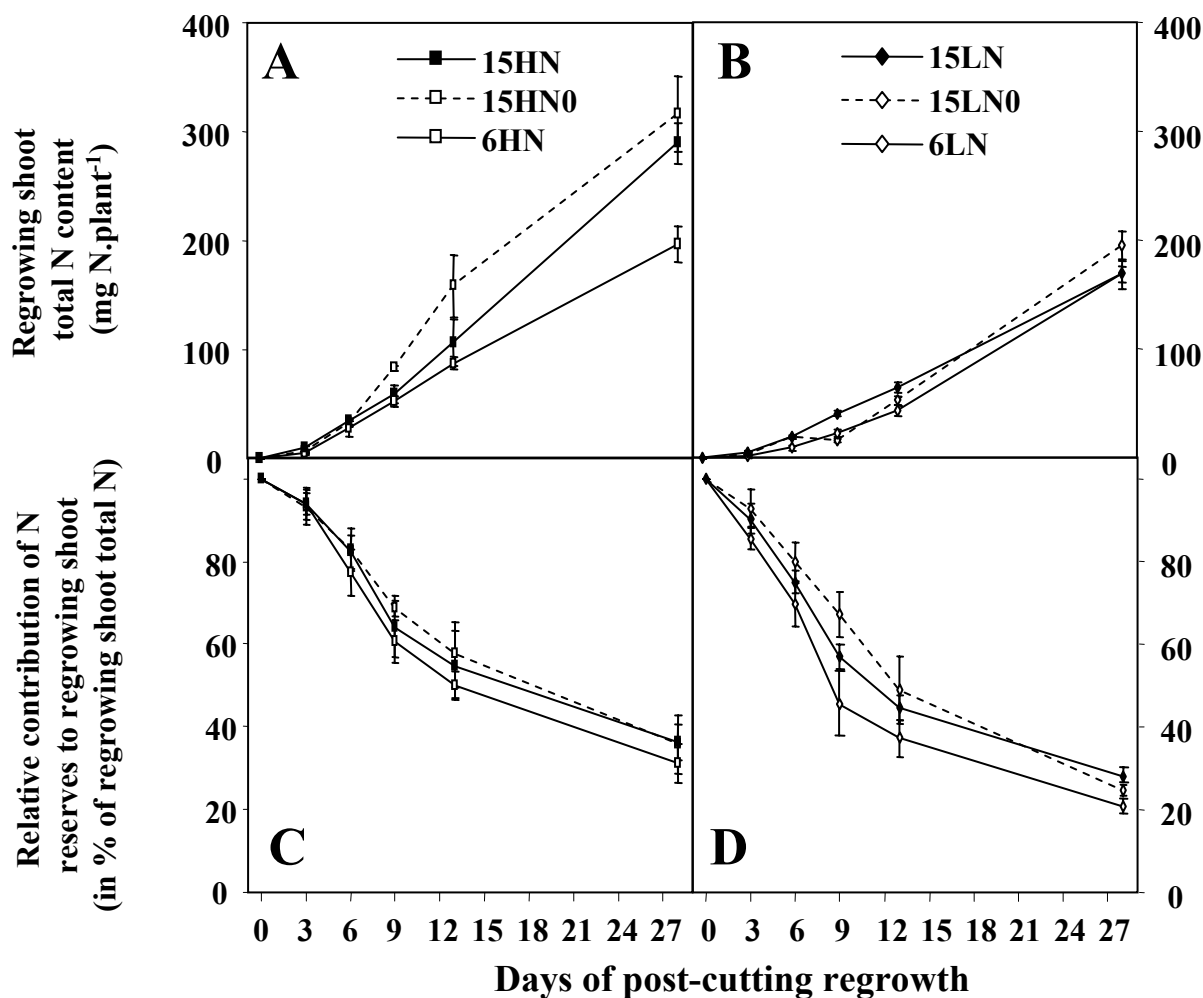
**Figure II.C.1:** Dry matter changes of regrowing shoot (sum of regrowing leaves and stems; **A**, **B**), stubble (sum of remaining leaves and stems at Day 0; **C**, **D**) and taproot (**E**, **F**) after 0, 3, 6, 9 and 13 days of alfalfa post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (High N; **HN** or Low N; **LN**), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; **0**) or not. Vertical bars indicate ± S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.C.1:** Evolution de la matière sèche des parties aériennes en croissance (**A**, **B**), des chaumes (**C**, **D**) et du pivot (**E**, **F**) après 0, 3, 6, 9 et 13 jours de repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (N fort; **HN** ou N faible; **LN**), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; **0**) ou non. Les barres verticales représentent ± E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

**Table II.C.3 :** Effect of the N supply, cutting height and residual leaf area on plant total dry matter, and stubble, taproot and lateral roots dry matters observed at the end of the experiment (Day 28). Results are given as the mean  $\pm$  S.E. for each variable (N supply, cutting height or residual leaf area) and for  $n = 3$ . Values followed by a symbol are significantly different, according to Student's  $t$ -tests with  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$ (\*\*) or  $p < 0.001$ (\*\*\*).

**Tableau II.C.3 :** Effet de l'alimentation azotée, de la hauteur de coupe et de la surface foliaire résiduelle sur la biomasse total de la plante, et sur la biomasse des parties aériennes en repousse, des chaumes, du pivot et des racines latérales observées à la fin de l'expérimentation (J28). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  E.S pour chaque variable (alimentation N, hauteur de coupe et surface foliaire résiduelle), et pour  $n = 3$ . Les valeurs suivies par un symbole sont significativement différentes selon un test  $t$  de student avec  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) et  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Treatment	N supply		Cutting Height		Residual Leaf Area	
	HN	LN	15 cm	6 cm	100%	0%
<b>Plant total DM</b>	10.62 $\pm 0.89$	7.80 *** $\pm 0.89$	12.04 $\pm 0.69$	8.32 ** $\pm 1.19$	10.11 $\pm 0.69$	10.26 $\pm 1.19$
<b>Regrowing shoot DM</b>	6.22 $\pm 0.41$	4.32 ** $\pm 0.41$	5.63 $\pm 0.31$	4.90 * $\pm 0.35$	4.87 $\pm 0.31$	5.67 $\pm 0.55$
<b>Stubble DM</b>	0.93 $\pm 0.08$	0.58 * $\pm 0.23$	2.80 $\pm 0.26$	0.65 ** $\pm 0.45$	1.95 $\pm 0.26$	1.49 $\pm 0.45$
<b>Taproot DM</b>	1.57 $\pm 0.11$	1.29 * $\pm 0.11$	1.69 $\pm 0.08$	1.18 ** $\pm 0.14$	1.53 $\pm 0.08$	1.34 $\pm 0.15$
<b>Lateral root DM</b>	1.90 $\pm 0.22$	1.60 $\pm 0.22$	1.91 $\pm 0.17$	1.58 $\pm 0.30$	1.75 $\pm 0.17$	1.74 $\pm 0.30$



**Figure II.C.2:** Changes in total regrowing shoot N content (A, B) and in relative contribution of initial N reserves (*i.e.* N present at Day 0; C, D) to the regrowing shoot during post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (High N; HN or Low N; LN), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; 0) or not. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.C.2:** Evolution des quantités d'azote total des parties aériennes en croissance (A, B) et de la contribution relative des réserves azotées initiales (N présent à J0; C, D) à ces organes au cours de la repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (N fort; HN ou N faible; LN), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; 0) ou non. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

pronounced for HN plants than for LN plants between Day 0 and Day 13 ( $-0.6 \pm 0.1$  vs  $-0.3 \pm 0.1$  g.plant<sup>-1</sup>, respectively).

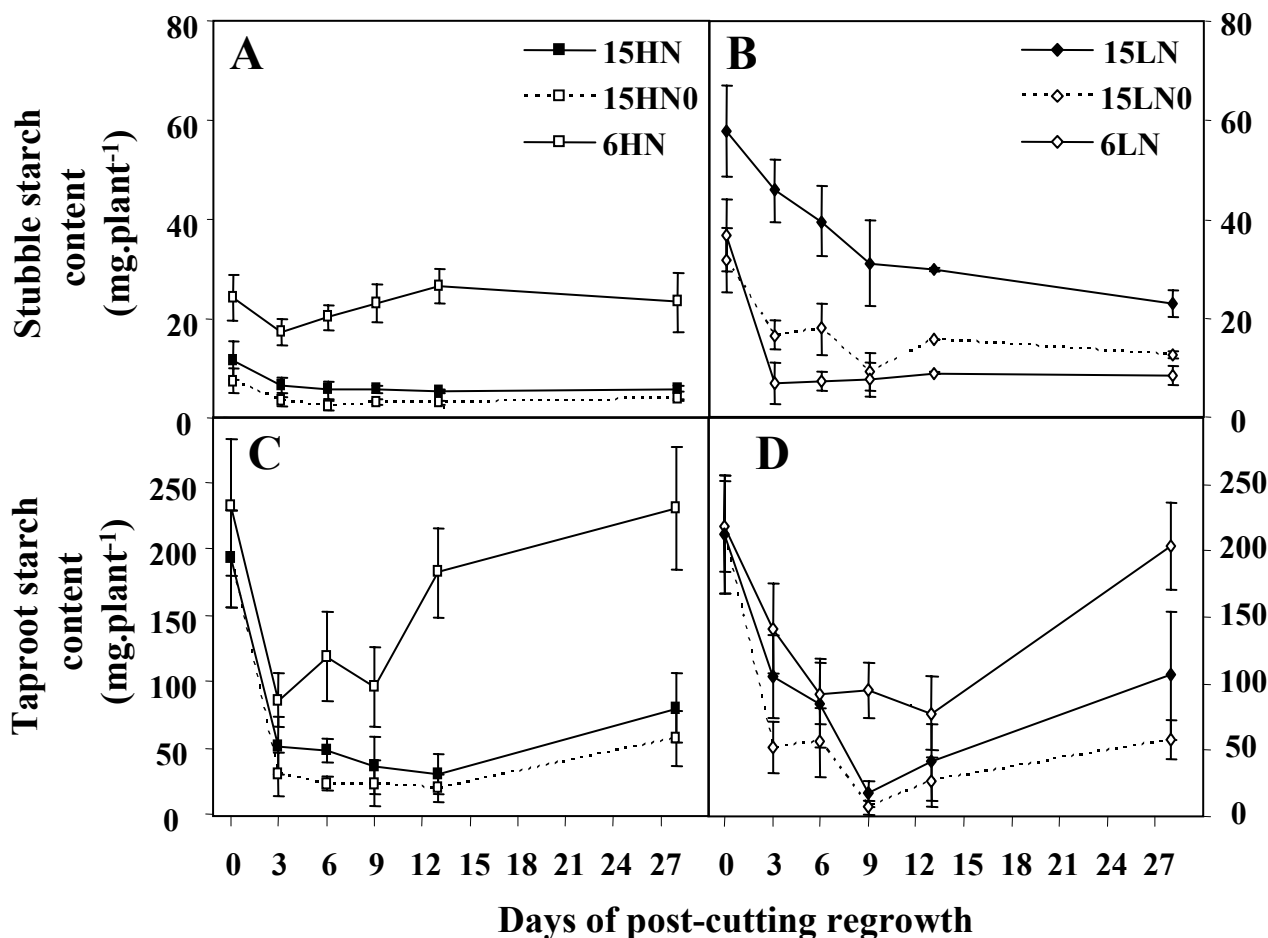
At the end of the regrowth under non-limiting N conditions (*i.e.* Day 28), a step-by-step regression analysis revealed that the initial N status and the cutting height were the two determining variables of regrowing shoot DM (Table II.C.3). No significant effect of the residual leaf area could be highlighted, even on the other tissues like stubble or taproot. The initial N status was responsible for approximately 60% of the variance for the regrowing shoot biomass, against solely 15.5% for the cutting height.

Compared to 15HN plants, the stubble and the taproot dry matters were reduced of approximately 76 and 30% for 6HN plants, against solely 37 and 18% for 6LN plants between Day 0 and Day 28, respectively (Table II.C.1 and II.C.3). This biomass decrease of the main C-N storage organs of alfalfa (*i.e.* stubble and taproot) was thus approximately two times more accentuated for 6 cm height cut plants than for LN plants, which is probably indicating a greater C-N reserve mobilization during regrowth.

***Total N in regrowing shoot and contribution of initial N reserves:***

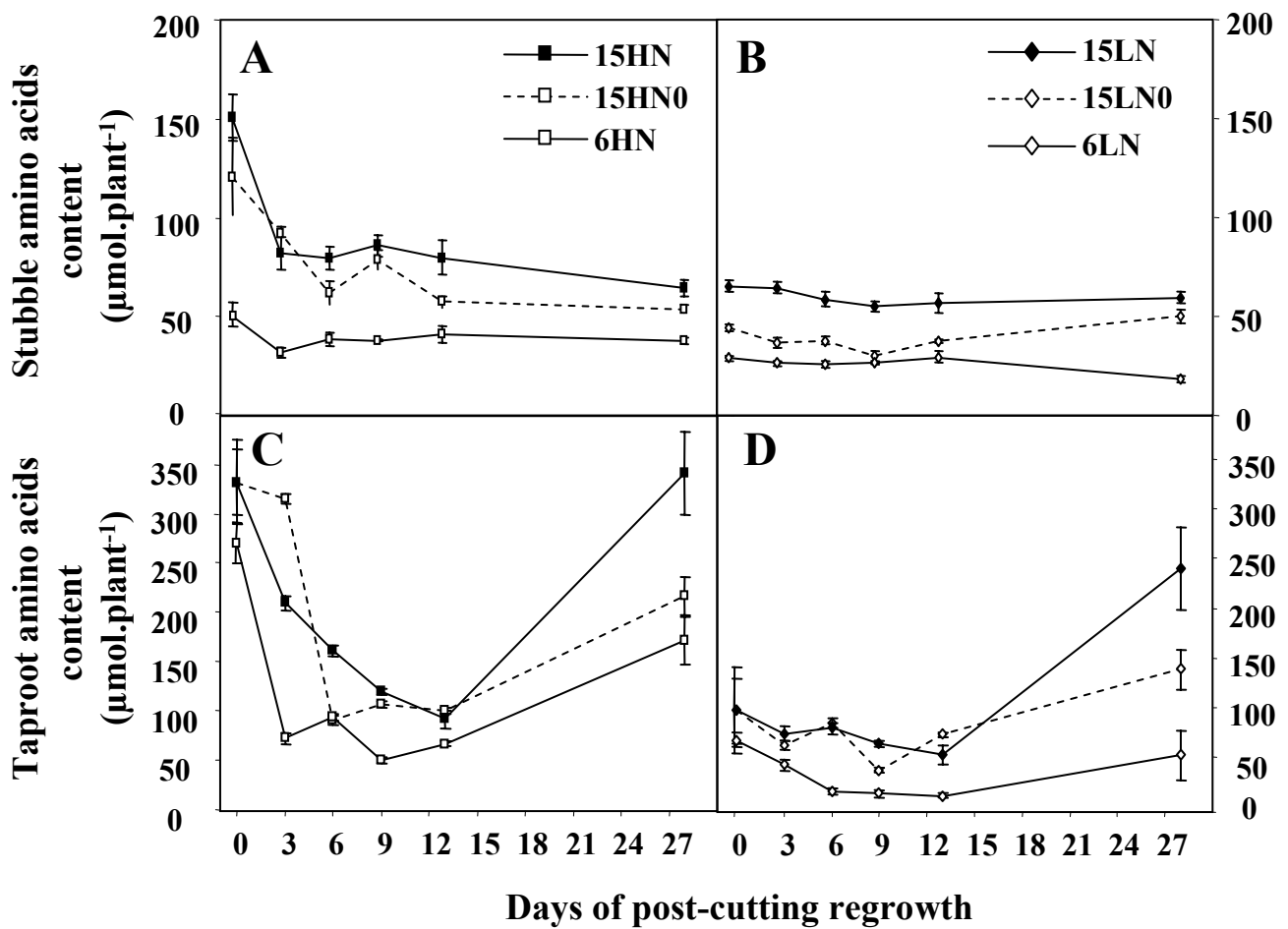
During post-cutting regrowth, non-nodulated alfalfa plants were supplied with a nutrient solution containing 1 mM K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> that allowed a quantification of exogenous N (*i.e.* deriving from mineral N taken up during regrowth) and endogenous N (*i.e.* deriving from initial N reserves) within the different plant organs (Fig. II.C.2).

Thanks to root N uptake and N mobilization, the total N content in the regrowing shoot continuously increased until the end of the experiment, and a step-by-step regression analysis showed that it was mainly modified by the initial N status (67% of the variance at Day 28). HN plants presented highest total N content since Day 3, when compared to LN plants (Fig. 2A and B). As a consequence, 299 mg N.plant<sup>-1</sup> were found in the regrowing shoot of 15 HN plants, against only 178 mg N.plant<sup>-1</sup> in average for 15LN plants at the end of the regrowth (Day 28). The relative contribution of the initial N reserves to the regrowing shoot decreased until the end of the experiment (Fig. II.C.2C and D). Even if more than 50% of the N supplied to the regrowing shoot by Day 13 were still deriving from the initial N reserves for overall treatments, there was a strong decrease of the relative contribution of initial N reserves for LN plants at Day 28, compared to HN plants ( $24.5 \pm 3.6$  vs  $34.5 \pm 2.7$  % in average, respectively). The regrowing shoot N thus mainly relied on the exogenous N for more than 75% for LN plants at this date.



**Figure II.C.3:** Evolution of stubble (A, B) and taproot (C, D) starch contents during post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (High N; HN or Low N; LN), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; 0) or not. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

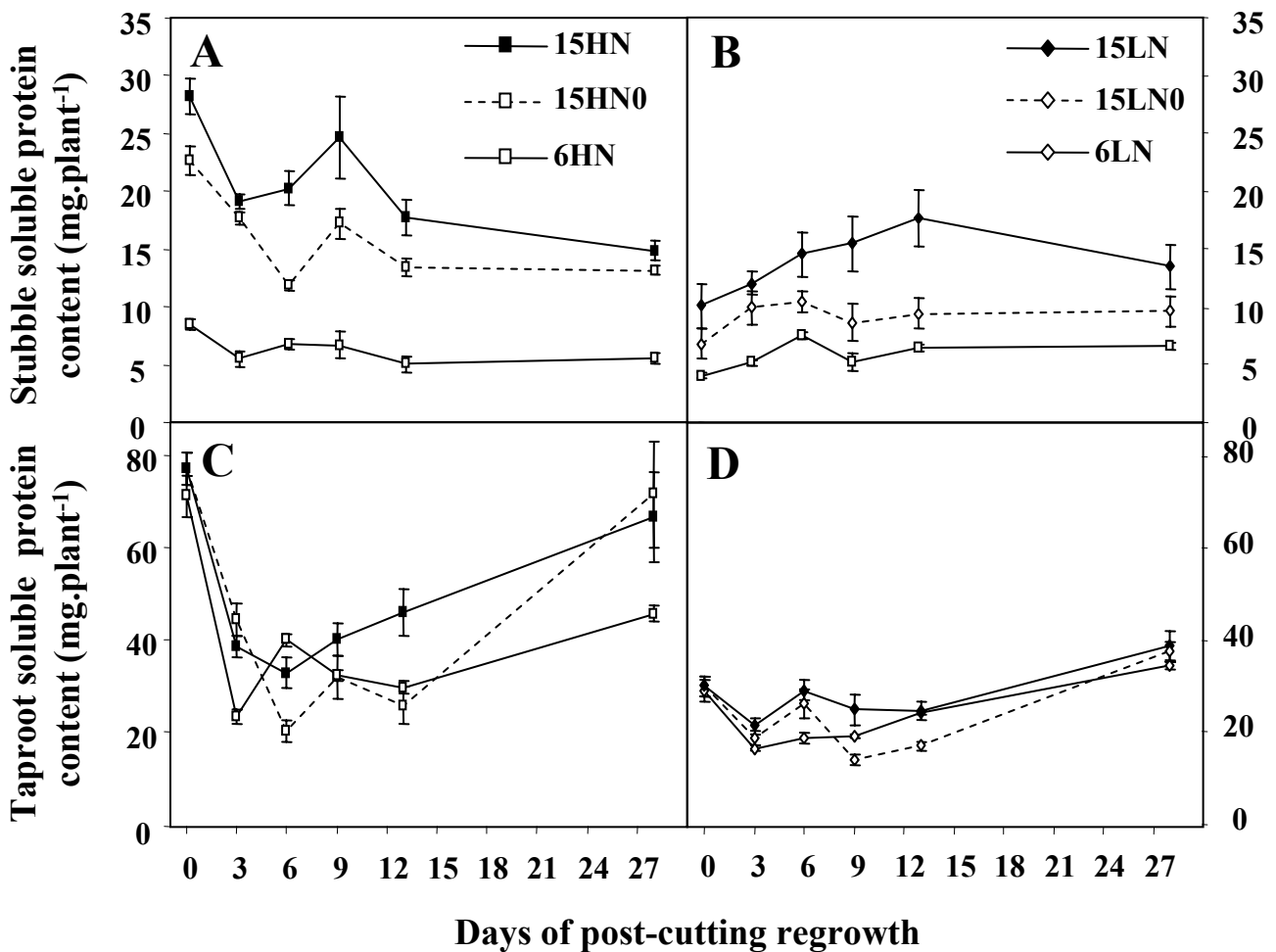
**Figure II.C.3:** Evolution des quantités d'amidon dans les chaumes (A, B) et dans le pivot (C, D) au cours de la repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (N fort; HN ou N faible; LN), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; 0) ou non. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.



**Figure II.C.4:** Changes in amino acids contents in stubble (A, B) and taproot (C, D) during post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (High N; HN or Low N; LN), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; 0) or not. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.C.4:** Evolution des quantités d'acides aminés dans les chaumes (A, B) et dans le pivot (C, D) au cours de la repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (N fort; HN ou N faible; LN), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; 0) ou non. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.





**Figure II.C.5:** Changes in soluble protein contents in stubble (A, B) and taproot (C, D) during post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (High N; HN or Low N; LN), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; 0) or not. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.C.5:** Evolution des quantités de protéines solubles dans les chaumes (A, B) et dans le pivot (C, D) au cours de la repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (N fort; HN ou N faible; LN), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; 0) ou non. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Except for 6HN plants at Day 28, both cutting height and residual leaf area had no significant effect on regrowing shoot total N content during post cutting regrowth (Fig. II.C.2A and B). However, the relative contribution of initial N reserves was significantly ( $p=0.417$ ) decreased for 15LN0 and 6LN plants at the end of the experiment, when compared to 15LN plants. As a consequence, the reduction of the cutting height significantly reduced this contribution from  $28.0\pm 2.6\%$  for 15LN plants to  $20.8\pm 2.0\%$  for 6LN plants.

***Dynamics of stubble and taproot starch contents during regrowth:***

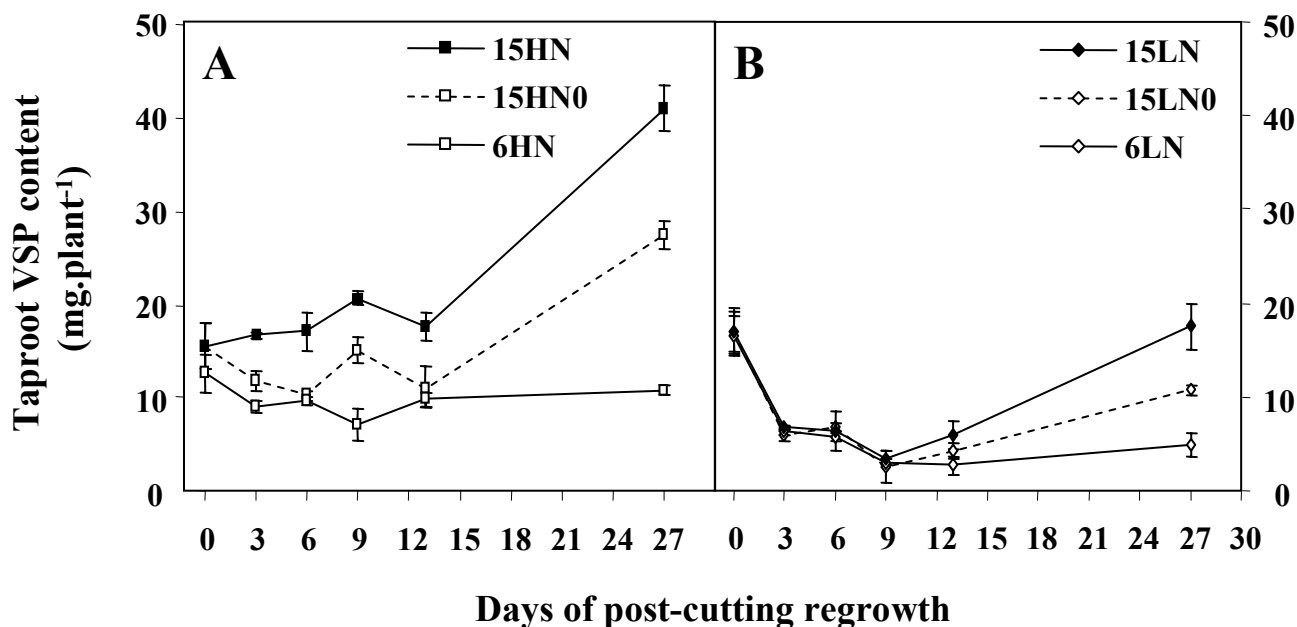
Except for the 6HN stubble starch content, there was an overall extensive starch mobilization in both stubble and taproot tissues during early regrowth (Day 0 to Day 13; Fig. II.C.3). In the stubble, the starch content significantly decreased of about 50% between these two dates for overall treatments, and even 75% for 6LN plants (Fig. II.C.3A and B). However, and due to their highest initial starch content in stubble, the quantitative decrease was five times more accentuated for LN plants than for HN plants.

In the taproot, the starch content strongly decreased between Day 0 and Day 9, with more than 90 % in average for 15HN, 15HN0, 15LN and 15LN0 plants (Fig. II.C.3C and D). Thereafter, starch was re-accumulated within the taproot until the end of the experiment for all treatments, while it remained constant within the stubble. However, and except for the 6 cm-cut plants, the re-accumulation within the taproot was not sufficient to restaure the initial starch content: more than 50% in average of the starch present at Day 0 was lost at Day 28 (Fig. II.C.3).

The reduction of the cutting height strongly modified this mobilization/re-accumulation pattern, whereas the initial residual leaf area had no significant effect. Taproot starch content only decreased of approximately 60% between Day 0 and Day 3 and remained significantly ( $p=0.045$ ) constant until Day 9 for the 6 cm-cut plants. Consequently, the starch re-accumulation observed between Day 13 and Day 28 allowed a full reconstitution of the initial taproot starch content for both 6HN and 6LN plants.

***Dynamics of stubble and taproot amino acid contents during regrowth:***

During early regrowth (and except in the 6LN stubble tissues), there was a large amino acid mobilization in both stubble and taproot tissues for overall treatments (Fig. II.C.4). This mobilization was also quantitatively more pronounced for HN plants: more than 70% of the initial taproot amino acid content was depleted after 13 days of regrowth for HN plants, against only 25% for LN plants. After Day 13, the amino acid content strongly increased



**Figure II.C.6:** Changes in taproot VSP contents during post-cutting regrowth for different combined treatments, with: two cutting heights (6 or 15 cm), two initial N levels (A = High N; HN or B = Low N; LN), and for 15 cm totally defoliated plants (no residual leaf area at Day 0; 0) or not. Vertical bars indicate  $\pm$  S.E. of the mean for  $n = 3$  when larger than the symbol.

**Figure II.C.6:** Evolution des quantités de VSP dans le pivot au cours de la repousse pour différents traitements combinés, avec: deux hauteurs de coupe (6 ou 15 cm), deux statuts azotés initiaux (A = N fort; HN ou B = N faible; LN), et pour des plantes totalement défoliées (pas de surface foliaire à J0; 0) ou non. Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

within the taproot for overall treatments, while it remained fairly constant within the stubble. The taproot amino acid content was more than two times increased at Day 28 for 15LN plants, when compared to Day 0 (Fig. II.C.4D).

The reduction of the cutting height or the initial residual leaf area did not greatly modified the relative amino acid mobilization in both tissues, but significantly reduced the amino acid re-accumulation within the taproot (Fig. II.C.4). For example, the reduction of the cutting height and the initial leaf area reduced the taproot amino acid re-accumulation of more than 62 and 38% in average at Day 28, respectively (Fig. II.C.4C and D). Moreover, the 6 cm-cut plants always presented the lowest amino acids contents during post regrowth within this tissue.

***Dynamics of stubble and taproot soluble protein and VSP contents during regrowth:***

Except in the 6HN stubble, there was a strong decrease of both stubble and taproot soluble protein contents during early regrowth, but for HN plants only (Fig. II.C.5). Soluble protein content thus decreased of more than 40% in average for HN plants in both tissues, while it remained fairly constant for LN plants in the meanwhile. For example, the 6HN taproot soluble protein content decreases from  $71.6 \pm 3.0 \text{ mg.plant}^{-1}$  at Day 0 to  $24.4 \pm 1.7 \text{ mg.plant}^{-1}$  at Day 13. Thereafter, the amount of soluble proteins strongly increased until the end of the experiment for overall treatments, but in the taproot only (Fig. II.C.5C and D). Except for the 6HN plants, this also allowed a complete reconstitution of the initial soluble protein contents between Day 9 and Day 28.

The taproot VSP content kinetics were strongly modified by the initial N status during early post-cutting regrowth (Fig. II.C.6). Unlike soluble proteins, the VSP amounts remained fairly unchanged for HN plants during early post-cutting regrowth (Fig. II.C.6A), while they strongly decreased of more than 65% for LN plants in the meanwhile (Fig. II.C.6B). Thereafter, and except for 6 cm-cut plants, there was a large re-accumulation of VSPs for overall treatments until the end of the regrowth. This re-accumulation was quantitatively more important for HN plants, where the final VSP contents were higher than by Day 0. Irrespective of the initial N reserve status, the initial stubble defoliation strongly limited the VSP re-accumulation pattern of more than 35%, when compared to non-defoliated plants at Day 28 (Fig II.C.6). The reduction of the cutting height also strongly reduced the re-accumulation of VSP of more than 75% in average for both HN or LN plants. As a result, compared to Day 0, the final VSP content remained unchanged for 6HN plants while the it was reduced of more than 70% for 6LN plants. A step-by-step regression analysis realised on

final VSP content reported that approximately 65% of the variance is explained by the initial N status, 21% by the cutting height and 3% by the initial residual leaf area.

## **C.6- Discussion**

Because the initial taproot C-N reserves were reported to be of particular importance for the regrowth potential of alfalfa (Lemaire and Allirand, 1993; Avice *et al.*, 1996a, Hendershot and Volenec, 1996), this experiment was designed to study how stubble C-N reserves and/or residual leaf area (both depending of the cutting height) can modulate the contribution of taproot reserve-derived C-N supply to the regrowing shoot of alfalfa recovering from defoliation.

### **C.6.1 Initial (Day 0) plant status**

The reduction of the N supply pretreatment significantly decreased the plant biomass, as already observed for alfalfa (Ourry *et al.*, 1994, Meuriot *et al.*, 2003a) and for several other species like soybean (*Glycine max* L. Merr.; Rufty *et al.*, 1984), chicory (*Cichorium intybus*; Ameziane *et al.*, 1997) or ryegrass (*Lolium perenne* L.; Clement *et al.*, 1978; Thornton *et al.*, 1993). At Day 0, the two main storage organ dry matters (*i.e.* stubble + taproot) were significantly reduced for 0.2 mM KNO<sub>3</sub> fed plants. Moreover, the reduction of the mineral N availability also strongly decreased overall N pools (nitrate, amino acids and soluble proteins) by more than 50% in average within these tissues, and except for taproot VSPs where it remained quantitatively unchanged.

Overall C reserve compounds were also quantified within the perenniating organs and it confirmed that the taproot is the main alfalfa C-N storage organ, as already reported by Boyce and Volenec (1992) and Ourry *et al.* (1994) already reported it. However, and even if most C-N reserves were localized in this specific organ, our results showed that approximately 25 and 5% of the total initial N reserves potentially mobilizable at Day 0 were localized within the stubble and the lateral roots (data not shown), respectively. According to these results, the evolution of the C-N reserve pools was only reported for taproot and stubble tissues during post-cutting regrowth. Furthermore, and even if the stubble represents the second storage organ in alfalfa, our results showed that this tissue can also supply significant amounts of C-N compounds to the nearest regrowing shoot tissues like meristems or young stems and leaves, as Hodgkinson *et al.* (1972) or Richards (1993) already reported it.

In our experimental conditions, and unlike previous studies (Kim *et al.*, 1991; Ourry *et al.*, 1994), the reduction of the mineral N availability did not alter starch or sucrose contents within the taproot, but led to their significant increase within the stubble. Starch contribution to shoot C supply or root C respiration was considered to be non-limiting because starch content was about 20 times higher in this experiment than in field conditions where starch usually reach the threshold minimum value of 15 mg.g<sup>-1</sup> DM during winter (Boyce and Volenec, 1992; Li *et al.*, 1996; Cunningham and Volenec, 1998; Dhont *et al.*, 2002). Together with the step-by-step regression analysis, this also emphasize the particular role of reserve-derived N in shoot N supply and subsequent shoot regrowth potential, as already reported in several studies (Ourry *et al.*, 1994; Avice *et al.*, 1996a; Barber *et al.*, 1996; Dhont *et al.*, 2003).

Lastly, and as expected, the reduction of the cutting height only decreased the stubble shoot dry matter (*i.e.* remaining leaves and stems) of more than four times in average at Day 0. Consequently, overall stubble C-N reserves were also quantitatively reduced of approximately three times in average, as well as the initial stubble residual leaf area. These mechanisms were also additive to the initial C-N status and were consequently more pronounced for LN plants than for HN plants.

### **C.6.2 Contribution of taproot C-N reserves to the regrowing shoot C-N supply**

During early regrowth (between Day 0 and Day 13), the regrowing shoot biomass, total leaf area and root N uptake (data not shown) increased for overall treatments, and particularly after Day 6. This initial lag time of six days was needed for meristematic reinitiation and subsequent new leaf expansion (Richards, 1993; Simon *et al.*, 2004) and allowed to restaure both photosynthetic C and N uptake capacities within the plant. However, and as several studies long reported it (Graber, 1927; Granfield, 1943, Avice 1996a), there was a significant decrease of taproot biomass in the meantime, while stubble dry matter remained fairly constant. This decrease of taproot biomass seemed to be significantly related to the great decline of taproot total C-N contents during early regrowth, through the extensive mobilization of starch, amino acids and soluble proteins, which may together account for more than 60% of taproot dry matter (Fankhauser *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1990, Meuriot *et al.*, 2003). However, our results also clearly showed that no taproot VSP mobilization occurred for HN plants, while this specific N pool decreased of more than 65% for LN plant in the

meanwhile. Because HN plants had higher initial N reserves within their remaining tissues than LN plants, we can presume that a sufficient N supply to the regrowing shoot organs occurred through the great depletion of labile N pools like nitrate or amino acids and through N uptake for HN plants. As a consequence, we report that taproot VSP content can be considered as a good indicator of whole plant N status.

Our results also showed that the N reserve mobilization was strongly influenced by the initial C-N status and only occurred within C-N repleted tissues. For example, HN plants, which had the highest initial amino acids and soluble proteins contents at Day 0, also had the greatest relative amino acids (-70%) and soluble proteins (-50%) decrease in average within both taproot and stubble tissues between Day 0 and Day 13. However, their stubble starch content remained unaffected in the meanwhile. This seemed to be due to a threshold minimum value of stubble starch content of 5 mg.plant<sup>-1</sup> DM below which there was no more starch mobilization. In our experimental conditions (*i.e.* hydropony and high irradiance), and irrespective of overall treatments, the taproot starch content did not seem to be limiting for shoot C supply or for perennial organs C respiration during early regrowth.

As a consequence, and compared to the cutting height and the RLA, a step-by-step analysis reported that the initial C-N status was the main determining variable (explaining more than 60% of the variance) during alfalfa post-cutting regrowth and, as expected, N reserves played a major role in this mechanism. The LN plants final forage productivity, as well as plant total biomass production, are thus significantly decreased of about 30% in average at the end of the experiment, when compared to HN plants. N reserves were also greatly depleted for LN plants and, because of the major role of these reserves during recovery from defoliation, we can suppose that this mechanism would have led to a significant reduction of forage production if a new defoliation / regrowth cycle had been carried out at the end of the experiment. Moreover, we can also make the assumption that if plants had been regrown under limiting N conditions in our experiment (for example 0.2 mM instead of 1.0 mM KNO<sub>3</sub>), this would have certainly more greatly enhanced N mobilization and reduced N re-accumulation within the stubble and the taproot. Therefore, forage production, as well as culture perenniality, would have been more severely altered.

### **C.6.3 Modulation of the contribution of taproot C-N reserves by the cutting height and the residual leaf area**

The initial cutting height and the residual leaf area also strongly altered the contribution of taproot C-N reserves to the regrowing shoot C-N supply, and particularly for LN plants. Due to the extensive mobilization of taproot C-N reserves during early regrowth in alfalfa recovering from defoliation, and because LN plants had reduced N reserve contents at Day 0, taproot N reserves (amino acids, soluble proteins and VSPs) were rapidly and greatly depleted for LN plants. As a result, the taproot C-N supply was unable to meet the important regrowing shoot C-N demand during early regrowth. The regrowing shoot biomass production was then significantly reduced (since Day 9) and this led to decrease final i) forage productivity, ii) plant total biomass production and iii) plant C-N reserve level at the end of the experiment for LN plants. As a consequence, stubble C-N reserves and stubble residual photosynthetic activity are of particular importance when plants have low initial N status. The stubble tissues can supply significant amounts of C-N compounds to the nearest regrowing shoot during early regrowth (Hodgkinson *et al.*, 1972; Dufour *et al.*, 1989), in addition to taproot-derived C-N compounds. However, this mobilization is realized at their expense and there was a greater leaf abscission for LN plants than for HN plants. More than 75% of the residual leaf area was lost since Day 6 for 15LN plants, while a same percentage was only reached until Day 13 for 15HN plants (data not shown). A cumulative effect of both initial C-N status and cutting height was also observed for 6LN plants where this percentage was already reached since Day 3. Because some studies already reported that stubble leaves can rejuvenate during early post-cutting regrowth and can transiently restaure high photosynthetic activities (Hodgkinson *et al.*, 1972; Hart *et al.*, 1978), the stubble leaves C supply to the regrowing shoot was strongly reduced by the initial C-N status. Moreover, this greater leaf abscission was accompanied by a concomitant reduced total plant N uptake (data not shown). The strong dependance of the regrowing shoot to the reserve-derived C-N supply was then amplified for LN plants, but this reserve-derived C-N supply was rapidly deficient. This mechanism partly explains why the regrowing shoot total N was already reduced since Day 9, when compared to HN plants. As a consequence, the proportion of reserve-derived N in the regrowing shoots was greater for HN plants than for LN plants at the end of the regrowth.



#### **C.6.4 Physiological significance and agronomical application**

In conclusion, the initial plant C-N status, the cutting height and the residual leaf area had significant effects on the alfalfa regrowth potential in our experimental conditions. Using a step-by-step regression analysis, our results reported that the former is of great importance, while the latter is only significant when plants are already submitted to adverse growth conditions (*i.e.* low N and low cutting height). Because the initial C-N status is determinant for forage production and culture perenniality (Avicé *et al.*, 1996a; Volenec *et al.*, 1998), and because the cutting frequency particularly alter this initial status (Ourry *et al.*, 1994; Avicé *et al.*, 1997a), our study confirmed previous studies reporting that high cutting frequencies are commonly correlated with decreased forage productivity and culture perenniality (Brink and Marten, 1989; Gramshaw *et al.*, 1993; Avicé *et al.*, 1997a). As a result, culture managements like high cutting heights, leading to quantitatively increase the initial organic reserves, can partly counterbalance this negative effect of high cutting regimes. Our results are then consistent with previous field studies reporting that high cutting frequencies should be associated with high cutting heights (between 10 to 15 cm below the crown), in order to prevent a decrease of forage productivity and culture perenniality (Langer and Steinke, 1965; Smith and Nelson, 1967). Moreover, and because several works already reported that forage digestibility increases with stem length (*i.e.* basal stem cells are more lignified than apical stem cells; Lemaire and Allirand, 1993; Guines *et al.*, 2003), higher cutting heights would also significantly enhance forage quality in the meanwhile.

However, our study revealed that this contribution of stubble reserves to shoot regrowth is solely effective on a short time scale because, and unlike within the taproot, overall stubble reserves (starch, amino acids or soluble proteins) are not restaured until the end of the regrowth. In the case of a new defoliation / regrowth cycle, these stubble reserves would have been previously depleted and it can be hypothesized that the contribution of taproot organic reserves to the regrowing shoot C-N supply will be increased, as we can report it for the plants cutted at 6 cm height. Consequently, a culture management leading to increase the cutting height together with the cutting frequency is most of time only effective on a single defoliation / regrowth cycle (*i.e.* transient increase of forage productivity) and is not sufficient to significantly increase culture perenniality, as Kust and Smiths (1961) or Gramshaw (1993) failed to explain it.

Nevertheless, an increase of the cutting height during the penultimate autumn harvest of alfalfa could be of particular interest for the plant winter survival, persistency and spring

regrowth. In addition to a greater forage quality during this penultimate cycle, the increase of the cutting height would prevent an extensive depletion of taproot C-N reserves during the latest alfalfa defoliation / regrowth cycle. Therefore, this mechanism would have a positive effect on winter survival and persistency, as Volenec *et al.* (1996, 1998) or Dhont *et al.* (2002) already reported it. Moreover, and because the taproot 32 kDa VSP was recently reported to possess an *in vitro* chitinase activity (Meuriot *et al.*, 2004), increased taproot VSP reserves can lead to a better defense against pathogens during the autumn / winter period. Lastly, recent works also showed that taproot soluble proteins (and more specifically VSPs) are closely related to shoot regrowth in spring (Cunningham and Volenec, 1998; Dhont *et al.*, 2003). As a consequence, an increased cutting height during the penultimate autumn harvest could also have a positive effect on spring herbage regrowth. These overall observations will be of particular interest for alfalfa managements in northern regions enduring hard and cold winters. Moreover, and because overall treatments did not lead to modified shoot-root ratio and exogenous N partitioning at the end of the regrowth (data not shown), our results thus particularly showed that alfalfa regrowth is mainly controlled by an optimization of biomass partitioning and C and N reserves distribution. Therefore, future works leading to improve knowledge about the plant optimization of biomass and C-N reserve partitioning and allocation will be of particular interest for a better alfalfa management.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Mrs. M.P. Henry for her invaluable help in IRMS analysis. The authors also wish to acknowledge Mr A.J. Escobar-Gutiérrez for fruitful discussions throughout this work supported by a Ph. D. grant for F. Meuriot from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) and the “Conseil Régional de Basse-Normandie”.

## CHAPITRE III : MODELISATION

### ***A- Introduction***

Au niveau de la plante entière, les mécanismes responsables de l'acquisition, du transport et de l'utilisation des assimilats confèrent au végétal une grande adaptabilité face aux modifications de l'environnement. Ces différents mécanismes déterminent la distribution du carbone et de l'azote dans la plante (Richards, 1993 ; Engels, 1994). Cependant, ces derniers sont complexes, ce qui entraîne de grandes difficultés dans l'interprétation des travaux consacrés à la régulation de la distribution des assimilats (Marcellis, 1993). De plus, cette complexité a généralement limité le développement de modèles mécanistes de fonctionnement à l'échelle de la plante entière (Landsberg *et al.*, 1991 ; Cannell et Dewar, 1993). Cette observation est plus particulièrement vérifiée pour l'azote (Bijlsma et Lambers, 2000 ; Jeuffroy *et al.*, 2002). En outre, l'essentiel des travaux portant sur la modélisation de la distribution de l'azote a été réalisé sur des plantes annuelles de grande culture (blé, colza, maïs, pois) afin de prévoir le remplissage en azote du grain et d'estimer le rendement potentiel de la culture en fonction de différentes conditions environnementales ou culturales (Jones et Kiniry, 1986 ; Hansen *et al.*, 1991 ; Gabrielle *et al.*, 1998 ; Jeuffroy et Recous, 1999). Bien peu de travaux se sont en effet attachés à décrire cette distribution chez les espèces prairiales, et encore moins d'études ont été consacrées à la modélisation de la distribution de l'azote dans le cadre de la repousse après la coupe chez des espèces fourragères (Tabourel-Tayot et Gastal, 1998 ; Lemaire et Millard, 1999). Or chez la luzerne, comme nous avons pu le voir au cours de l'analyse bibliographique et du chapitre précédent, l'optimisation de la gestion de la production et de la pérennité de la culture passe essentiellement par une meilleure connaissance des mécanismes régulant le stockage et l'utilisation des réserves, notamment azotées, lors de la repousse après la coupe (Lemaire et Allirand, 1993 ; Ourry *et al.*, 2001).

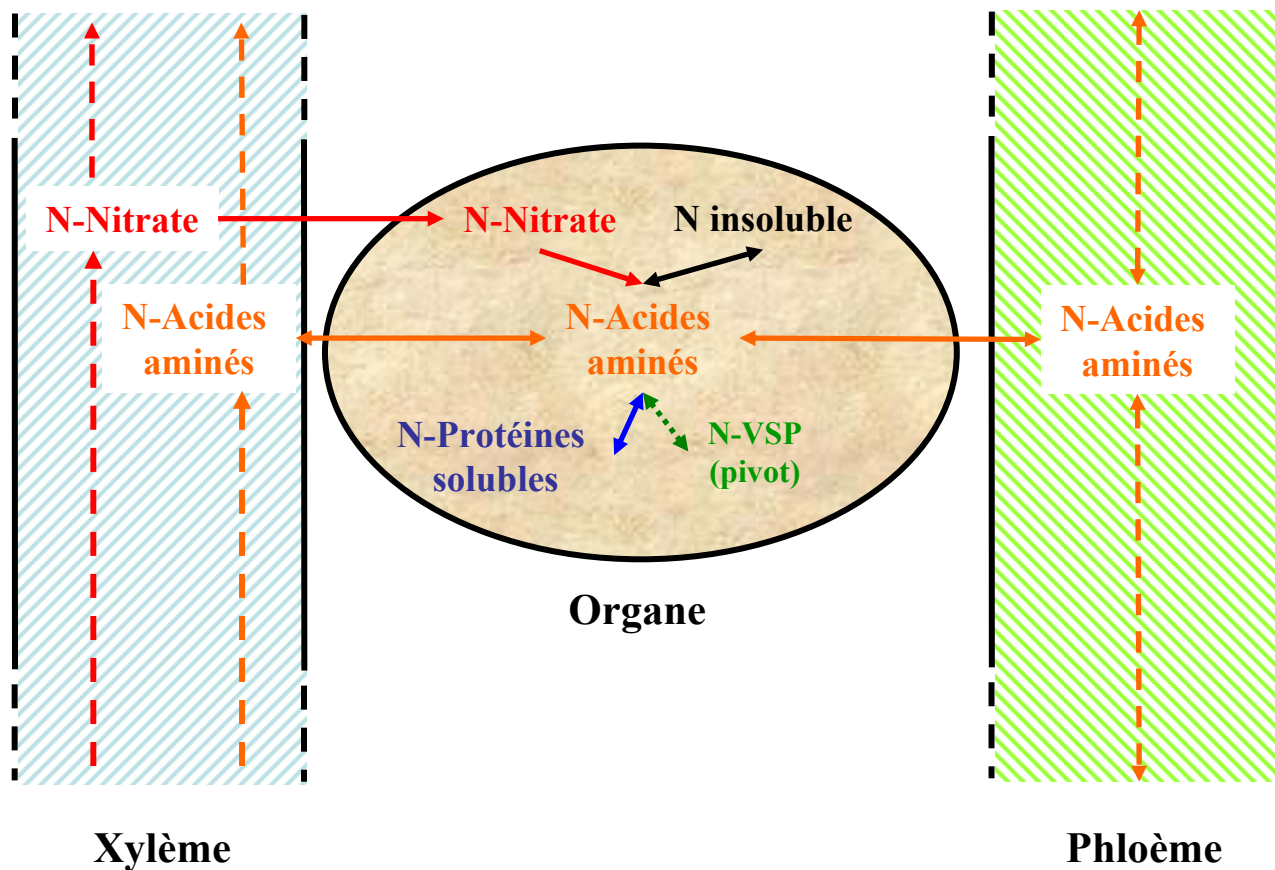
L'ensemble de ces éléments suggère l'utilité de développer et de valider un modèle mathématique permettant l'analyse et la quantification de la distribution de l'azote au niveau de la plante entière soumise à un cycle de coupe / repousse. **A cet effet, nous avons élaboré un modèle dynamique déterministe rendant compte de la distribution de l'azote entre les différents organes et pools métaboliques de la luzerne lors de la repousse après la coupe.**

**Ce modèle, considéré comme un outil de base**, a pour objectif général de permettre une meilleure hiérarchisation et intégration des connaissances acquises sur la distribution de l'azote chez la luzerne lors de la repousse après la coupe. **Ce modèle repose sur l'hypothèse majeure suivante :**

*L'allocation de l'azote entre organes et sa répartition au sein de chaque organe sont déterminées par les offres locales en nitrate et en acides aminés, et par l'aptitude des différents organes ou fonctions métaboliques à utiliser ces ressources.*

**L'objectif principal de ce modèle est de valider cette hypothèse et de montrer que la distribution de l'azote** est déterminée par l'activité des différents organes ou fonctions métaboliques et **ne résulte pas de règles de répartition ou d'allocation fixées a priori** (Escobar-Gutiérrez *et al.*, 1998), comme c'est le cas pour la majorité des modèles mécanistes de répartition (Magnuson *et al.*, 1986 ; Penning de Vries *et al.*, 1989 ; Thornley et Cannell, 1992 ; Gabrielle *et al.*, 1998 ). En effet, dans le modèle proposé, la distribution de l'azote dans la plante est basée sur une comparaison entre les niveaux de l'offre locale en azote et de l'aptitude de l'organe à utiliser ce dernier. Ce principe est adopté en accord avec les hypothèses montrant que l'orientation des flux d'assimilats dans la plante est principalement déterminée par les activités physiologiques des organes puits et par les concentrations locales en substrats (Minchin *et al.*, 1993 ; Cheeseman, 1993, Escobar-Gutiérrez *et al.*, 1998). **Le modèle développé doit aussi permettre de répondre à un certain nombre de questions** de première importance au niveau de la physiologie de la plante lors de la repousse après la coupe **telles que :**

- 1) le pool azoté constitué par les protéines solubles (et plus particulièrement les VSP) est-il un pool quantitativement important pour la fourniture d'azote aux parties aériennes pendant le début de la repousse chez la luzerne ?
- 2) l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des VSP du pivot est-il uniquement lié à la concentration en acides aminés au niveau de cet organe?
- 3) les réserves azotées des chaumes contribuent-elles significativement à la fourniture d'azote aux parties aériennes pendant le début de la repousse ? Si oui, modifient-elles la contribution des parties racinaires, et notamment celle du pivot ? Et dans quelle mesure ?



**Figure III.1:** Flux d'azote entre les différents pools azotés (nitrate, acides aminés, protéines solubles, VSP et N insoluble) chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) dans le xylème, le phloème, et dans chaque organe de la plante.

## **B- Description du modèle**

Le modèle développé est un modèle quantitatif simulant le fonctionnement d'une plante en termes de flux azotés entre différents organes et pools biochimiques lors d'une repousse de 28 jours dans des conditions standard de croissance (température, éclairage). Ce modèle comporte trois parties principales : i) l'acquisition de l'azote, ii) sa répartition entre les différents organes et, iii) son allocation entre différentes fractions métaboliques. La plante est considérée comme un réseau dans lequel seul le nitrate et les acides aminés peuvent circuler entre les différents nœuds du réseau (Fig. III.1). La distribution de l'azote est réalisée au sein de chaque organe entre les différentes fractions métaboliques azotés que sont le nitrate, les acides aminés, les protéines solubles et l'N insoluble (ou N structural ; Fig. III.1). En outre, du fait de l'importance des VSP lors de la repousse après la coupe chez la luzerne (Avice *et al.*, 1996a ; Volenec *et al.*, 1996, 1998), un cinquième pool représentatif de ces VSP a été créé pour le pivot (Figure III.1). Le modèle mathématique est transcrit sous Model-Maker IV (Cherwell Scientific, Ltd, UK) de manière complète en Annexe A.1. Il comporte 33 compartiments agencés en modules présentant des comportements homogènes. Les flux d'azote entre ces compartiments répondent à des cinétiques enzymatiques michaeliennes de premier ordre où la vitesse de la réaction dépend de la concentration en substrat de l'organe, de la vitesse maximale apparente de la réaction ( $V_{max}$ ), ainsi que du coefficient d'affinité apparent pour le substrat ( $K_m$ ). Ces deux derniers paramètres ont été, dans la mesure du possible, généralisés pour les différentes fonctions rencontrées, et ont permis de générer 25 paramètres. L'intégration du modèle a été effectuée avec la méthode de Runge-Kutta 4. Deux jeux de données expérimentales (traitements 15HN et 6LN, détaillés dans l'article C du chapitre II « Résultats ») ont été utilisés pour respectivement ajuster et valider le modèle. Par rapport à l'ensemble des traitements réalisés dans le cadre de cet article, ces deux traitements constituent deux états initiaux et deux conditions de repousse « extrêmes », ce qui permet une meilleure validation du modèle. Enfin, le niveau des réserves azotées initiales, l'absorption N et la croissance en matière sèche constituent des données d'entrée obtenues à partir des expérimentations. L'eau et les minéraux autres que l'azote ne sont pas supposés limiter la croissance et le pas de temps implicite de ce modèle est la journée. L'ensemble des paramètres et des variables utilisés dans ce modèle est respectivement présenté dans les tableaux III.1 et 2.

**Tableau III.1:** Liste des différents paramètres du modèle.

<b>Symbole</b>	<b>Définition</b>	<b>Valeur</b>	<b>Unité</b>
DegProtKm	Constante d'affinité pour la dégradation des protéines solubles	0.5	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
DegProtKmOld	Constante d'affinité pour la dégradation des protéines solubles des organes épargnés par la coupe	0.2	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
DegProtVmax	Vitesse maximale de dégradation des protéines solubles	0.01	mg N. jour <sup>-1</sup>
DegProtVmaxOld	Vitesse maximale de dégradation des protéines solubles des organes épargnés par la coupe	0.025	mg N. jour <sup>-1</sup>
PercentPhlo	Pourcentage du phloème par rapport à la biomasse sèche totale	2.5	%
PercentXyl	Pourcentage du xylème par rapport à la biomasse sèche totale	5	%
RedKm	Constante d'affinité pour la réduction du nitrate en acides aminés	0.01	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
RedKmLeaves	Constante d'affinité pour la réduction du nitrate en acides aminés dans les feuilles	0.005	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
RedVmax	Vitesse maximale de réduction du nitrate en acides aminés	0.01	mg N. jour <sup>-1</sup>
RedVmaxLeaves	Vitesse maximale de réduction du nitrate en acides aminés dans les feuilles	0.05	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynInsKm	Constante d'affinité pour la synthèse de l'N insoluble	0.01	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
SynInsVmax	Vitesse maximale de synthèse de l'N insoluble	0.001	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynProtKm	Constante d'affinité pour la synthèse des protéines solubles	0.06	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
SynProtVmax	Vitesse maximale de synthèse des protéines solubles	0.0075	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynProtVmaxOld	Vitesse maximale de synthèse des protéines solubles dans les organes épargnés par la coupe	0.0025	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynVSPKm	Constante d'affinité pour la synthèse des VSP	0.001	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
SynProtVmax	Vitesse maximale de synthèse des VSP	0.001	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrAAKm	Constante d'affinité pour le transport des acides aminés	0.01	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
TrAAKmOld	Constante d'affinité pour le transport des acides aminés des organes épargnés par la coupe	0.05	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
TrAAVmax	Vitesse maximale de transport des acides aminés	0.001	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrAAVmaxOld	Vitesse maximale de transport des acides aminés des organes épargnés par la coupe	0.01	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrNO3Km	Constante d'affinité pour le transport du nitrate	0.001	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
TrNO3KmOld	Constante d'affinité pour le transport du nitrate des organes pérennes	0.01	mg N. mg MS <sup>-1</sup>
TrNO3Vmax	Vitesse maximale de transport du nitrate	0.35	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrNO3VmaxOld	Vitesse maximale de transport du nitrate des organes épargnés par la coupe	0.05	mg N. jour <sup>-1</sup>

**Tableau III.2:** Liste des différentes variables du modèle.

<b>Symbole</b>	<b>Définition</b>	<b>Unité</b>
N-AAF	Acides aminés présents dans les fleurs	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AANF	Acides aminés présents dans les nouvelles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAANT	Acides aminés présents dans les nouvelles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAVF	Acides aminés présents dans les vieilles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAVT	Acides aminés présents dans les vieilles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAP	Acides aminés présents dans le pivot	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AARL	Acides aminés présents dans les racines latérales	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAXylème	Acides aminés présents dans le xylème	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-AAPhloème	Acides aminés présents dans le phloème	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsF	N insoluble présent dans les fleurs	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsNF	N insoluble présent dans les nouvelles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsNT	N insoluble présent dans les nouvelles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsVF	N insoluble présent dans les vieilles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsVT	N insoluble présent dans les vieilles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsP	N insoluble présent dans le pivot	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-InsRL	N insoluble présent dans les racines latérales	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3F	Nitrate présent dans les fleurs	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3NF	Nitrate présent dans les nouvelles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3NT	Nitrate présent dans les nouvelles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3VF	Nitrate présent dans les vieilles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3VT	Nitrate présent dans les vieilles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3P	Nitrate présent dans le pivot	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3RL	Nitrate présent dans les racines latérales	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-NO3Xylème	Nitrate présent dans le xylème	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-Solnut	Azote présent dans la solution nutritive	mg N
N-Pertesracinaires	Pertes racinaires par exsudation et/ou mortalité racinaires	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtF	Protéines solubles présentes dans les fleurs	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtNF	Protéines soluble présentes dans les nouvelles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtNT	Protéines solubles présentes dans les nouvelles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtVF	Protéines solubles présentes dans les vieilles feuilles	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtVT	Protéines solubles présentes dans les vieilles tiges	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtP	Protéines solubles présentes dans le pivot	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-ProtRL	Protéines solubles présentes dans les racines latérales	mg N. plante <sup>-1</sup>
N-VSPP	VSP présentes dans le pivot	mg N. plante <sup>-1</sup>

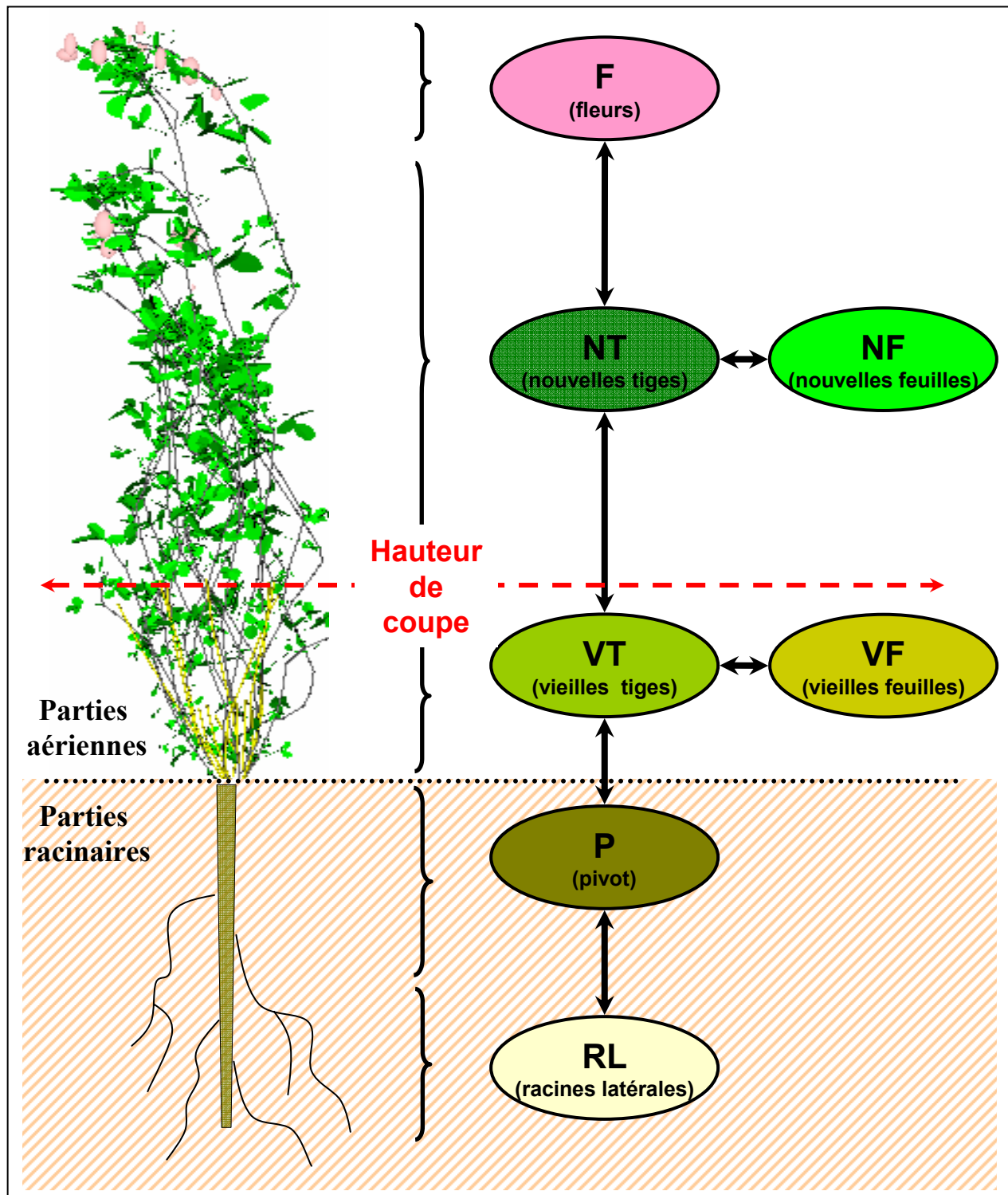


## **B.1- Hypothèses implicites du modèle :**

La modélisation, qui est l'outil d'étude privilégié de systèmes complexes, nécessite une formalisation mécaniste reposant sur un ensemble d'hypothèses plus ou moins simplificatrices selon le niveau de pertinence choisi ainsi que des objectifs recherchés. Ce nombre d'hypothèses augmente généralement avec le nombre de processus pris en compte et tend à augmenter la difficulté d'évaluation du modèle (Dewar, 1993). L'ensemble des hypothèses doit alors être clairement identifié et discuté afin de pouvoir évaluer leurs incidences respectives sur le modèle développé.

Tout d'abord, les plantes ont été cultivées en hydroponie avec des solutions nutritives renouvelées régulièrement au cours des expérimentations (voir section C.4 du chapitre « Résultats »). Les flux d'eau, l'état hydrique des tissus, ainsi que les concentrations en éléments nutritifs autres que l'azote n'ont donc pas été pris en compte dans le modèle. Le rayonnement artificiel ( $300 \pm 20 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  à 15cm au dessus du haut du couvert), la température ( $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  le jour et  $18.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  la nuit), ainsi que la longueur de la durée du jour (16h d'éclairage et 8h d'obscurité) ont été fixées comme des constantes lors des différentes expérimentations et sont compatibles avec une croissance optimale des plants de luzerne. Les effets de la compétition entre plantes pour l'acquisition du carbone ou de l'azote ont été minimisés par une culture des plantes avec un indice foliaire moyen au cours de la repousse de  $0,59 \pm 0,13 \text{ m}^2 \text{ surface foliaire.m}^{-2} \text{ surface de culture}$ .

Par ailleurs, les légumineuses sont capables de synthétiser des composés de transport de l'azote appelés uréides (allantoïne et acide allantoïque) qui peuvent être présents en quantités faibles, mais non négligeables, dans les vaisseaux conducteurs (Pate, 1980, Atkins, 1985). Cependant, ces mêmes auteurs ont précisé que ces composés ne sont synthétisés que lorsque les plantes sont nodulées et sont cultivées sur des milieux carencés en azote. Dans nos conditions de culture où le nitrate est à une concentration constante de l'ordre de 2 mM dans la solution nutritive, et dans la mesure où nous avons pris soin de supprimer les rares nodules présents au jour de coupe, nous avons alors considéré que cette fraction azotée était nulle, au même titre que l'ammonium, dont les concentrations sont toujours très faibles dans la plante (Touraine *et al.*, 1994).



**Figure III.2:** Représentation schématique des sept compartiments structuraux représentant les différents organes morphologiques de la luzerne.

## **B.2- Compartiments et variables du modèle**

### **B.2.1 Les compartiments**

De façon à rendre compte de l'effet du statut N initial, de la hauteur de coupe ou de la surface foliaire résiduelle sur l'allocation des ressources azotées dans la plante, nous avons séparé les différents organes morphologiques de la luzerne. **Le modèle comporte alors sept compartiments structuraux** principaux représentant le comportement moyen des différents organes de la luzerne (Fig. III.2 et Annexe A.1). Ces différents compartiments sont représentés de la façon suivante :

- un compartiment représentatif des organes floraux (Fleurs ; F),
- un compartiment représentatif des organes foliaires en formation (Nouvelles Feuilles ; NF),
- un compartiment représentatif des tiges en formation (Nouvelles Tiges ; NT),

Ces trois premiers compartiments représentent l'ensemble des organes aériens néoformés qui constituent la biomasse aérienne produite lors de la repousse, puis :

- un compartiment représentatif des organes foliaires résiduels au jour de coupe (Vieilles Feuilles ; VF),
- un compartiment représentatif des tiges résiduelles au jour de coupe (Vieilles Tiges ; VT), organe mineur de réserve dont l'importance varie avec la hauteur de la coupe,
- un compartiment représentatif du pivot (P), organe majeur de réserve chez la luzerne,
- un compartiment représentatif des racines latérales (RL), responsable des entrées de nitrate dans la plante.

Ces quatre derniers compartiments représentent l'ensemble des organes épargnés par la coupe.

**Chaque compartiment structural est ensuite composé de quatre compartiments métaboliques** représentant les différentes fractions azotées (Fig. III.1). Cette compartimentation, employée dans de nombreux modèles (Thornley, 1972 ; Johnson, 1985, Marcelis 1994, Escobar-Gutiérrez *et al.*, 1998), est nécessaire pour rendre compte de la répartition des ressources. Elle semble adaptée au cas particulier de la repousse après une coupe chez une plante herbacée telle que la luzerne. Cette représentation a aussi l'avantage de préciser la composition biochimique des différents tissus à chaque instant. Ces différents compartiments métaboliques seront **utilisés pour rendre compte de l'allocation de l'azote**, et représentent ainsi les différents substrats de la plante nécessaires aux réactions métaboliques (Fig. III.1) avec :

- un compartiment représentatif du nitrate (N-NO<sub>3</sub>),
- un compartiment représentatif des acides aminés (N-AA),
- un compartiment représentatif des protéines solubles (N-Prot),
- un compartiment représentatif de l'N insoluble (N-Ins).

Compte tenu de l'importance des protéines de réserves des organes végétatifs (VSP) chez la luzerne et de leur contribution lors de la repousse après la coupe (Avice *et al.*, 1996a ; Volenec *et al.*, 1998 ; Ourry *et al.*, 2001), **un cinquième compartiment représentant ces VSP a été représenté pour le pivot.**

- un compartiment représentatif des VSP du pivot (N-VSP).

Chaque compartiment est exprimé en mg d'N. Les valeurs de ces compartiments résultent du dosage de ces différents composés par spectrométrie de masse isotopique (IRMS) après fractionnement biochimique. La fraction N insoluble est représentée par l'ensemble des composés azotés insolubles dans les différents tampons d'extraction selon le protocole décrit en Annexe A.2, adapté du protocole décrit dans l'article C du chapitre « Résultats ». Cette fraction est alors représentée par des composés azotés fortement ancrés dans les membranes biologiques comme les protéines transmembranaires et les pigments photosynthétiques. La fraction biochimique N-Ins représente donc des composés constitutifs de la biomasse structurale des tissus. Cette fraction est difficilement mobilisable lors de la repousse après la coupe.

**L'allocation de l'azote entre les différents organes de la plante faisant intervenir un transfert à plus ou moins longue distance par les vaisseaux du xylème pour le nitrate, et par les vaisseaux du xylème et/ou du phloème pour les acides aminés (Cooper et Clarkson, 1989 ; Tischner, 2001), trois compartiments ont alors été créés afin d'assurer ce transfert avec (Fig. III.1 et Annexe A.1):**

- un compartiment pour le transfert du nitrate par le xylème ( $\text{NO}_3_{\text{Xylème}}$ ),
- un compartiment pour le transfert des acides aminés par le xylème ( $\text{AA}_{\text{Xylème}}$ ).
- un compartiment pour le transfert des acides aminés par le phloème ( $\text{AA}_{\text{Phloème}}$ ).

Le xylème et le phloème sont définis comme ayant une masse moyenne constante dans la plante, estimée à partir des données issues de la bibliographie à respectivement 5% et 2.5% de la matière sèche totale de la plante pour les vaisseaux du xylème et du phloème (Pate, 1980 ; Jung et Deetz, 1993 ; Winter, 2001 ; Enquist, 2001). En accord avec notre hypothèse générale, nous avons choisi de représenter le transfert de l'azote entre organes comme étant la résultante de son utilisation par les différents puits, et des quantités disponibles dans les réservoirs locaux. Ceci permet de représenter au mieux la distribution de l'azote dans la plante, notamment dans le cas particulier de la repousse après coupe où les flux xylémiens et phloémiens sont fortement réduits et où les réserves contribuent largement à la reconstruction des parties aériennes (Richards, 1993, Avice *et al.*, 1996a). **Par ailleurs, il semble généralement reconnu que la capacité de transport du système vasculaire n'est ni considérée comme un facteur limitant des flux d'assimilats entre les sources et les puits (Passioura et Ashford, 1974, Wardlaw, 1990), ni comme un facteur de contrôle de leur allocation au sein de la plante (Gifford et Evans, 1981).** Le mode de fonctionnement de ces compartiments permet ainsi de s'affranchir de l'utilisation des modèles de résistance de type Thornley (1972) employés dans de nombreux modèles de distribution. Par conséquent, ces compartiments permettent de simplifier le transport d'azote au niveau de la plante entière et proposent une alternative au transport d'azote dérivé de la théorie de Münch (1930).

Enfin, chez les herbacées, **la coupe peut entraîner une perte potentielle de racines latérales par mortalité et/ou sénescence (Jarvis et Macduff, 1989) ainsi qu'une exsudation significative de composés azotés** lors des premiers jours de repousse (Brophy et Heichel, 1989 ; Grayston *et al.*, 1996). L'ensemble de ces mécanismes peut alors perturber le bilan

azoté effectué au niveau de la plante entière. **Un dernier compartiment a alors été créé afin de pouvoir estimer ces pertes avec :**

- un compartiment pour les pertes racinaires (Pertesarinaires).

### **B.2.2 Les variables**

La matière sèche totale de la plante ( $MS_{tot}$ ) est constituée par la somme des matières sèches des compartiments structuraux avec :

$$MS_{tot} = MS_F + MS_{NF} + MS_{NT} + MS_{VF} + MS_{VT} + MS_P + MS_{RL} \quad (\text{mg MS})$$

et avec, au jour de coupe ( $t_0$ ), du fait de la suppression des organes aériens néoformés :

$$MS_{NF\ t_0} + MS_{NT\ t_0} + MS_{F\ t_0} = 0 \quad (\text{mg MS})$$

La quantité totale d’N dans la plante ( $N_{tot}$ ) représente la somme des fractions N des différents compartiments structuraux et des vaisseaux conducteurs avec :

$$N_{tot} = N_F + N_{NF} + N_{NT} + N_{VF} + N_{VT} + N_P + N_{RL} + N_{Xylème} + N_{Phloème} \quad (\text{mg N})$$

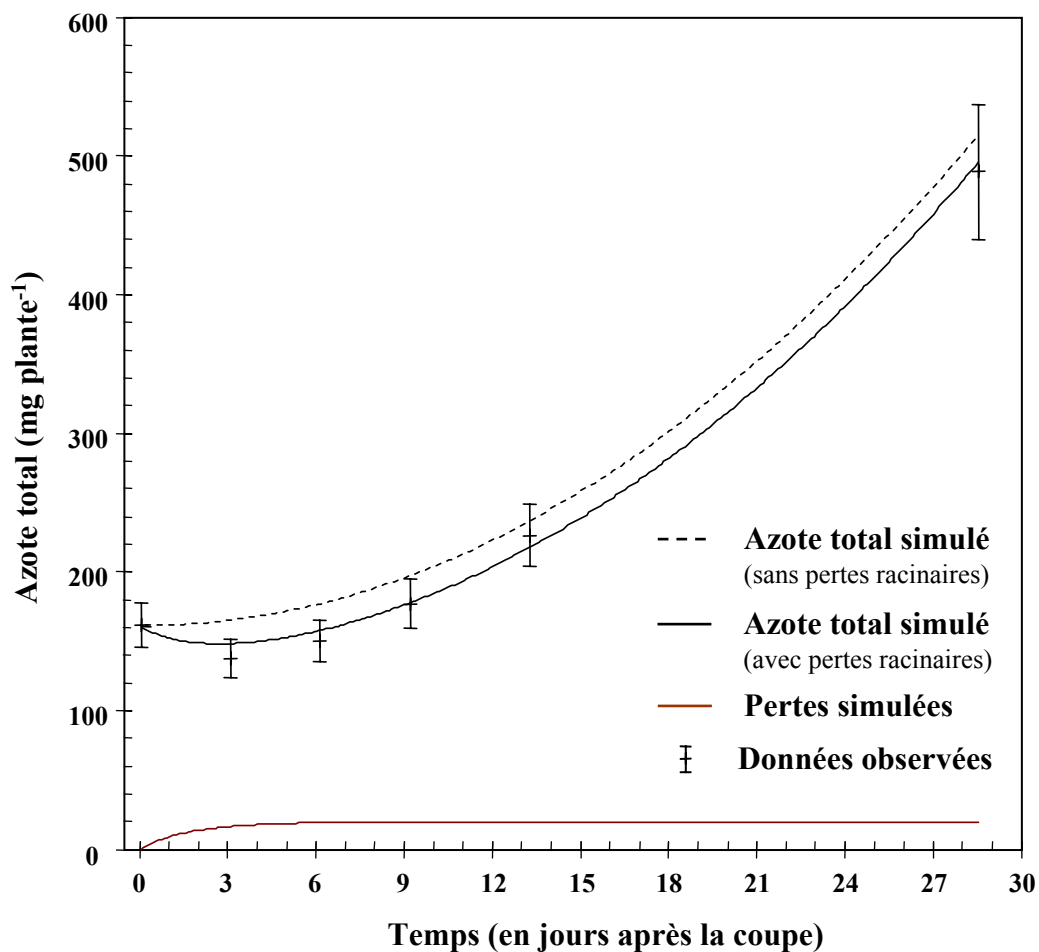
Les quantités d’N présentes dans chaque organe de la plante ( $N_{ORG\ i}$ ) représentent alors la somme des différents pools métaboliques azotés tel que :

$$N_{ORG\ i} = N\text{-NO3}_{ORG\ i} + N\text{-AA}_{ORG\ i} + N\text{-Prot}_{ORG\ i} + N\text{-Ins}_{ORG\ i} \quad (\text{mg N})$$

Pour le pivot, compte tenu de la fraction représentée par les VSP, ces quantités ( $N_P$ ) sont alors obtenues de la manière suivante :

$$N_P = N\text{-NO3}_P + N\text{-AA}_P + N\text{-Prot}_P + N\text{-Ins}_P + N\text{-VSP}_P \quad (\text{mg N})$$

Pour les organes aériens supprimés par la coupe à J0 ( $t_0$ ), les quantités d’N présentes dans ces organes sont nulles à cette même date.



**Figure III.3:** Comparaison des quantités d'azote total (tenant compte ou non des pertes racinaires) et des pertes racinaires simulées avec les données observées au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ .

### **B.3- Flux d'azote entre compartiments**

Compte tenu de notre hypothèse générale et de l'homogénéité de structure du modèle vis-à-vis des différentes fonctions physiologiques étudiées, les principaux flux d'N ( $F_N$ ) rencontrés sont déterminés par la concentration locale de chaque composé et par l'utilisation de ce composé au sein de chaque organe. Les flux correspondant à toutes les fractions azotées ( $N_i$ ) dans la plante obéissent alors à des cinétiques enzymatiques de type Michaelis-Menten définies pour chaque fraction azotée de la plante par :

$$F_{N_j} = MS_{ORG_j} * (V_{max} * [N_{iORG_j}] / (K_m + [N_{iORG_j}]), \quad (\text{mg N.jour}^{-1})$$

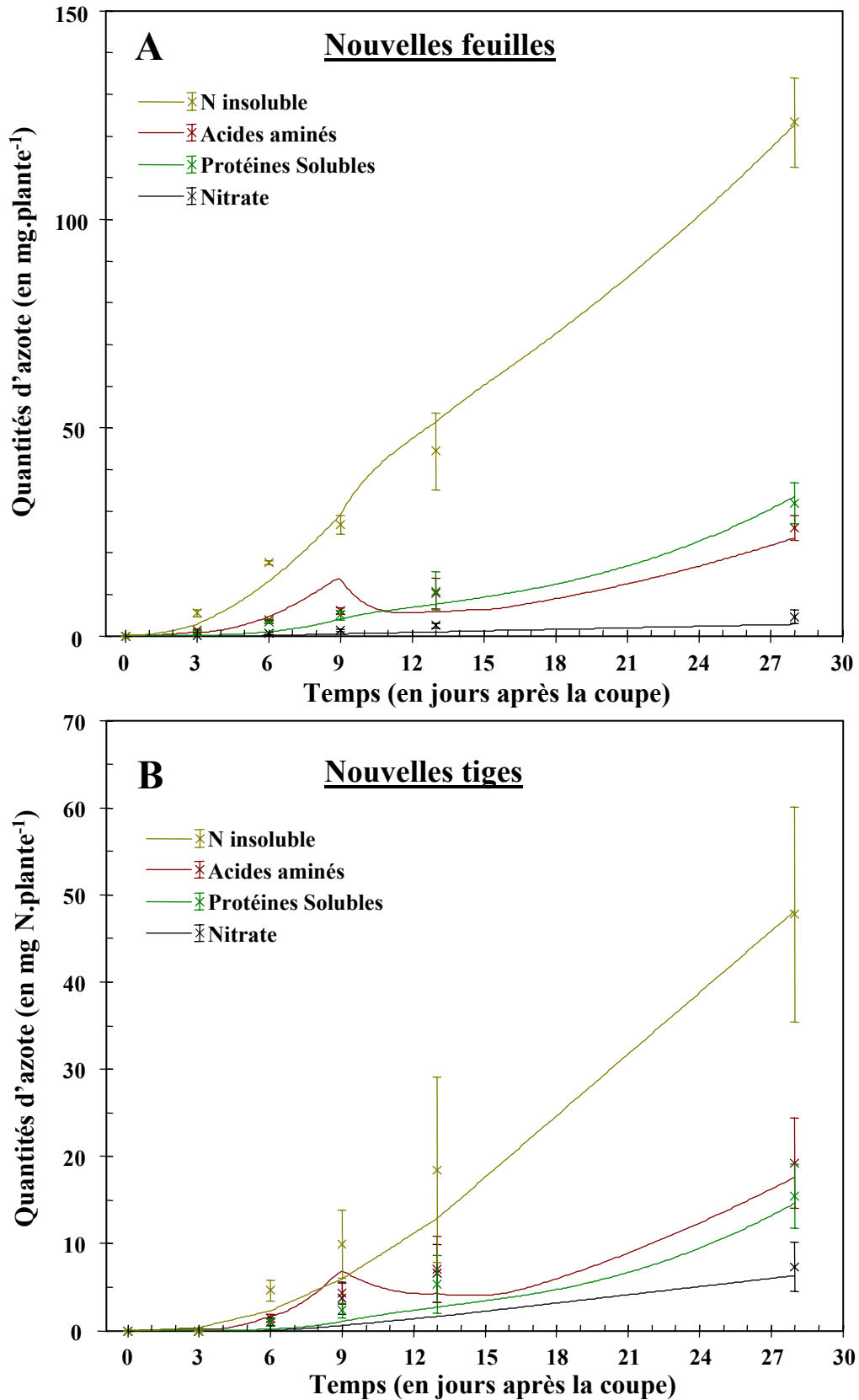
où  $[N_{iORG_j}]$  représente la concentration en substrat ( $N_i$ ) de l'organe, et où  $V_{max}$  et  $K_m$  représentent les paramètres apparents de la réaction.

#### **B.3.1 Le nitrate**

L'absorption du nitrate dépend d'un nombre important de facteurs tels que sa concentration dans la solution nutritive et dans la plante, les concentrations internes en sucres solubles et en certains produits issus de sa métabolisation (acides aminés et organiques), du volume de sol exploité, de la masse racinaire, et de la température (Touraine *et al.*, 1994, 2001 ; Tischner, 2000). La modélisation de l'absorption de l'N est donc multifactorielle et reste encore difficile à modéliser (Jeuffroy *et al.*, 2002). **Afin de faciliter l'étude du métabolisme azoté au cours de la repousse après la coupe, nous avons considéré l'absorption du nitrate comme une donnée d'entrée du modèle.** La fixation symbiotique est considérée comme nulle car les plantes sont cultivées sur des milieux riches en azote, ce qui inhibe la nodulation au niveau des racines latérales (Vance et Heichel, 1981 ; Kim *et al.*, 1993). En outre, l'absorption de nitrate au niveau du pivot est jugée négligeable au regard de celle des racines latérales et de l'importante surface d'échange de ces dernières avec le milieu (Lauter *et al.*, 1996). Ces racines latérales sont de plus spécialisées dans l'absorption de l'azote et présentent de très nombreux transporteurs membranaires de nitrate chez de nombreuses espèces (Touraine *et al.*, 1994 ; Tischner, 2000 ; Lalonde *et al.*, 2003).

Ce nitrate, comme toutes les fractions azotées du modèle, est ensuite soumis à la somme de trois utilisations élémentaires :





**Figure III.4:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) des nouvelles feuilles (**A**) et nouvelles tiges (**B**) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

- 1) une utilisation métabolique (réduction du nitrate, synthèse de protéines, croissance structurale...),
- 2) un transfert vers le xylème ou le phloème (pour les acides aminés seulement),
- 3) un stockage (ou une accumulation) dans chaque organe.

Pour le nitrate, son utilisation métabolique passe par sa réduction. Cette dernière est possible dans tous les organes de la plante. En effet, bien qu'essentiellement racinaire, cette réduction est aussi rencontrée dans les feuilles et les tiges chez la luzerne (Pate, 1980 ; Peoples *et al.*, 1985). Cette réduction (Red) du nitrate obéit à une cinétique de type michaélienne définie comme suit :

$$\text{Red}_{\text{ORGj}} = \text{MS}_{\text{ORGj}} * (\text{RedVmax} * [\text{N-NO3}_{\text{ORGj}}]) / (\text{RedKm} + [\text{N-NO3}_{\text{ORGj}}])$$

où  $[\text{N-NO3}_{\text{ORGj}}]$  représente la concentration en nitrate de l'organe,  
et où RedVmax et RedKm représentent les paramètres apparents de la réaction.

Le transfert du nitrate est effectué *via* les vaisseaux du xylème (Pate, 1980 ; Peoples *et al.* 1987). Ce composé n'est en effet retrouvé en faible quantité dans les vaisseaux du phloème que dans des conditions très particulières, comme lors d'un stress hydrique important ou lors d'une augmentation de la fertilisation azotée (Atkins *et al.*, 1980 ; Sutherland *et al.*, 1985 ; Peoples *et al.*, 1987 ; Touraine *et al.*, 2001). Ce transfert du nitrate (TrNO3) obéit lui aussi à une cinétique de type michaélienne déterminée par l'équation suivante :

$$\text{TrNO3}_{\text{ORG}>\text{ORGj}} = \text{MS}_{\text{ORGj}} * (\text{RedVmax} * [\text{N-NO3}_{\text{ORGj}}]) / (\text{RedKm} + [\text{N-NO3}_{\text{ORGj}}])$$

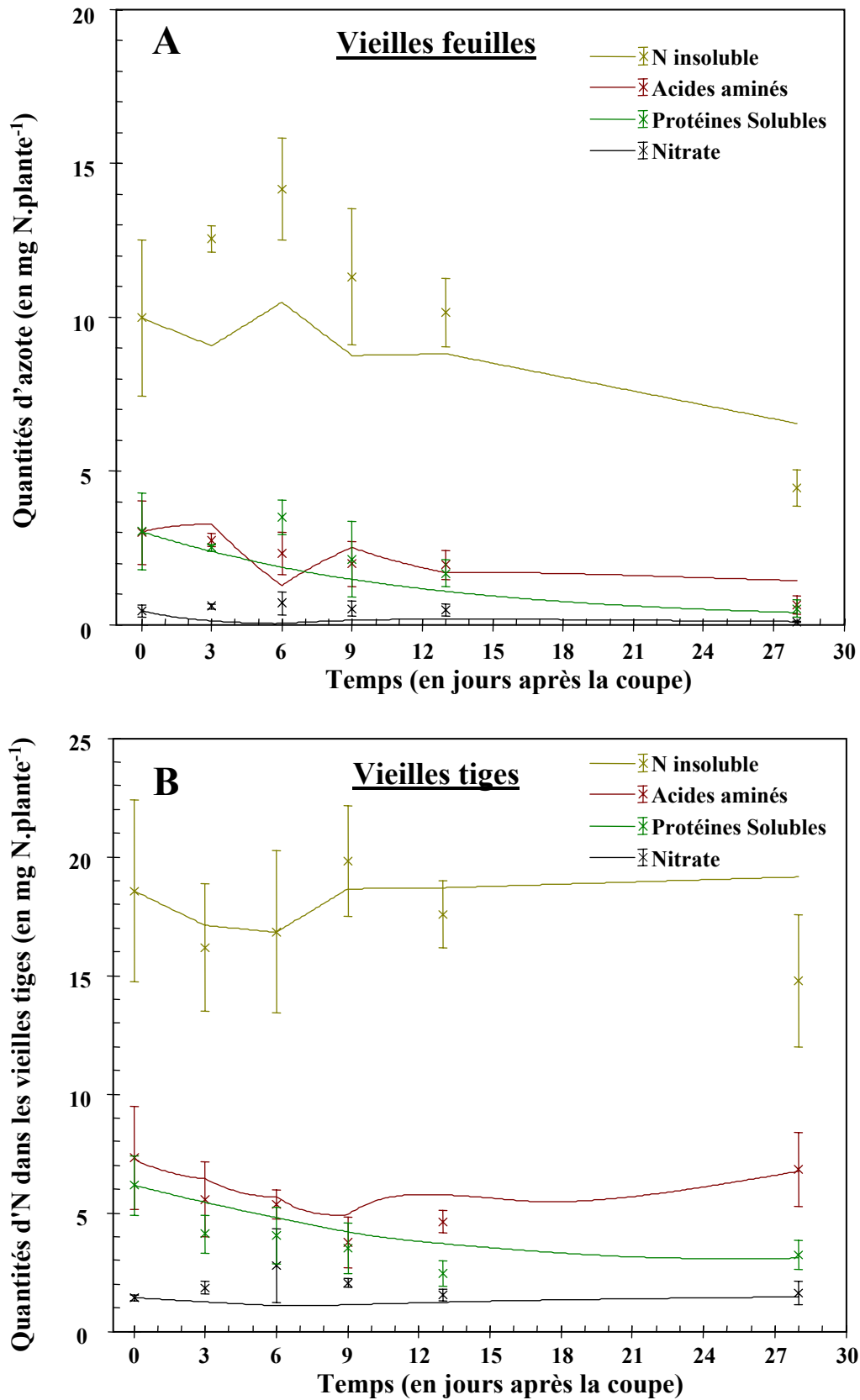
Par exemple, pour le transport du nitrate du xylème vers les vieilles tiges ( $\text{TrNO3}_{\text{XylIVT}}$ ), on a :

$$\text{TrNO3}_{\text{XylIVT}} = \text{MS}_{\text{VT}} * (\text{TrNO3Vmax} * [\text{N-NO3}_{\text{Xyl}}]) / (\text{TrNO3Km} * [\text{N-NO3}_{\text{Xyl}}]),$$

avec  $[\text{N-NO3}_{\text{Xyl}}] = \text{N-NO3}_{\text{Xyl}} / \text{MS}_{\text{Xyl}}$ ,

et  $\text{MS}_{\text{Xyl}} = \text{PercentXyl} * \text{MStot}$

et où PercentXyl représente 5% de la matière sèche totale de la plante.



**Figure III.5:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) des vieilles feuilles (A) et vieilles tiges (B) pour les au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

### B.3.2 Les acides aminés

Dans chaque organe, la synthèse ( $Syn_{iORGj}$ ) de protéines solubles, de VSP ou de N insoluble à partir des acides aminés obéit à la cinétique de type michaélienne suivante :

$$Syn_{iORGj} = MS_{ORGj} * (SynVmax_i * [N-AA_{ORGj}]) / (SynKm_i + [N-AA_{ORGj}])$$

où  $[N-AA_{ORGj}]$  représente la concentration en acides aminés de l'organe, et où  $SynVmax_i$  et  $SynKm_i$  représentent les paramètres apparents de la réaction.

De la même manière, la dégradation ( $Deg_{iORGj}$ ) des protéines solubles, des VSP et du N insoluble en acides aminés obéit à la cinétique de type michaélienne suivante :

$$Deg_{iORGj} = MS_{ORGj} * (DegVmax_i * [N_{iORGj}]) / (DegKm_i + [N_{iORGj}])$$

où  $[N_{iORGj}]$  représente la concentration en substrat  $N_i$  de l'organe, et où  $DegVmax_i$  et  $DegKm_i$  représentent les paramètres apparents de la réaction.

Les acides aminés circulent à la fois dans les vaisseaux du xylème et du phloème mais leur voie principale de transport est phloémienne (Fischer *et al.*, 1998 ; Tischner, 2000 ; Lalonde *et al.*, 2003). Cependant, il est généralement admis que les parties racinaires exportent les acides aminés vers les parties aériennes *via* les vaisseaux du xylème et qu'elles sont en retour alimentées *via* les vaisseaux du phloème dans lesquels les parties aériennes déchargent majoritairement leurs acides aminés (Barneix, 1996 ; Ortiz-Lopez *et al.*, 2000 ; Williams and Miller, 2001 ). Par conséquent, trois types de transferts sont rencontrés dans la plante pour les acides aminés :

- 1) un transfert uni-directionnel des organes racinaires (pivot et racines latérales) vers le xylème,
- 2) un transfert uni-directionnel du xylème vers les organes aériens,
- 3) un transfert bi-directionnel entre les différents organes de la plante et phloème.

Ce transfert des acides aminés (TrAA) obéit à la cinétique de type michaélienne suivante :

$$\text{TrAA}_{\text{ORG}>\text{ORG}_j} = \text{MS}_{\text{ORG}_j} * (\text{TrAAVmax} * [\text{N-AA}_{\text{ORG}_j}]) / (\text{TrAAKm} + [\text{N-AA}_{\text{ORG}_j}])$$

Par exemple, pour le transport des acides aminés du phloème vers les vieilles tiges ( $\text{TrAA}_{\text{PhloVT}}$ ), on a :

$$\text{TrAA}_{\text{PhloVT}} = \text{MS}_{\text{VT}} * (\text{TrAAVmax} * [\text{AA}_{\text{Phlo}}]) / (\text{TrAAKm} * [\text{AA}_{\text{Phlo}}]),$$

avec  $[\text{AA}_{\text{Phlo}}] = \text{AA}_{\text{Phlo}} / \text{MS}_{\text{Phlo}}$ ,

et  $\text{MS}_{\text{Phlo}} = \text{PercentPhlo} * \text{MStot}$ ,

et où PercentPhlo représente 2.5 % de la matière sèche totale de la plante.

### **B.3.3 Les protéines solubles, les VSP et le N insoluble**

Ces trois fractions métaboliques azotées connaissent une balance entre leur synthèse (Syn) à partir des acides aminés, et leur dégradation (Deg) en acides aminés. Comme pour ces derniers, la synthèse et la dégradation obéissent à des cinétiques enzymatiques michaéliennes du type :

$$\text{Syn}_{i\text{ORG}_j} = \text{MS}_{\text{ORG}_j} * (\text{SynVmax}_i * [\text{N-AA}_{\text{ORG}_j}]) / (\text{RedKm} + [\text{N-AA}_{\text{ORG}_j}])$$

où  $[\text{N-AA}_{\text{ORG}_j}]$  représente la concentration en acides aminés de l'organe,

et où  $\text{SynVmax}_i$  et  $\text{SynKm}_i$  représentent les paramètres apparents de la réaction.

$$\text{Deg}_{i\text{ORG}_j} = \text{MS}_{\text{ORG}_j} * (\text{DegVmax}_i * [\text{N}_i\text{ORG}_j]) / (\text{DegKm} + [\text{N}_i\text{ORG}_j])$$

où  $[\text{N}_i\text{ORG}_j]$  représente la concentration en substrat  $\text{N}_i$  de l'organe

Par exemple, pour la dégradation (ou mobilisation) des protéines solubles du pivot ( $\text{DegProt}_p$ ), on a :

$$\text{DegProt}_p = \text{MS}_p * (\text{DegProtVmax} * [\text{Prot}_p]) / (\text{DegProtKm} * [\text{Prot}_p]),$$

avec  $[\text{Prot}_p] = \text{Prot}_p / \text{MS}_p$

## **C- Résultats**

### **C.1- Ajustement et paramétrage du modèle : Expérimentation 15HN (plantes coupées à 15 cm, avec de fortes réserves azotées initiales)**

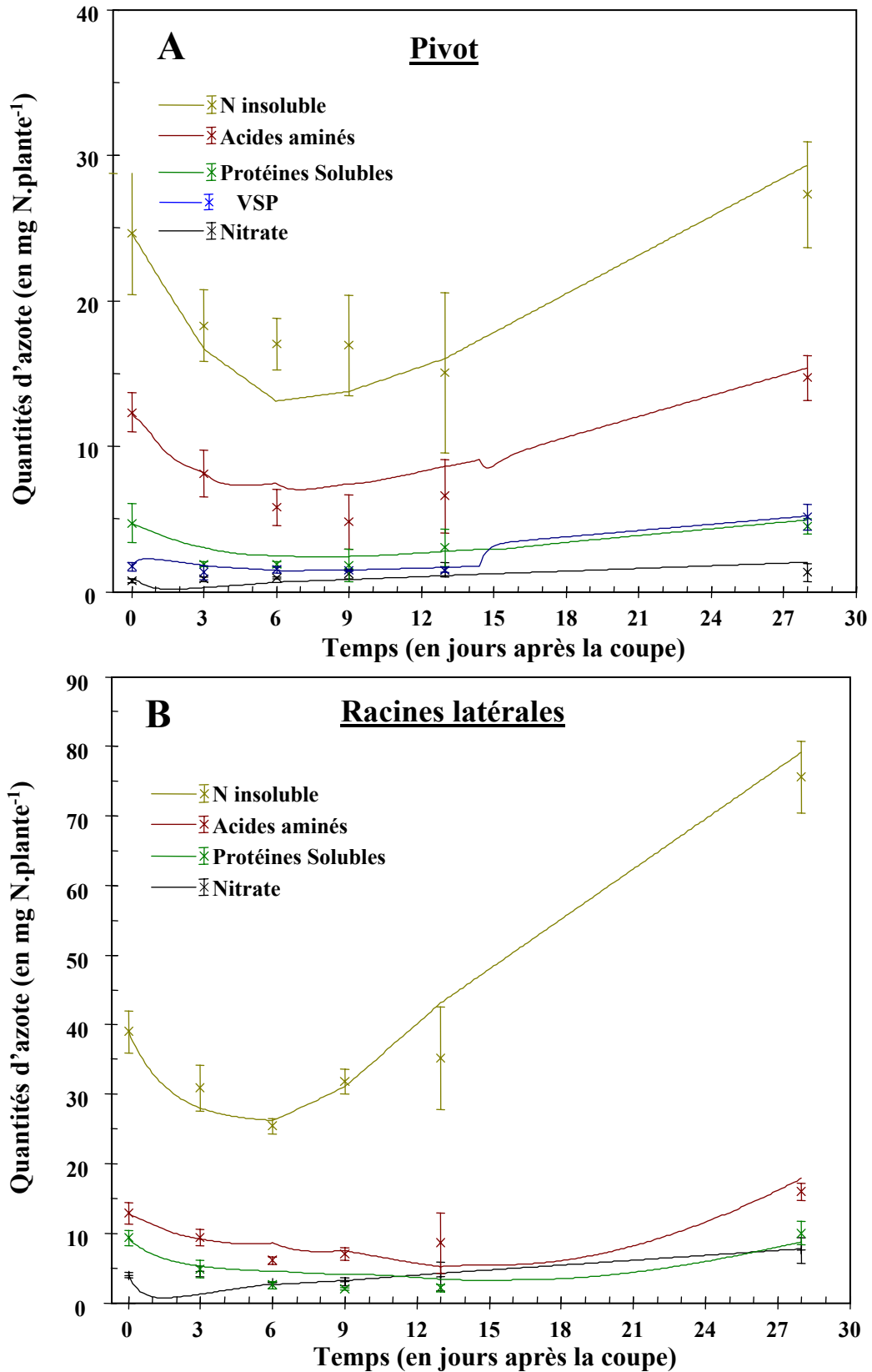
#### **C.1.1 Azote total et pertes racinaires**

L'évolution au cours de la repousse des quantités d'azote total présentes au niveau de la plante entière est présentée sur la figure III.3.A. Au jour de coupe, environ 160 mg d'azote sont retrouvés au niveau des organes épargnés par la coupe, constitués à cette date par les parties racinaires et les chaumes. Du fait des entrées d'azote par absorption au niveau racinaire, le modèle permet de rendre compte de l'augmentation croissante des quantités d'azote total observées au niveau expérimental. Cependant, pendant les trois premiers jours de la repousse, les données expérimentales montrent une diminution de ces quantités qui n'est pas retranscrite au niveau du modèle.

De manière à obtenir un bilan plus satisfaisant de l'azote total au niveau de la plante entière au cours de la repousse, nous avons alors créé un compartiment simulant ces pertes racinaires (voir la section B.2.1 de ce chapitre). Ainsi, ces pertes sont voisines de 20 mg d'N au bout de 6 jours, ce qui représente 12.5% de l'azote total présent au jour de coupe. Les quantités d'azote total mesurées et simulées atteignent alors environ 490 mg d'N au terme de l'expérimentation.

#### **C.1.2 Distribution de l'azote au sein des différents organes**

Cette distribution est déterminée expérimentalement dans les différents organes à chaque date de récolte. Des ajustements ont alors été réalisés et ont permis une simulation dynamique satisfaisante de cette distribution. Les figures III.4, 5 et 6 permettent de suivre l'évolution de cette dernière lors de la repousse après la coupe. L'azote structural (Nins) représente la fraction azotée majoritaire dans ces différents tissus, alors que le nitrate est la plus faible. Ces deux fractions représentent respectivement 66% et 3% de l'azote total des nouvelles feuilles à J28 (Fig. III.4.A).



**Figure III.6:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles VSP et N insoluble) du pivot (A) et des racines latérales (B) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

Pour les organes néoformés (Fig. III. 4A et B), l'ensemble des fractions azotées augmentent quantitativement au cours de la repousse du fait de l'accroissement de biomasse de ces tissus. Les acides aminés et les protéines solubles sont les fractions solubles majoritaires dans ces organes et représentent chacune en moyenne près de 15% de l'azote total du tissu à J28. Cette proportion est néanmoins plus importante en début de repousse où les acides aminés peuvent représenter près de 50% de l'azote total du tissu.

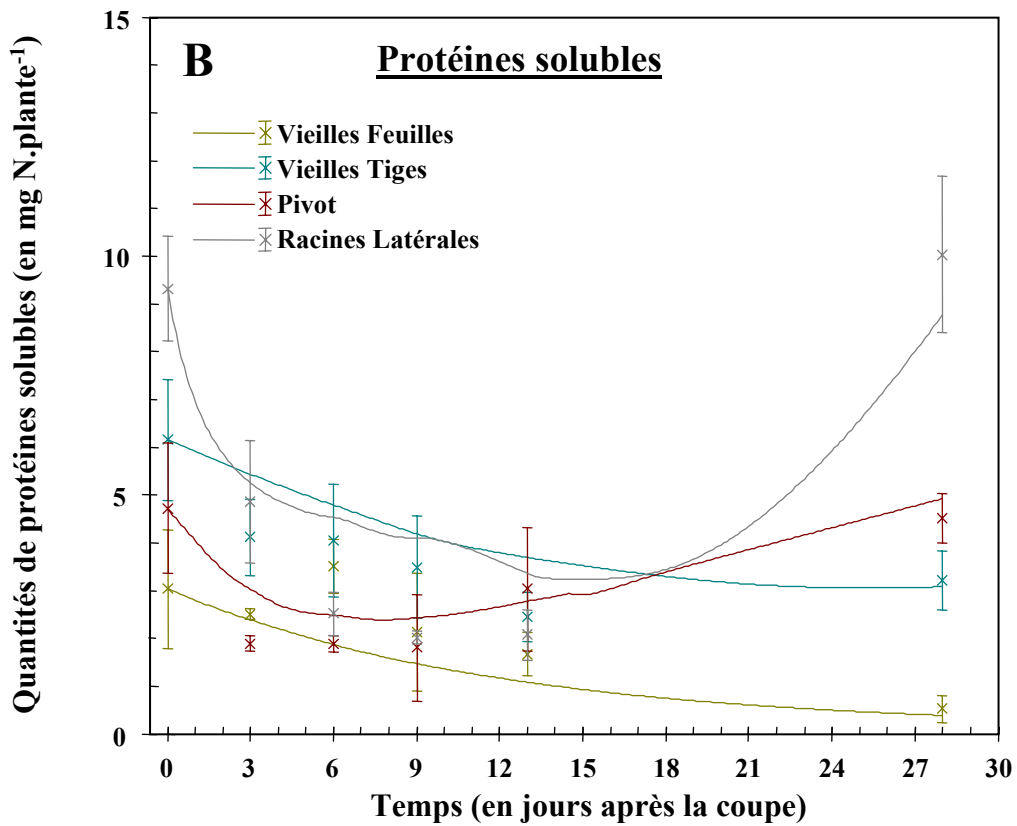
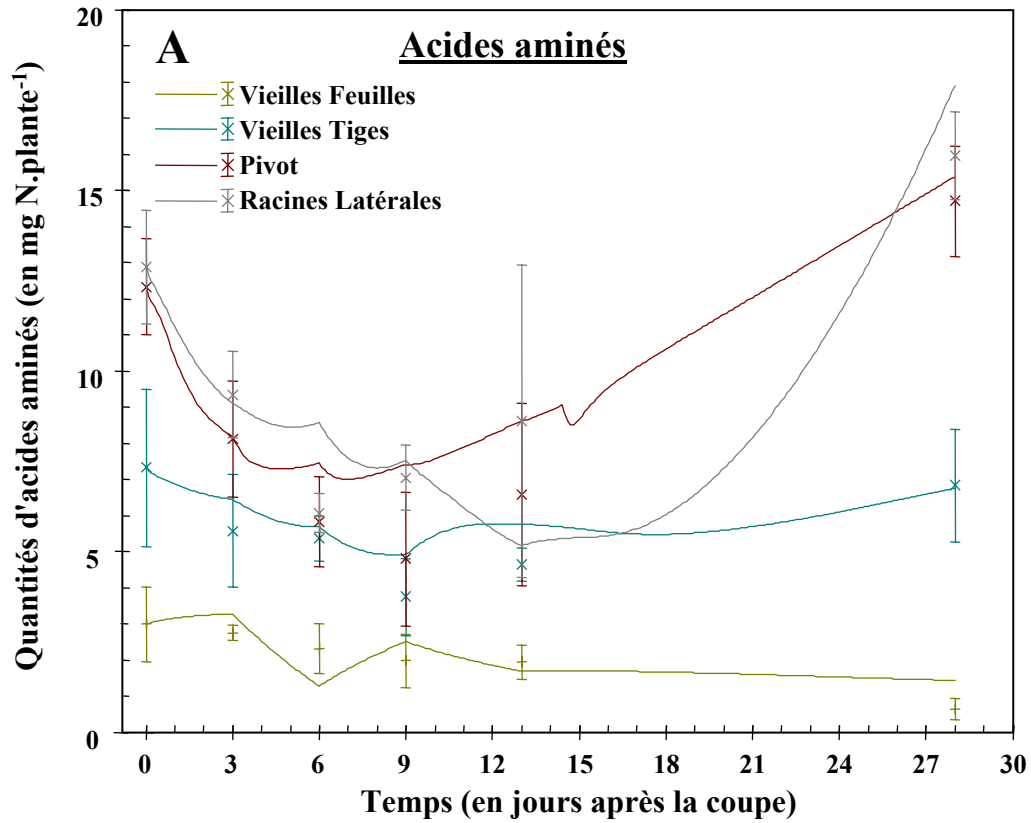
Au niveau des chaumes (Fig. III.5A et B), notamment des vieilles feuilles, on peut constater une diminution de l'ensemble des fractions azotées au cours de la repousse après la coupe. Cependant, cette diminution est quantitativement faible et ne représente que 10 mg d'N mobilisé vers les autres organes après 9 jours de repousse. En ce qui concerne les vieilles tiges, cette diminution ne se produit que lors du début de la repousse, entre J0 et J6. En effet, et à l'exception des protéines solubles qui continuent à décroître, les quantités d'azote présentes dans les autres fractions de cet organe sont stables jusqu'à J28.

Enfin, en ce qui concerne les parties racinaires (Fig. III.6A et B), l'ensemble des différentes fractions azotées diminuent fortement pendant les 6 premiers jours de la repousse après la coupe. Les acides aminés et les protéines solubles du pivot et des racines latérales sont par exemple mobilisés à près de 50% entre J0 et J6. De plus, les acides aminés représentent quantitativement la fraction soluble majoritaire du pivot avec près de 60% de l'azote soluble total, contre seulement environ respectivement 25, 10 et 5% pour les protéines solubles, les VSP et le nitrate au jour de coupe. Au-delà du sixième jour de repousse, une remise en réserve d'azote est observée pour l'ensemble des fractions azotées des parties racinaires. Au terme de l'expérimentation, l'ensemble des fractions azotées ont alors retrouvé, voire dépassé, leur niveau initial observé au jour de coupe.

### **C.1.3 Evolution des acides aminés et des protéines solubles dans les organes épargnés par la coupe**

Les évolutions des deux fractions azotées solubles majeures telles que les acides aminés et les protéines solubles sont respectivement présentées dans les figures III. 7A et B pour l'ensemble des organes épargnés par la coupe et permet d'évaluer la contribution relative de ces différentes fractions à la fourniture d'azote aux parties aériennes en repousse. En ce qui concerne les acides aminés, on peut voir que les plus grandes quantités sont présentes dans les





**Figure III.7:** Evolution des quantités d'acides aminés (A) et de protéines solubles (B) dans les différents organes épargnés par la coupe (vieilles feuilles et tiges, pivot et racines latérales) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ .

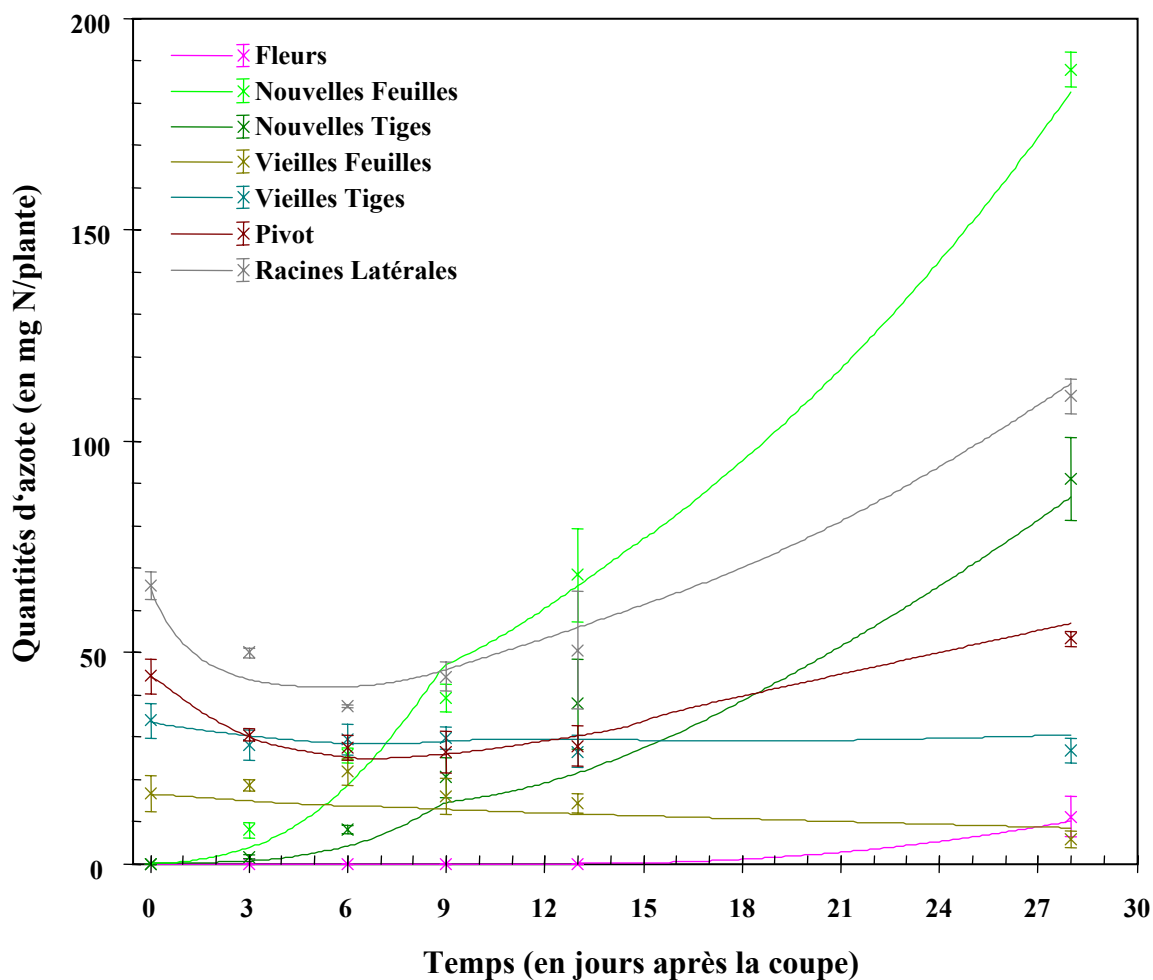
parties racinaires de la luzerne, et sont ensuite suivies par les vieilles tiges et les vieilles feuilles (Fig. 8A). Une forte mobilisation de ces acides aminés est observée dans les parties racinaires pendant les premiers jours après la coupe, alors que cette mobilisation est nettement plus faible dans les chaumes. 9 mg sont par exemple mobilisés entre J0 et J9 pour les parties racinaires contre seulement 2.5 mg pour les chaumes pendant cette même période. Une réaccumulation d'azote sous forme d'acides aminés est ensuite observée jusqu'à J28 pour les parties racinaires alors que l'on observe une certaine stabilité dans les chaumes. Une cinétique de mobilisation / réaccumulation similaire est aussi observée pour les protéines solubles. Les valeurs atteintes à J28 rejoignent celles observées à J0. Cependant, au niveau des chaumes, on n'assiste pas à cette réaccumulation et les quantités d'azote présentes sous forme de protéines solubles continuent à diminuer. Ces quantités sont réduites de près de trois fois entre J0 et J28 pour ces tissus.

#### **C.1.4 Distribution de l'azote au niveau de la plante entière**

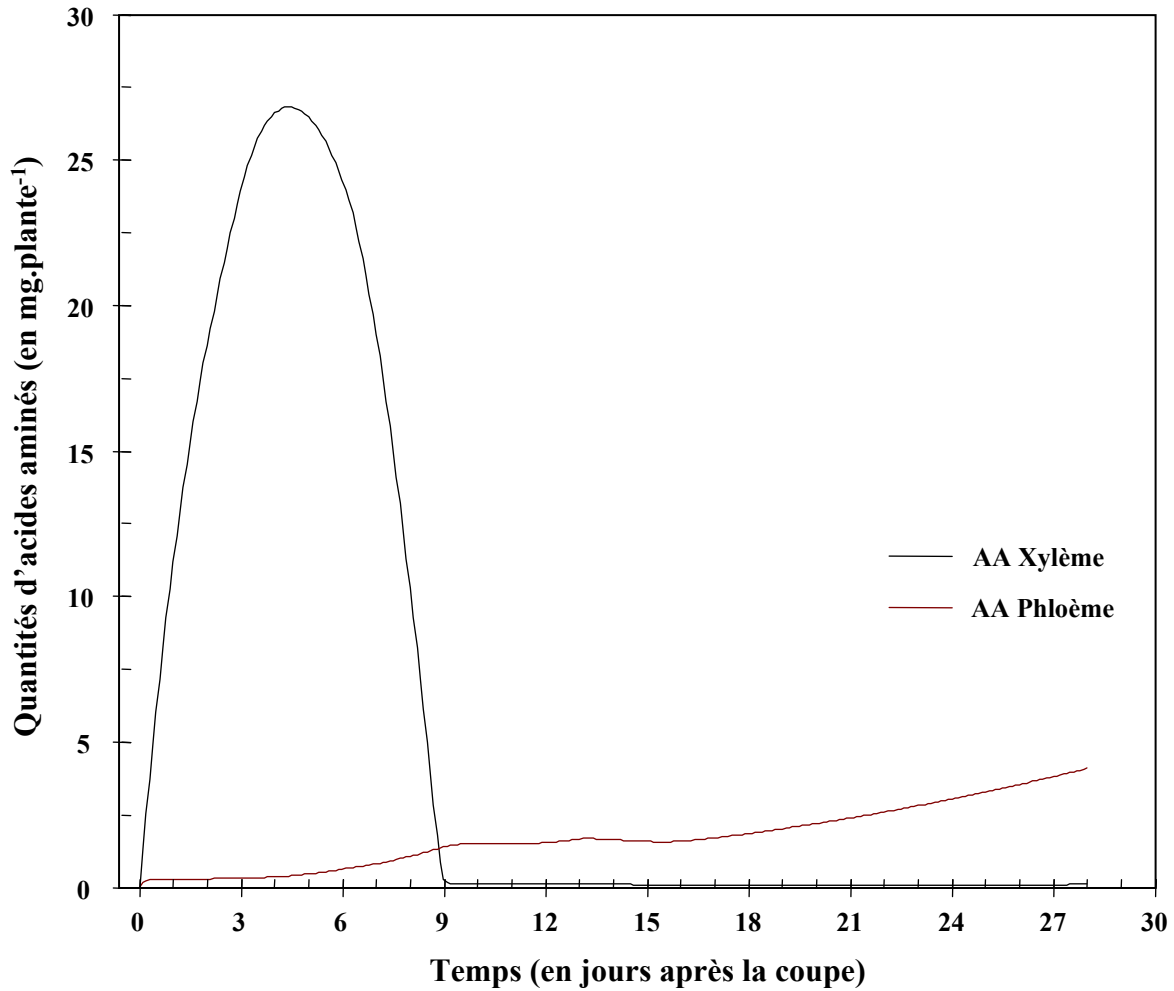
Cette distribution est présentée dans la figure III.8 et résulte de la répartition de l'azote au sein chaque organe organe. L'essentiel de l'azote est distribué vers les parties aériennes en formation telles que les nouvelles feuilles et tiges. Ainsi, plus de 60% de l'azote présent à J28 se retrouve dans ces organes. Pendant les 6 premiers jours de repousse, cet azote provient essentiellement des organes épargnés par la coupe, et plus particulièrement des parties racinaires telles que le pivot et les racines latérales, dont les quantités d'azote chutent fortement. Cependant, du fait des pertes racinaires importantes rencontrées au niveau des racines latérales, le pivot et les chaumes sont les seuls organes pérennes à contribuer activement à la fourniture d'azote aux parties aériennes pendant ces 6 premiers jours. Au-delà de cette première période, on assiste ensuite à une réaccumulation d'azote dans les parties racinaires alors que les chaumes continuent à perdre de faibles quantités d'azote jusqu'à la fin de la repousse. A cette date, respectivement 1 et 6 % de l'azote sont présent dans les vieilles feuilles et tiges contre environ 11 et 22% pour le pivot et les racines latérales.

#### **C.1.5 Evolution des quantités d'acides aminés dans le xylème et le phloème au cours de la repousse**

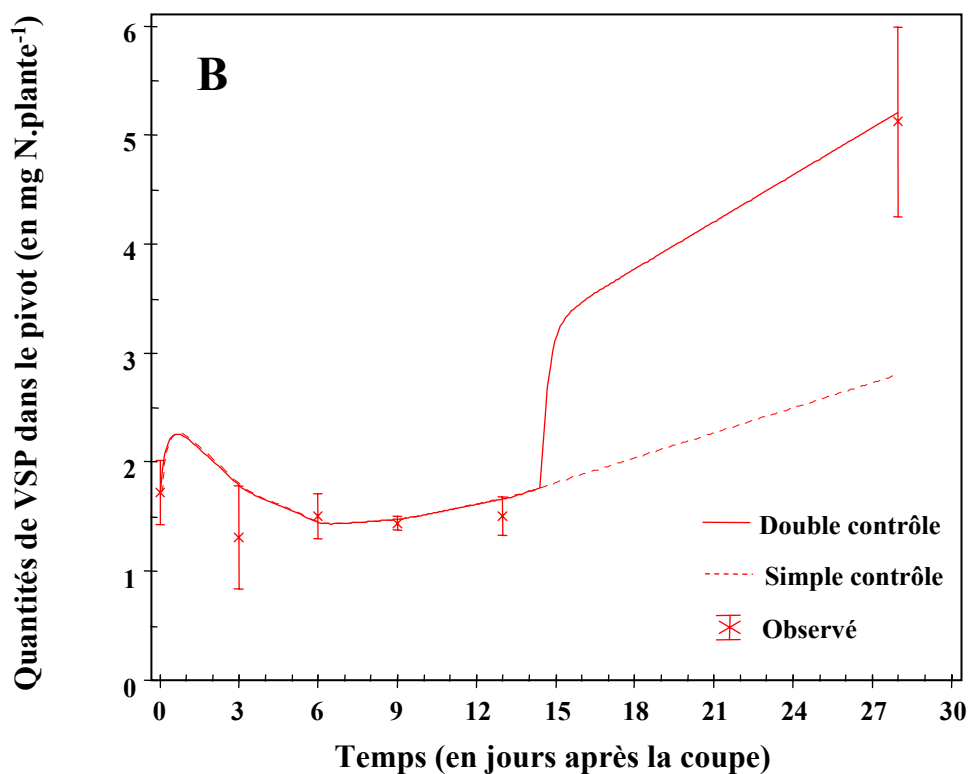
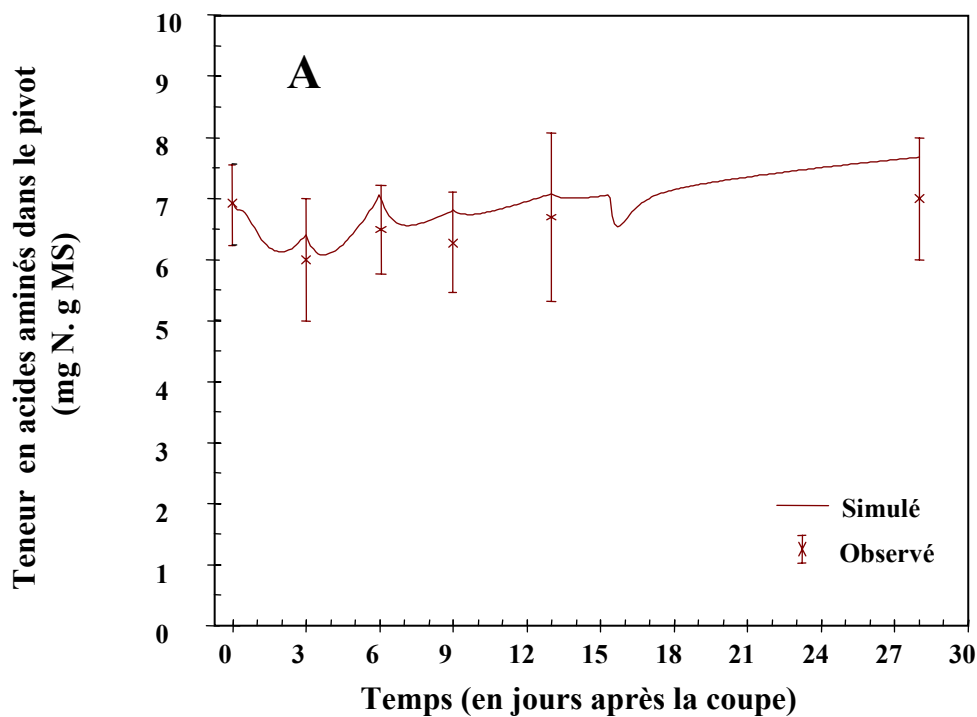
De manière à assurer un transfert efficace de l'azote entre les différents organes de la plante au cours de la repousse, nous avons créé deux compartiments représentatifs du xylème



**Figure III.8:** Evolution de la distribution des quantités d'azote total simulées (trait plein) et observées (x) dans les différents organes (fleurs, nouvelles feuilles et tiges, vieilles feuilles et tiges, pivot et racines latérales) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .



**Figure III.9:** Estimation des quantités d'azote sous la forme d'acides aminés et circulant dans les vaisseaux du xylème et du phloème au cours de la repousse après la coupe.

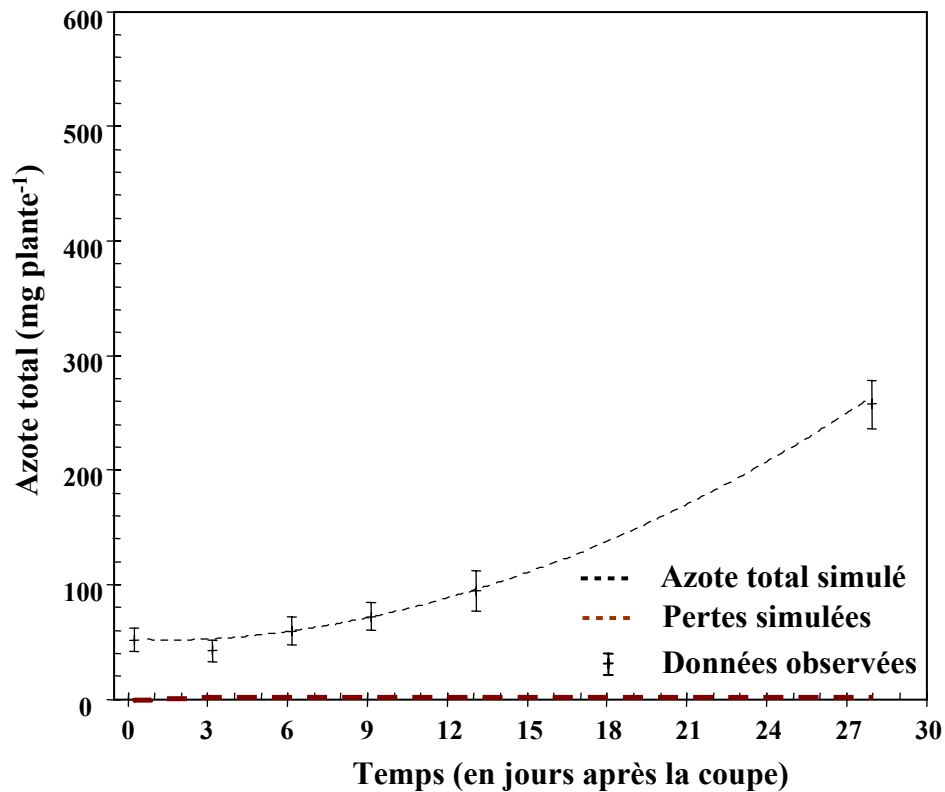


**Figure III.10:** Evolution de la teneur en acides aminés (A) et des quantités d'azote présentes sous la forme de VSP (B) dans le pivot au cours de la repousse après la coupe selon l'hypothèse générale du modèle (simple contrôle par la concentration locale en acides aminés; pointillé) ou selon l'hypothèse conditionnelle (double contrôle par la concentration locale en acides aminés et par le rapport  $AA_{Phlo}/AA_{Xyl}$ ; trait plein). Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

et du phloème. Le comportement au cours de la repousse de ces deux compartiments est établi en fonction des connaissances bibliographiques, et a été ajusté à partir des données obtenues pour les flux de nitrate et d'acides aminés au sein des différents organes. Les quantités d'acides aminés présentes au niveau du xylème et du phloème au cours de la repousse sont reportées dans la Figure III.9. Les quantités présentes dans le xylème augmentent très fortement pendant les 5 premiers jours après la coupe, avec environ 25 mg d'N à cette date, puis diminuent brutalement entre J5 et J9, pour finalement rester à des valeurs proches de 0.5 mg d'N jusqu'à J28. Inversement, on assiste à un chargement progressif du phloème en acides aminés tout au long de l'expérimentation, qui atteint environ 5 mg d'N à J28. On peut de plus remarquer qu'à partir de J9 les quantités d'N du phloème sont supérieures à celles du xylème, et cet écart s'accroît jusqu'à J28.

### **C.1.6 Cas particulier des VSP du pivot**

Aucune mobilisation de VSP n'est observée au cours de cette expérimentation (Fig. III.10B). Ainsi, lors des premiers jours suivant la coupe, les quantités d'N présentes sous forme de VSP représentent environ 1,5 mg N.plante<sup>-1</sup>. Une accumulation transitoire d'environ 25% est de plus observée dans notre modèle lors des quelques heures suivant la coupe puis revient au niveau des valeurs initiales au bout de 6 jours de repousse. Enfin, entre J13 et J28, une forte accumulation de VSP est expérimentalement observée et les quantités de VSP sont alors triplées entre ces deux dates. Cependant, la concentration en acides aminés du pivot reste relativement stable pendant cette même période (Fig. III.10A) et ne peut à elle seule expliquer cette forte accumulation. Une hypothèse conditionnelle a donc été testée pour permettre une synthèse accrue (avec le paramètre SynVSPVmax augmenté de 50%) dans des conditions particulières, notamment celles rencontrées au cours de l'expérimentation 15HN. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que le rapport des quantités d'azote présentes sous forme d'acides aminés dans le phloème ( $AA_{\text{Phloème}}$ ) et le xylème ( $AA_{\text{Xylème}}$ ) étaient déterminantes pour cet équilibre, et qu'elles devaient dépasser une certaine valeur seuil ( $AA_{\text{Phloème}}/AA_{\text{Xylème}} > 15$ ) pour autoriser une synthèse accrue.



**Figure III.11:** Evolution des quantités d'azote total simulées (pointillé) et observées au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

## **C.2- Validation du modèle : Expérimentation 6LN (plantes coupées à 6 cm, avec de faibles réserves azotées initiales) :**

La validation du modèle sur l'expérimentation 6LN a nécessité le réajustement de 7 paramètres exclusivement impliqués dans les vitesses maximales i) du transfert d'azote par le xylème ou le phloème au niveau des organes racinaires, ainsi que ii) dans les réactions anaboliques telles que la réduction du nitrate ou la synthèse de protéines solubles et de N structural. Ces vitesses maximales de synthèse sont réduites d'environ 50% en moyenne par rapport à l'expérimentation 15HN. Les 7 paramètres modifiés sont présentés dans le tableau III.3 et des exemples des conséquences de la conservation du paramétrage réalisé pour l'expérimentation 15HN sont plus particulièrement présentés sur les figures III.12 et 15.

### **C.2.1 Azote total et pertes racinaires**

Les évolutions au cours de la repousse des quantités d'azote total et des pertes racinaires au niveau de la plante entière sont respectivement présentées sur les figures III.11 et 12. Cinquante mg d'azote sont retrouvés au jour de coupe dans les organes pérennes (Fig. III.11). Cette quantité augmente tout au long de la repousse du fait de l'absorption racinaire de nitrate (données non présentées), pour finalement atteindre environ 260 mg au terme de l'expérimentation (J28). Une très faible quantité d'azote est perdue au niveau racinaire (Fig. III.12) pendant les 6 premiers jours de la repousse. Ces pertes racinaires sont alors voisines de 3 mg d'N au bout de 6 jours, ce qui représente 6% de l'azote présent au jour de coupe.

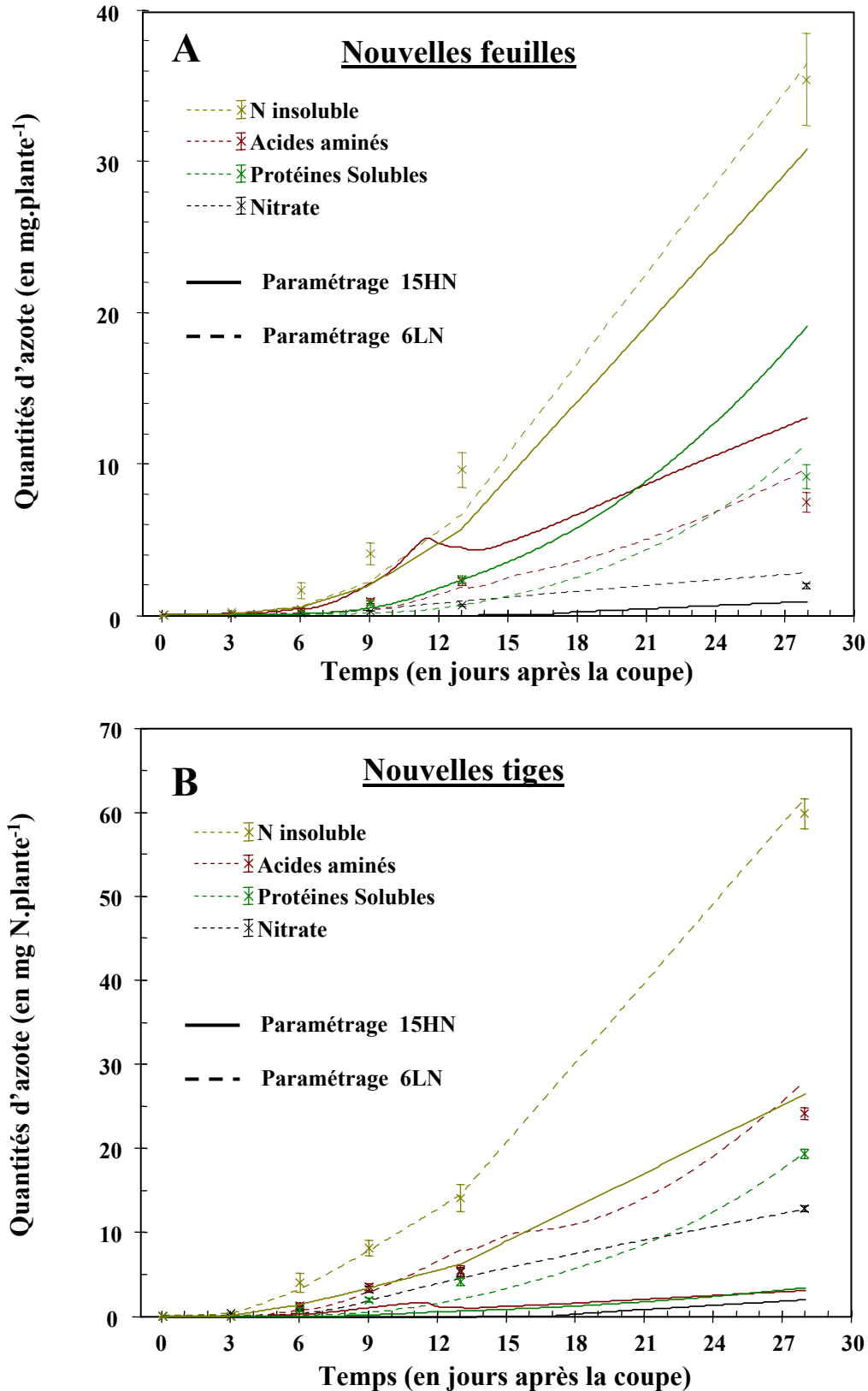
### **C.2.2 Distribution de l'azote au sein de chaque organe**

Les figures III.12, 13 et 14 permettent de suivre l'évolution de la distribution de l'azote entre les différentes fractions métaboliques des principaux organes de la luzerne lors de la repousse après la coupe. Les conséquences de la conservation du paramétrage 15HN sont uniquement présentées pour la figure III.12. Lorsque l'on garde ce paramétrage, la gestion du métabolisme azoté est insatisfaisante au niveau des organes aériens en repousse et nécessite de nouveaux ajustements, en particulier sur les 7 paramètres présentés dans le tableau III.3. Ce réajustement permet de rétablir une simulation optimale de la distribution de

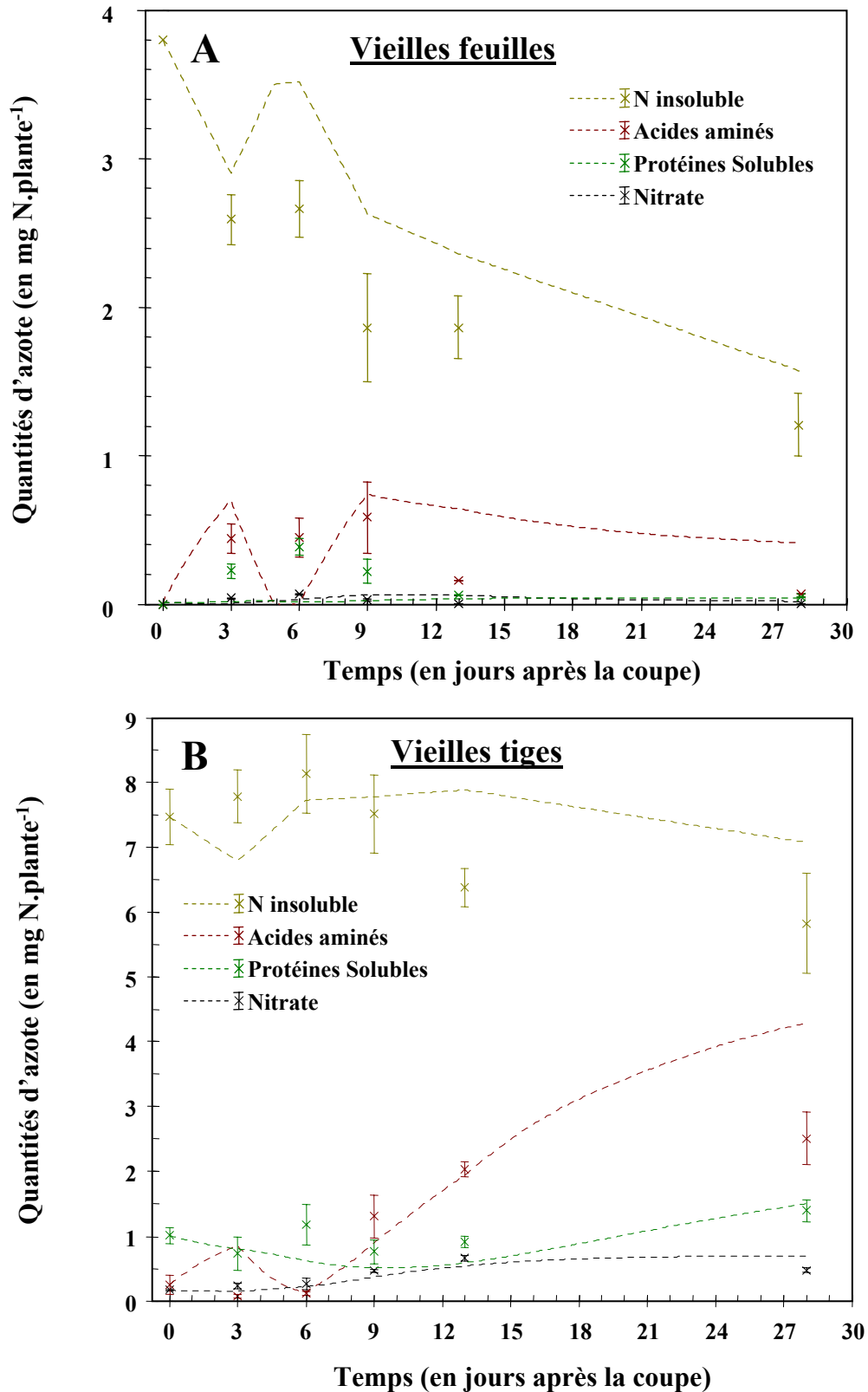


**Tableau III.3:** Liste des paramètres réajustés pour l'expérimentation 6LN.

<b>Symbole</b>	<b>Définition</b>	<b>Valeur 15HN</b>	<b>Valeur 6LN</b>	<b>Unité</b>
DegProtVmaxOld	Vitesse maximale de dégradation des protéines solubles des organes épargnés par la coupe	0.025	0.045	mg N. jour <sup>-1</sup>
RedVmax	Vitesse maximale de réduction du nitrate en acides aminés	0.01	0.005	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynInsVmax	Vitesse maximale de synthèse de l'N insoluble	0.001	0.0006	mg N. jour <sup>-1</sup>
SynProtVmax	Vitesse maximale de synthèse des protéines solubles	0.0075	0.0055	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrAAVmaxOld	Vitesse maximale de transport des acides aminés des organes épargnés par la coupe	0.01	0.03	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrNO3Vmax	Vitesse maximale de transport du nitrate	0.35	0.65	mg N. jour <sup>-1</sup>
TrNO3VmaxOld	Vitesse maximale de transport du nitrate des organes épargnés par la coupe	0.05	0.1	mg N. jour <sup>-1</sup>



**Figure III.12:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) des nouvelles feuilles (A) et nouvelles tiges (B) au cours de la repousse après la coupe avec le paramétrage initial 15HN (traits pleins) et après reparamétrage 6LN (pointillés). Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .



**Figure III.13:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) des vieilles feuilles (A) et vieilles tiges (B) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ .

l'azote au sein de chaque organe. On observe alors que l'azote structural (N insoluble) représente la fraction azotée majoritaire dans ces différents tissus, alors que le nitrate est la plus faible.

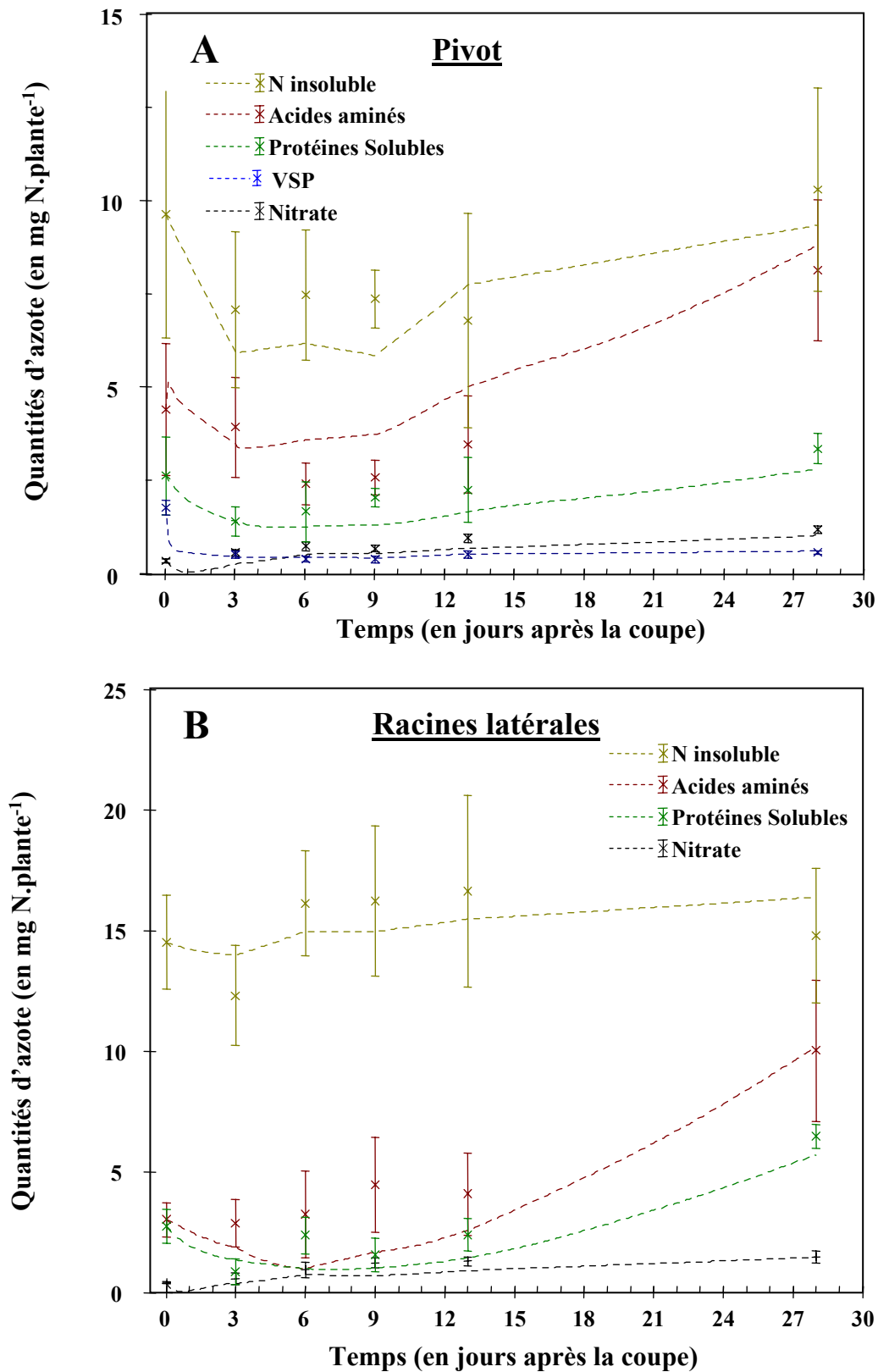
Pour les organes néoformés (Fig. III.12A et B), l'ensemble des fractions azotées augmente quantitativement au cours de la repousse du fait de l'accroissement de biomasse de ces tissus. Les acides aminés et les protéines solubles sont les fractions solubles majoritaires dans ces organes et représentent chacune en moyenne près de 18% de l'azote total du tissu à J28.

Dans cette expérimentation, les chaumes contiennent très peu d'azote soluble mobilisable (nitrate, acides aminés et protéines solubles) au cours de la repousse (Fig. III.13A et B). Les vieilles feuilles ne contiennent par exemple que moins de 0.6 mg d'azote par plante durant toute l'expérimentation, soit moins de 1% de l'azote total présent au jour de coupe. Pour les vieilles tiges, et bien que quantitativement faibles, ces quantités potentiellement mobilisables sont plus importantes et l'on assiste même à une forte accumulation d'azote sous forme d'acides aminés entre J6 et J30.

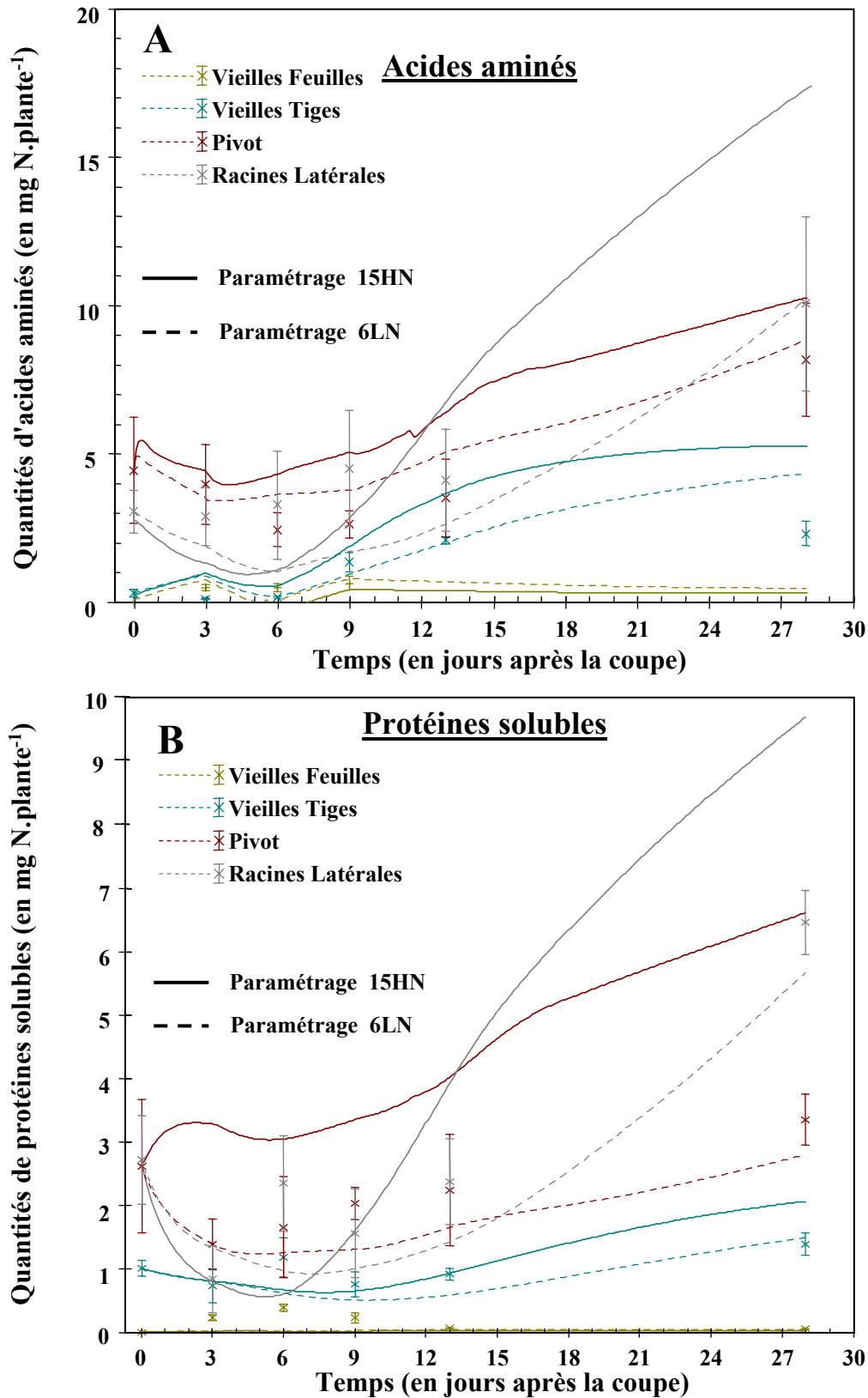
Enfin, en ce qui concerne les parties racinaires (Fig. III.14A et B), les quantités d'azote sous forme d'acides aminés et de protéines solubles diminuent fortement (plus de 40% en moyenne) pendant les 6 premiers jours de la repousse après la coupe, puis augmentent à nouveau jusqu'à J28. Les acides aminés représentent par ailleurs la fraction azotée majoritaire dans ces organes, avec plus de 30% en moyenne de l'azote total à J28, contre environ seulement 16% pour les protéines solubles. En ce qui concerne le nitrate, une augmentation croissante de cette fraction est observée au cours de la repousse, pour finalement atteindre près de 1 mg d'azote par plante à J28.

### **C.2.3 Evolution des acides aminés et des protéines solubles dans les organes épargnés par la coupe**

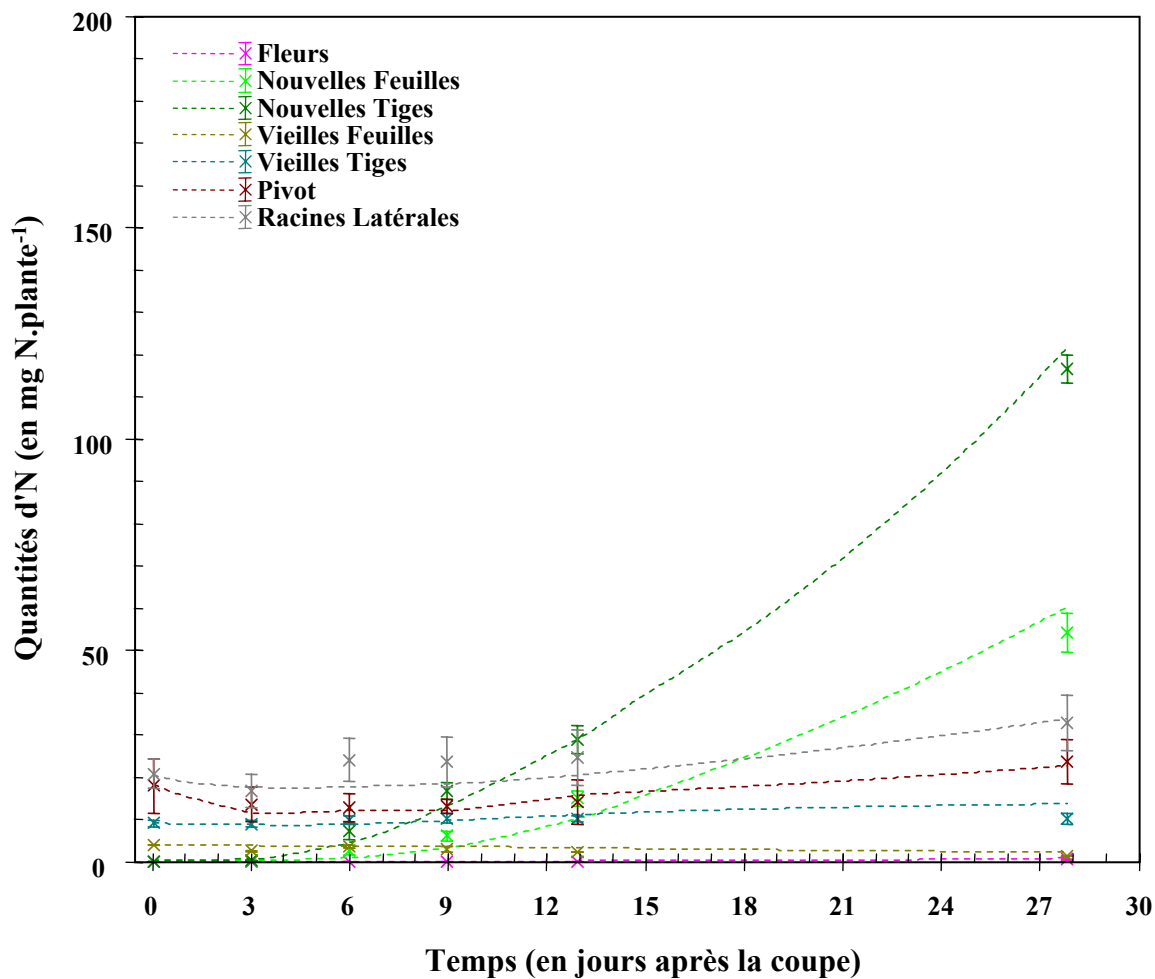
Les évolutions des deux fractions azotées solubles majeures telles que les acides aminés et les protéines solubles sont respectivement présentées dans les figures III.15A et B pour l'ensemble des organes pérennes. Les conséquences de la conservation du paramétrage utilisé pour l'expérimentation 15HN sont aussi présentées. Il apparaît que la gestion des



**Figure III.14:** Evolution de l'allocation de l'azote entre les différentes fractions biochimiques (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) du pivot (**A**) et des racines latérales (**B**) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ .



**Figure III.15:** Evolution des quantités d'acides aminés (A) et de protéines solubles (B) dans les différents organes pérennes (vieilles feuilles et tiges, pivot et racines latérales) au cours de la repousse après la coupe avec le paramétrage 15HN (traits pleins) ou après reparamétrage 6LN (pointillés) ajustement des paramètres. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .



**Figure III.16:** Evolution de la répartition des quantités d'azote total simulées (pointillé) et observées (x) dans les différents organes (fleurs, nouvelles feuilles et tiges, vieilles feuilles et tiges, pivot et racines latérales) au cours de la repousse après la coupe. Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

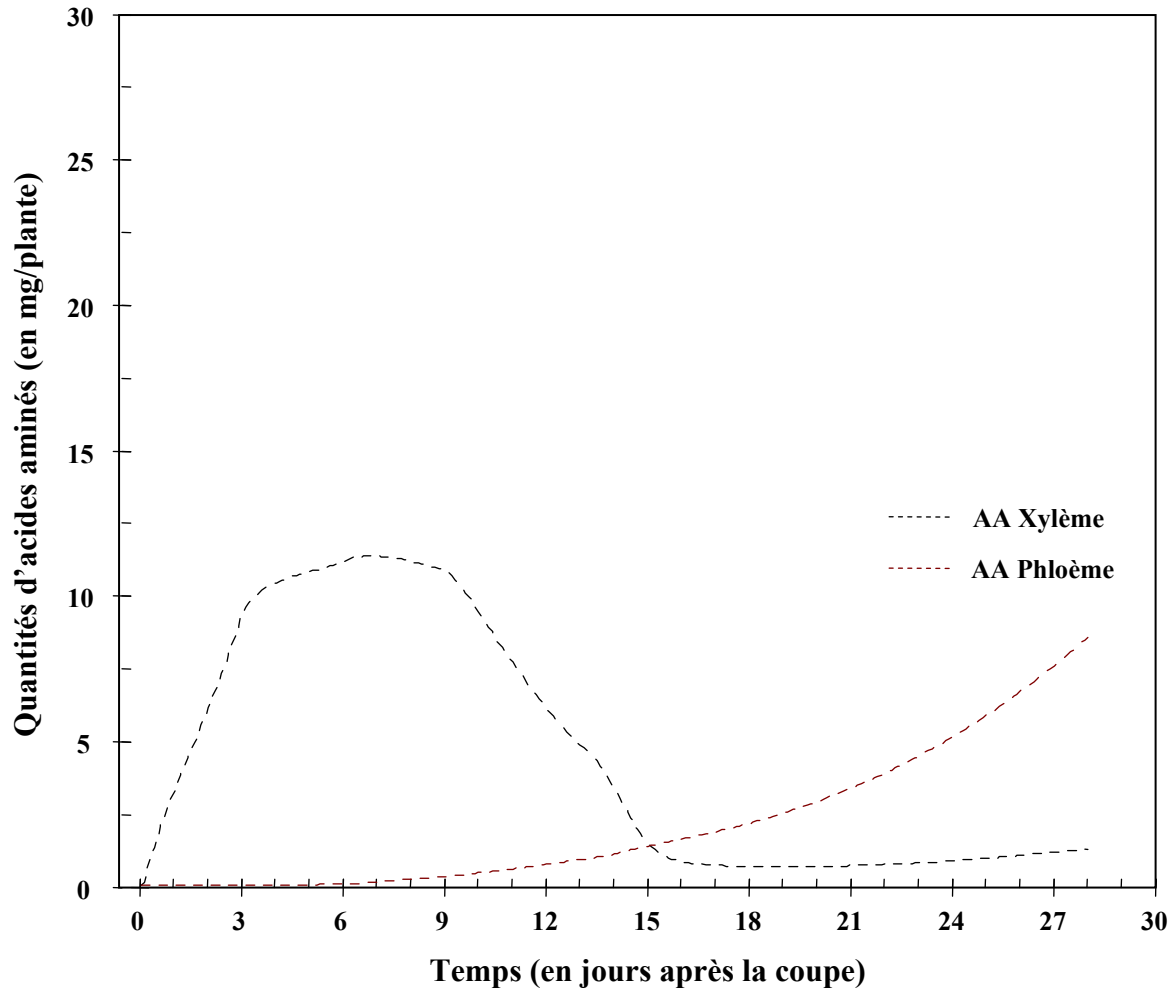
acides aminés et des protéines solubles est fortement modifiée, en particulier au niveau du pivot et des racines latérales. Les quantités simulées pour ces deux fractions sont presque doublées pour les racines latérales et le pivot à J28, par comparaison avec les quantités simulées après réajustement des paramètres, ce qui traduit des activités de synthèse trop élevées, ou des vitesses de transfert par le xylème trop faibles. Le réajustement des paramètres permet alors d'obtenir à nouveau une simulation optimale de la gestion de l'azote au niveau de ces différents organes.

Les plus grandes quantités d'azote soluble présent sous la forme d'acides aminés ou de protéines solubles sont observées dans le pivot et les racines latérales et représentent ensemble près de 90% de l'azote soluble total à J0. Une mobilisation importante de ces deux fractions est rencontrée dans les parties racinaires pendant les 6 premiers jours de repousse, puis on assiste à leur forte réaccumulation jusqu'à J28. Un retour aux valeurs initiales mesurées est ainsi observé dans ces tissus. Cependant, une accumulation significative d'azote sous la forme d'acides aminés et de protéines solubles est aussi observée dans les chaumes entre J6 et J28, mais pour les vieilles tiges seulement. Des quantités d'azote presque nulles sont en effet mesurées pour ces deux fractions dans les vieilles feuilles.

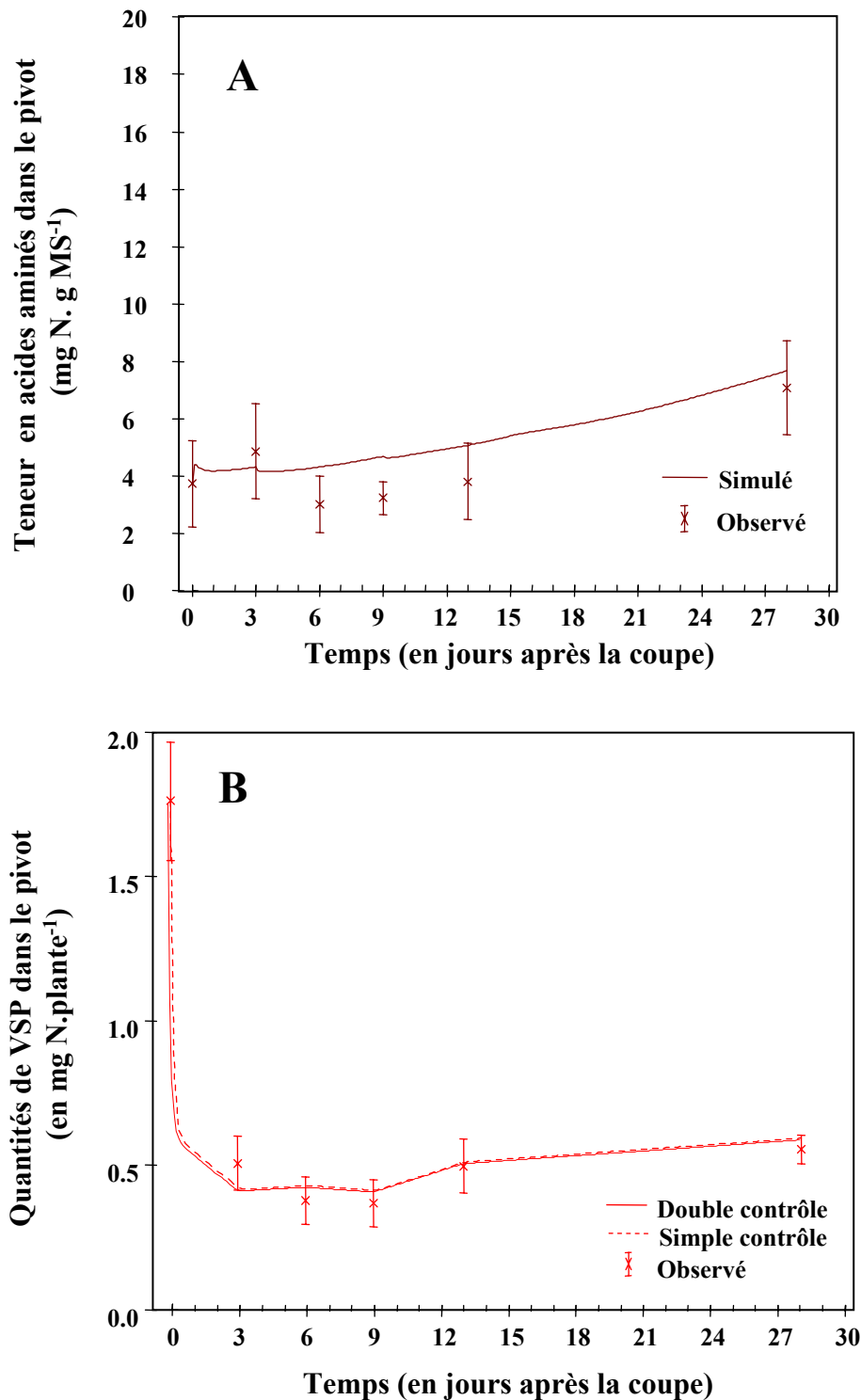
#### **C.2.4 Distribution de l'azote au niveau de la plante entière**

L'allocation quantitative de l'azote entre les différents organes de la luzerne au cours de la repousse est présentée sur la figure III.18. L'azote est essentiellement distribué vers les organes aériens en formation, qui contiennent plus de 70% de l'azote total à J28. Pendant les 6 premiers jours de repousse, cet azote provient exclusivement des parties racinaires, et plus particulièrement du pivot, dont les quantités d'azote chutent de près de 50% pendant cette période. Au-delà de cette première période, une augmentation des quantités d'azote est observée pour l'ensemble des organes pérennes. Cette augmentation est néanmoins faible dans les chaumes qui ne représentent que moins de 6% de l'azote total à J28.





**Figure III.17:** Simulation des quantités d'acides aminés circulant dans les vaisseaux du xylème (en noir) et du phloème (en rouge) au cours de la repousse après la coupe.



**Figure III.18:** Evolution de la teneur en acides aminés (A) et des quantités d'azote présentes sous la forme de VSP (B) dans le pivot au cours de la repousse après la coupe selon l'hypothèse générale du modèle (simple contrôle par la concentration locale en acides aminés; pointillé) ou selon l'hypothèse conditionnelle (double contrôle par la concentration locale en acides aminés et par le rapport des quantités d'azote circulant dans le phloème et le xylème; trait plein). Les données observées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n=3$ .

### **C.2.5 Evolution des des quantités d'acides aminés dans le xylème et le phloème au cours de la repousse**

Les quantités d'azote présentes sous la forme d'acides aminés au niveau du xylème et du phloème sont reportées dans la figure III.19. Les quantités présentes dans le xylème augmentent fortement pendant les 7 premiers jours après la coupe, avec environ 12 mg d'N à cette dernière date, puis diminuent de la même manière jusqu'à J15, pour finalement rester à des valeurs proches de 2 mg d'N jusqu'à J28. Parallèlement, on assiste à un chargement croissant du phloème en acides aminés tout au long de l'expérimentation, et particulièrement à partir de 15 jours de repousse. Neuf mg d'N sont alors retrouvés dans ce compartiment à J28. On peut de plus remarquer qu'à partir de J15 les quantités d'N du phloème sont supérieures à celles du xylème, et cet écart va en s'accroissant jusqu'à J28.

### **C.2.6 Cas particulier des VSP du pivot**

Une forte mobilisation des VSP est observée au cours de cette expérimentation, sans réaccumulation en fin de repousse (Fig. III.20B). Les quantités d'azote présentes sous forme de VSP chutent ainsi rapidement de plus de 70% pendant les trois premiers jours de la repousse, puis restent sensiblement inchangées jusqu'à la fin du traitement. La concentration en acides aminés du pivot augmente quant à elle constamment au cours de la repousse mais reste cependant inférieure à 7 mg d'N. g MS<sup>-1</sup> (Fig. III.20A). Par conséquent, et en dépit d'un rapport des acides aminés du phloème sur ceux du xylème particulièrement favorable (Fig. III.20), aucune accumulation de VSP n'est observée en fin de repousse et un double contrôle de la synthèse de VSP par ce rapport demeure sans effet dans ces conditions.

**Tableau III.4:** Quantités d'azote mobilisées, contribution des différents organes épargnés par la coupe (racines latérales, pivot et chaumes) et estimations fournies par la modèle sur la contribution des fractions N associées (nitrate, acides aminés, protéines solubles, VSP et N insoluble) à la fourniture d'azote aux parties aériennes en croissance pour les traitements 15HN et 6LN après 6 jours de repousse. Les valeurs données pour les quantités mobilisées représentent la moyenne  $\pm$  E.S. pour  $n = 3$ .

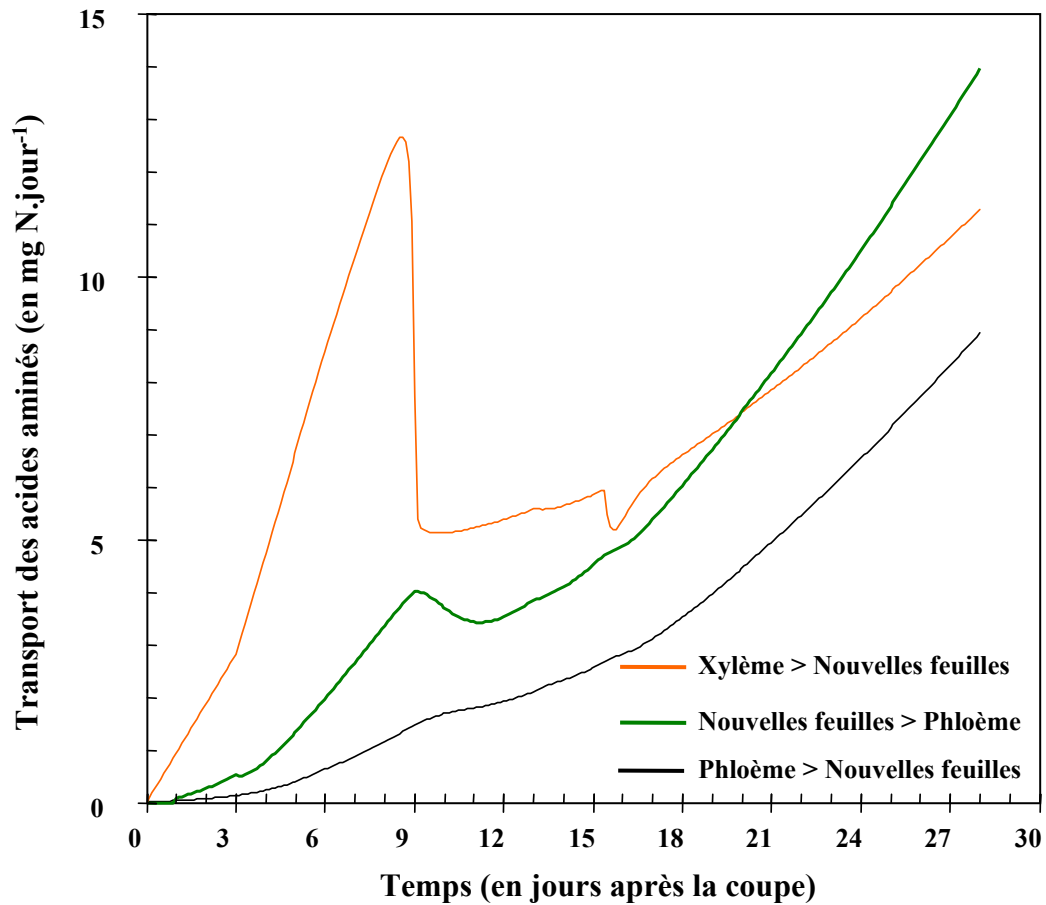
Quantités mobilisées (mg N.plante <sup>-1</sup> )	Contributions des organes pérennes (en %)		Contributions des fractions N (en %)					
			Nitrate	Acides aminés	Protéines solubles	VSP	N insoluble	
<b>15HN</b>  24,35 $\pm$ 1.35	{	<b>Chaumes</b>	18,10	3,12	44,54	47,72		4,62
		<b>Pivot</b>	69,55	1,28	38,32	16,81	2,51	41,08
		<b>Racines latérales</b>	12,35	3,67	23,82	23,81		48,70
<b>6LN</b>  5,86 $\pm$ 1.84	{	<b>Chaumes</b>	7,25	5,41	52,94	30,12		11,53
		<b>Pivot</b>	87,17	0,26	34,06	16,46	23,60	25,62
		<b>Racines latérales</b>	5,58	16,00	17,80	46,48		19,72

## **D- Discussion**

### **D.1- Apports du modèle à l'étude de la physiologie de la plante en repousse**

Les travaux de modélisation réalisés dans le cadre de cette thèse ont abouti au développement d'un modèle conceptuel, retranscrit au niveau mathématique, gérant la distribution de l'azote au cours de la repousse chez la luzerne. **Ce modèle permet d'obtenir des simulations très proches des valeurs observées au niveau expérimental, et permet une bonne description de la répartition et de l'allocation de l'azote au cours de la repousse après la coupe chez la luzerne.** Cette description est aussi satisfaisante pour l'N insoluble que pour le nitrate, qui représentent respectivement environ 65 et 5% de l'azote total de chaque organe. Cette description est toutefois rendue plus difficile lorsque les quantités d'azote sont très faibles, notamment en début de repousse.

**Le modèle permet de prendre en compte les différents organes structuraux** de la luzerne tels que les tiges, les feuilles, le pivot ou encore les racines latérales, et de déterminer à chaque instant de la repousse leur statut azoté particulier. **Cette distinction des organes principaux de la luzerne est plus large que pour de nombreux modèles de distribution** de type « Thornley » limités à quelques compartiments morphologiques généraux comme les parties aériennes et racinaires (Thornley, 1972 ; Thornley et Cannell, 1992 ; Minchin et al., 1993 ; Levy, 2000). Cette distinction permet alors de **mieux connaître le rôle et le comportement spécifique de ces différents organes à chaque instant au niveau de la plante entière, et de relier les informations obtenues à des données agronomiques ou physiologiques pertinentes.** Par rapport au modèle MeCaNiCAL (Tabourel-Tayot et Gastal, 1998), limité à deux compartiments morphologiques généraux pour une graminée en repousse, notre modèle autorise par exemple l'analyse des organes aériens néoformés et permet d'avoir accès à la production et à la composition biochimique de ces organes au cours de la repousse. De la même manière, cette distinction permet de comparer la contribution des différents organes épargnés par la coupe sur le potentiel de croissance. Quel que soit le niveau initial des réserves organiques, le Tableau III.4 permet ainsi de voir que le pivot est toujours l'organe qui contribue le plus à la fourniture d'azote aux parties aériennes en repousse au bout



**Figure III.19:** Simulation de l'import d'acides aminés par les nouvelles feuilles à partir du xylème (en orange) ou du phloème (en noir), et de l'export d'acides aminés dans le phloème par les nouvelles feuilles (en vert), au cours de la repousse après la coupe chez les plantes 15HN.

de 6 jours de repousse. La contribution de cet organe est ensuite suivie à cette même date par celle des chaumes et celle des racines latérales. **De plus, la décomposition de chaque organe en compartiments métaboliques permet à la fois de suivre l'évolution de différentes fractions azotées et de proposer une analyse explicative dynamique du fonctionnement de l'organe au cours de la repousse.** Cette décomposition permet en outre de préciser et de quantifier la contribution relative des différentes fractions métaboliques les unes par rapport aux autres sur le potentiel de croissance. Le tableau III.4 permet ainsi de quantifier la contribution relative et spécifique des acides aminés, des protéines solubles et des VSP du pivot à ce potentiel de croissance, et ce pour des conditions initiales contrastées. Il apparaît ainsi que ce sont les acides aminés, aux côtés des protéines solubles (hors VSP), qui contribuent le plus à cette fourniture pendant les 6 premiers jours de repousse. On peut toutefois remarquer que les VSP contribuent 10 fois plus à cette fourniture pour les plantes présentant de faibles statuts N initiaux (plantes 6LN) que pour les plantes présentant de forts statuts N initiaux (plantes 15HN). **Une telle estimation reste difficile à mettre en évidence avec une approche physiologique classique,** et nécessiterait l'utilisation de techniques lourdes de double marquage au  $^{15}\text{N}$  et au  $^{13}\text{C}$  qui permettraient alors de suivre l'incorporation et la distribution de ces deux isotopes au niveau des acides aminés et des protéines (Avice *et al.*, 1996a ; Volenec *et al.*, 1998). Cependant, le fait de décomposer chaque organe en de nombreux compartiments structuraux et métaboliques pourrait augmenter la **difficulté d'évaluation du modèle.** Cette difficulté, induite par l'accroissement parallèle du nombre de paramètres et de processus physiologiques pris en compte (Dewar, 1993), est **toutefois limitée dans notre modèle par sa conception « modulaire » présentant une grande homogénéité de fonctionnement entre les différents organes et fonctions métaboliques.** Par exemple, les différentes fonctions sont toutes basées sur des cinétiques enzymatiques michaeliennes de premier ordre. Cette homogénéité permet alors de réduire significativement le nombre de paramètres pris en compte, et limite la difficulté d'évaluation du modèle.

## **D.2- Nouvelles informations et nouveaux questionnement générés par le modèle**

**Le modèle proposé permet d'avoir accès à des données difficilement mesurables au niveau de la plante entière.** Il est par exemple possible d'estimer les flux d'acides aminés au niveau de l'interface entre les nouvelles feuilles d'une part, et le xylème et le phloème

d'autre part (Fig. III.19). **Le modèle permet ainsi de mettre en évidence que les nouvelles feuilles sont vraisemblablement majoritairement alimentées par le xylème en début de repousse**, et que ces organes sont des puits pour les acides aminés au cours de la repousse. Ces résultats confirment de précédents travaux montrant que la réduction du nitrate et la synthèse d'acides aminés est majoritairement réalisée au niveau racinaire chez la luzerne (Pate, 1980, Peoples *et al.*, 1985), ce qui implique l'importation massive de ces acides aminés au niveau aérien. Vis-à-vis du phloème, ces résultats confirment que les nouvelles feuilles sont des exportateurs nets d'acides aminés (Ortiz-Lopez *et al.*, 2000).

**Le modèle permet aussi de poser de nouvelles questions sur la physiologie de la plante en réponse à la coupe ou à la défoliation.** Par exemple, le modèle suggère que la réaccumulation des VSP observée au niveau du pivot ne peut pas être seulement liée à la teneur locale en acides aminés pour les plantes 15HN en fin de repousse. Cette teneur reste en effet relativement stable durant cette période généralement dévolue à la réaccumulation de ces VSP. Ces observations soulèvent donc de nouvelles interrogations vis-à-vis de la régulation de la synthèse des VSP au cours de la fin de la repousse. Par ailleurs, le modèle suggère l'existence d'une accumulation transitoire de nitrate dans le xylème pendant les premières heures suivant la coupe, et cette accumulation semble liée au déficit d'utilisation par les parties aériennes. Cette accumulation pourrait-elle alors constituer un signal propre à la coupe, et sa perception précoce au niveau racinaire est-elle un signal régulant le taux de mobilisation des réserves organiques du pivot ?

**Le modèle permet cependant de tester de nouvelles hypothèses, et devrait permettre de simuler des situations difficilement réalisables par une approche expérimentale simple.** Dans le cadre particulier de la synthèse des VSP, nous avons émis l'hypothèse que la synthèse de VSP dépendrait à la fois des teneurs locales en acides aminés au niveau du pivot, ainsi que du rapport  $AA_{\text{Phloème}} / AA_{\text{Xylème}}$ . Comme l'avaient déjà proposé Touraine *et al.*, (2001), ce rapport pourrait être considéré comme un signal reflétant le statut azoté global de la plante et pourrait avoir un rôle régulateur sur de nombreux mécanismes physiologiques tels que l'absorption de l'azote (Mullet et Touraine, 1992) ou le chargement en acides aminés du phloème (Lalonde *et al.*, 2003). Une augmentation de ce rapport pourrait en effet traduire une acquisition de ressources azotées supérieure à l'acquisition de ressources carbonées. On pourrait envisager que la perception d'un tel signal pourrait être réalisée au niveau de transporteurs membranaires d'acides aminés du pivot, ce



qui régulerait de façon plus fine la synthèse de ces protéines particulières chez la luzerne que sont les VSP.

**De la même manière, un premier travail de validation du modèle sur l'expérimentation 6LN a montré les limites de notre paramétrage initial vis-à-vis de la distribution de plus faibles quantités d'azote.** Pour les parties aériennes en croissance et pour le pivot, la répartition de l'azote entre les différentes fractions azotées est fortement altérée, notamment en fin de repousse. Le paramétrage initial permet toutefois une simulation satisfaisante de cette répartition pour les acides aminés et les protéines solubles au niveau des chaumes. **Par conséquent, la validation sur l'expérimentation 6LN a nécessité l'ajustement de 7 paramètres uniquement impliqués dans les vitesses maximales de réactions anaboliques** telles que la réduction du nitrate, la synthèse de protéines solubles et d'N structural, et des vitesses maximales de transport des acides aminés et du nitrate, notamment à partir des organes racinaires (Tableau III.3). Les vitesses des réactions anaboliques sont par exemple réduites de près de 50% en moyenne par rapport à celles des plantes 15HN. Ces réactions étant coûteuses en énergie (Engels, 1994), de telles observations suggèrent alors une forte implication du métabolisme carboné. Les plantes LN présentant des potentiels de croissance réduits par rapport aux plantes HN, on pourrait envisager que leurs capacités d'acquisition du carbone par voie photosynthétique soient réduites, ce qui contribuerait à limiter la fourniture de ressources carbonées aux enzymes clé du métabolisme azoté. Inversement, les vitesses maximales de transport du nitrate et des acides aminés sont fortement augmentées. Ceci pourrait concourir à augmenter la fourniture de ressources azotées aux parties aériennes en croissance provenant des organes épargnés par la coupe lors des premiers jours de repousse. Ainsi, **en dépit de son caractère exclusivement axé sur la distribution de l'azote au niveau de la plante entière, notre modèle semble d'ores et déjà mettre en relief de possibles co-régulations de nombreux mécanismes physiologiques par le carbone et par l'azote.**

**Le réajustement de ces paramètres doit cependant être complété par l'intégration des jeux de données issus des autres expérimentations testées, de manière à pouvoir décrire l'évolution des paramètres impliqués en fonction de conditions de repousse variées.** La description mathématique de cette évolution permettrait alors de pouvoir tester le modèle sur un plus grand nombre de conditions de repousse, sans pour cela avoir recours à l'expérimentation ou à un nouveau paramétrage.

## CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre des travaux développés par les équipes INRA de Caen et de Lusignan portant sur les « réponses adaptatives des plantes et des couverts prairiaux à la défoliation ». **Son objectif principal a visé à une meilleure compréhension de l'effet des trois variables que sont i) le niveau des réserves organiques initiales, ii) la hauteur de la coupe, et iii) la surface foliaire résiduelle** sur la dynamique de l'azote (et du carbone) au cours de la repousse après la coupe ainsi que sur le potentiel de croissance et la production finale de la luzerne. Les résultats acquis ont été présentés sous forme d'articles où sont développées des discussions portant sur les incidences des diverses variables retenues. Un modèle mécaniste quantitatif simulant la distribution de l'azote entre les différents organes et pools métaboliques N a ensuite été développé afin de mieux comprendre et hiérarchiser ces différentes variables. **Ce dernier chapitre de discussion générale ne reprendra donc pas les éléments déjà abordés dans ces discussions antérieures, et a pour objectif principal d'insister sur les résultats originaux apportés dans le cadre de ce travail de thèse.**

Cette discussion générale s'organise en 4 parties principales s'attachant à souligner les effets :

- D'une réduction de l'alimentation azotée antérieure à la coupe sur la mise en réserve de ressources C et N, notamment au niveau du pivot et des chaumes, ainsi que sur l'architecture résiduelle de la plante au jour de coupe ;
- Du niveau initial des réserves C et N du pivot sur l'absorption de l'azote et sur le potentiel de repousse des parties aériennes après la coupe ;
- De la hauteur de coupe, *via* le volume du compartiment et le niveau des réserves C et N des chaumes, sur le degré de contribution des réserves C et N du pivot au potentiel de repousse des parties aériennes après la coupe ;
- De la surface foliaire résiduelle sur le taux de contribution des réserves C et N du pivot au potentiel de repousse des parties aériennes après la coupe.

Une synthèse succincte des principaux résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse sera ensuite réalisée, avant d'aborder dans une dernière partie les apports de la modélisation.

## **A- Modulation de l'état initial (au jour de coupe) par l'alimentation azotée antérieure**

### **A.1- La limitation de l'alimentation azotée modifie non seulement la production et la répartition de la biomasse au jour de coupe, mais aussi le statut C/N des chaumes et du pivot**

De nombreuses modifications de la physiologie et de la morphologie de la plante ont été observées en réponse à la limitation de l'alimentation azotée. Quel que soit le mode de **limitation de l'alimentation N**, nos résultats confirment des travaux précédents montrant que l'on assiste à **une diminution de la biomasse totale** et à une **modification de la répartition de cette biomasse au profit des racines latérales et du pivot** (Kim *et al.*, 1991 ; Ourry *et al.*, 1994). Nos résultats montrent plus spécifiquement que l'amplitude de ces effets est d'autant plus élevée que le niveau de carence en azote est fort.

**Au niveau des chaumes**, lorsque l'azote devient limitant pour la croissance, on observe une **augmentation parallèle de la surface foliaire résiduelle** et du nombre de feuilles, **alors que le nombre de bourgeons présents au niveau du collet diminue**. Dans nos conditions expérimentales, nos résultats montrent par ailleurs que **les réserves carbonées**, en particulier l'amidon et le saccharose, **sont quantitativement augmentées, alors que les réserves azotées sont parallèlement diminuées**. Les différentes réserves organiques des chaumes représentent alors environ 25 % en moyenne des réserves C et N du pivot au jour de coupe.

**Au niveau du pivot**, ceci se traduit par une diminution quantitative de l'azote total et de la plupart des différentes fractions métaboliques azotées.

*Cependant, lorsque l'alimentation azotée antérieure est limitante, nos résultats mettent pour la première fois en évidence qu'une répartition préférentielle de l'azote sous la forme de protéines solubles et de VSP intervient, au détriment du nitrate et des acides aminés dont les teneurs chutent.*

Malgré la diminution de la biomasse et de l'azote total du pivot, **cette répartition préférentielle sous la forme de protéines solubles et de VSP ne modifie pas les quantités d'azote présentes au jour de coupe pour ces deux fractions** lorsque l'on passe par exemple de 1.0 à 0.2 mM de KNO<sub>3</sub>.

Nos résultats montrent une **augmentation du statut C/N au niveau du pivot et des chaumes, en réponse à la limitation de l'alimentation azotée**. Cette augmentation est généralement observée chez de nombreuses espèces herbacées (Thornton *et al.*, 1993 ; Améziane *et al.*, 1997 ; Ourry *et al.*, 2001) et résulte du déséquilibre existant entre les capacités d'acquisition du carbone et de l'azote au niveau de la plante entière (Koch, 1988 ; Richards, 1993). **Cette augmentation est en partie la conséquence d'une distribution accrue de composés carbonés aux parties racinaires, de manière à augmenter** à la fois leur croissance et le volume de sol exploité, ainsi que **leur capacité d'absorption d'azote** (Reynolds et Thornley, 1982 ; Chu *et al.*, 1992 ; Lawlor, 2002). Cependant, dans nos conditions expérimentales, et à la différence de précédents travaux réalisés chez la luzerne (Kim *et al.*, 1991 ; Ourry *et al.*, 1994), **cette modification du statut C/N pour le pivot ne résulte pas d'une augmentation du statut carboné parallèle à une réduction du statut azoté**. En effet, les différentes réserves carbonées, constituées à plus de 90% par l'amidon, restent pour leur part inchangées dans nos conditions expérimentales. Ces résultats semblent être expliqués par le fait que l'ensemble des réserves carbonées du pivot, qui peuvent par ailleurs représenter plus de 60 % du carbone total de cet organe (Boyce et Volenec, 1992 ; Frankhauser *et al.*, 1989), sont présentes à des teneurs plus élevées, nettement supérieures à celles rencontrées en conditions de plein champ. Dans nos conditions expérimentales (Jour Long et PAR moyen supérieur ou égal à 300  $\mu\text{moles. photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), l'amidon est ainsi environ 20 fois supérieur aux teneurs minimales observées dans le pivot durant l'hiver au champ (Li *et al.*, 1996 ; Cunningham et Volenec, 1998 ; Dhont *et al.*, 2002).

## **A.2- La luzerne développe des stratégies adaptatives différentes en fonction du niveau d'alimentation azotée**

L'ensemble de ces résultats montre que **la luzerne est capable de développer des stratégies adaptatives visant à optimiser l'utilisation et le recyclage interne de l'azote,**

**plus particulièrement dans des conditions où cet élément devient limitant pour la croissance.** Ainsi, à la différence de la plupart des espèces herbacées ou ligneuses (Staswick *et al.*, 1991 ; Van Cleve et Apel, 1993 ; Améziane *et al.* ; 1997), nos résultats montrent qu'une limitation de l'alimentation azotée conduit chez la luzerne à l'accumulation de protéines solubles et de VSP dans le pivot. Cette mise en réserve préférentielle de l'azote sous forme protéique pourrait en outre présenter quelques avantages, comme l'avait déjà suggéré Millard (1988). Par exemple, **l'accumulation d'azote sous forme de protéines** dans les vacuoles des cellules du pivot pourrait éviter les problèmes osmotiques liés à l'accumulation d'azote sous forme de nitrate ou d'acides aminés. Un tel mécanisme **facilite alors le stockage d'azote sur de longues périodes.** En outre, cette mise en réserve préférentielle **pourrait participer à un mécanisme adaptatif visant à diminuer les quantités d'acides aminés circulant dans les vaisseaux du phloème et donc l'action potentiellement inhibitrice de ces acides aminés sur l'absorption racinaire de l'azote.** En effet, il a été montré que l'absorption de l'azote peut être dé-réprimée lorsque les teneurs en acides aminés circulant au niveau du phloème sont diminuées (Muller et Touraine, 1992). De récentes études suggèrent aussi que la régulation de l'absorption de l'azote passe par les produits issus de l'assimilation du nitrate (tels que l'ammonium et les acides aminés) plutôt que par le nitrate lui-même (Touraine *et al.*, 2001 ; Forde, 2002). **Par conséquent, une accumulation d'azote sous forme protéique consécutive à une limitation de l'alimentation azotée devrait concourir à augmenter les capacités d'acquisition (voire d'assimilation) de cet élément indispensable à la croissance.**

D'un point de vue écologique, ces résultats semblent par ailleurs en accord avec l'hypothèse de Chapin *et al.* (1990) qui suggéra que l'optimisation du recyclage interne de l'azote et sa **mise en réserve étaient déterminantes chez les espèces particulièrement bien adaptées aux sols pauvres en cet élément.** Ces mécanismes pourraient alors conférer **un avantage compétitif à la luzerne vis-à-vis d'autres espèces moins bien adaptées aux conditions de carence en azote.** De plus, compte tenu de la relation positive et linéaire existant entre les teneurs en VSP observées dans le pivot en fin d'automne et le potentiel de repousse au printemps (Cunningham et Volenec, 1998 ; Justes *et al.*, 2002 ; Dhont *et al.*, 2003), **ces mécanismes adaptatifs pourraient contribuer à augmenter la persistance hivernale et la reprise de croissance au printemps.** De récents travaux ont par ailleurs montré que la VSP de 32 kDa présente de fortes homologues de séquence en acides aminés avec des PR (Pathogenesis Related) protéines et qu'elle possède une activité chitinase *in-vitro*

(Meuriot *et al.*, 2004). Cette accumulation de VSP pourrait aussi concourir à une meilleure défense contre les pathogènes d'origine bactérienne et/ou fongique, particulièrement agressifs au cours de la période hivernale. En outre, et comme pour de nombreuses chitinases identifiées chez les herbacées (Yeh *et al.*, 2000), un rôle potentiel d'AFP (AntiFreeze Protein) pourrait être attribué à la VSP de 32 kDa, ce qui expliquerait en partie son rôle dans la survie et la persistance hivernale de cette légumineuse fourragère.

Enfin, **nos résultats soulignent que les chaumes**, du fait de leur niveau de réserves C et N initial non négligeable, **pourraient jouer un rôle significatif dans la fourniture de ressources C et N aux organes néoformés lors de la repousse après la coupe**. De plus, nous avons montré que la surface foliaire résiduelle augmente en réponse à une réduction de l'alimentation azotée. **Les feuilles résiduelles des chaumes pouvant transitoirement augmenter leurs capacités photosynthétiques après la coupe** (Hodgkinson *et al.*, 1972), et ainsi subir un processus de « rajeunissement » (Hart *et al.*, 1978), leur rôle doit aussi être particulièrement pris en compte lors de la repousse après la coupe. Or, nous avons pu voir au cours de l'analyse bibliographique que très peu de travaux se sont spécifiquement intéressés au rôle des feuilles résiduelles sur la contribution à la fourniture en ressources C et N aux parties aériennes en repousse (Quinn *et al.*, 1996). L'ensemble de ces éléments souligne que **le rôle des chaumes (et de la surface foliaire résiduelle) doit être pris en considération pour la dynamique du carbone et de l'azote au cours de la repousse**. Ces constatations justifient donc les études que nous avons conduites dans ce travail de thèse sur les effets de la hauteur de coupe et du niveau de la surface foliaire résiduelle qui seront discutées ultérieurement dans ce chapitre.

En résumé, nous avons montré que la limitation de l'alimentation azotée conduit à une modification de l'architecture résiduelle de la plante ainsi que du niveau des réserves organiques des organes épargnés par la coupe. Or chez la luzerne, la reconstruction des parties aériennes dépend essentiellement de la mobilisation plus ou moins importante des réserves organiques des chaumes et du pivot (Avice *et al.*, 1996a ; Volenec *et al.*, 1998 ; Ourry *et al.*, 2001). Ce dernier organe constituant le tissu de stockage majoritaire chez la luzerne (Hendershot et Volenec, 1993a ; Ourry *et al.*, 1994 ; Avice *et al.*, 1996a), nous allons tout d'abord préciser l'importance et la place du niveau des réserves C et N du pivot, selon l'état

initial de la plante au jour de coupe, sur la dynamique de l'azote (et du carbone) et sur le potentiel de croissance au cours de la repousse.

## ***B- Effet du niveau des réserves C et N initiales du pivot sur le potentiel de repousse***

### **B.1- Le début de la repousse est accompagné par une mobilisation des réserves C et N initiales**

Quel que soit le niveau initial des réserves organiques du pivot, on assiste à une forte **diminution de la biomasse de cet organe** pendant les 9 premiers jours suivant la coupe. Cette diminution est **due à une mobilisation rapide et intense de l'ensemble des réserves carbonées** (telles que l'amidon et le saccharose) **et azotées** (telles que les acides aminés et les protéines solubles) **au profit de la reconstruction des parties aériennes**, comme l'avaient déjà montré Hendershot et Volenec (1993a) et Kim et al. (1993). Comme cela a été mentionné dans le chapitre I, d'autres travaux ont montré que **les réserves carbonées sont majoritairement utilisées à des fins énergétiques et que le carbone est essentiellement perdu par voie respiratoire**, en particulier au niveau racinaire (Ta *et al.*, 1990 ; Avice *et al.*, 1996a). Il est en outre à noter que l'amidon ne semble pas limitant pour la repousse dans nos conditions expérimentales. Ce composé de réserve est en effet présent à des quantités très supérieures aux plus basses quantités mesurées dans le pivot au niveau du champ (Li *et al.*, 1996 ; Cunningham et Volenec, 1998). **La mobilisation des composés azotés** tels que les acides aminés et les protéines solubles **est donc particulièrement importante pour la fourniture d'azote, mais aussi et surtout de carbone, aux parties aériennes en repousse.**

*L'amplitude de la mobilisation des réserves azotées semble d'autant plus forte que la biomasse et le niveau des réserves C et N de ces organes sont importantes au jour de coupe.*

Par conséquent, les plantes HN, qui présentent les quantités d'azote initiales les plus élevées, montrent également les plus fortes **quantités d'azote mobilisées** pendant les premiers jours suivant la coupe. Ces quantités **sont environ 3 fois plus importantes que pour les plantes LN.**

*Cependant, même si les acides aminés et les protéines solubles sont mobilisés lors des premiers jours suivant la coupe, nos résultats soulignent pour la première fois une très forte variabilité du taux de mobilisation des VSP. Ce taux peut être rapide et intense pour les plantes LN, et nul pour les plantes HN.*

Les quantités de VSP sont par exemple réduites de plus de 65% en moyenne pendant les 9 premiers jours de la repousse et **les différentes réserves N du pivot des plantes LN atteignent alors des valeurs minimales** en dessous desquelles aucune mobilisation ne semble possible. Les simulations permises par le modèle montrent que les VSP, qui peuvent représenter jusqu'à 40% de l'ensemble des protéines solubles totales (Hendershot et Volenec, 1993a ; Avice *et al.*, 1996a ; Meuriot *et al.*, 2004), **contribuent 10 fois plus à la fourniture d'azote aux parties aériennes en croissance pour les plantes LN que pour les plantes HN.** Cependant, le modèle permet aussi d'estimer la contribution des différentes fractions N du pivot à la repousse. Il s'avère ainsi **que les acides aminés, aux côtés des protéines solubles (hors VSP), contribueraient beaucoup plus que les VSP à la fourniture d'azote aux parties aériennes en repousse pour les plantes HN et LN.** L'ensemble de ces résultats suggère que le taux de mobilisation des VSP pourrait être un bon indicateur de l'état de satisfaction de la demande en azote des parties aériennes en repousse.

## **B.2- Le niveau initial des réserves azotées module les capacités d'absorption du nitrate en début de repousse**

*Pendant les 8 premiers jours de la repousse, et bien qu'elles possèdent une biomasse racinaire supérieure, les plantes HN présentent des quantités d'azote d'origine exogène qui sont significativement plus faibles que pour les plantes LN.*

Dans nos conditions expérimentales, **cette limitation de l'absorption** pendant les premiers jours suivant la coupe **semble due à la forte concentration locale en acides aminés au niveau des racines latérales pour les plantes HN.** En effet, plusieurs travaux ont montré le rôle répresser des produits issus de l'assimilation du nitrate tels que l'ammonium et les



acides aminés sur l'absorption de ce dernier (Touraine *et al.*, 2001 ; Forde, 2002). Le modèle suggère que cette limitation de l'absorption **pourrait aussi résulter de la forte augmentation des quantités d'acides aminés présentes dans les vaisseaux du phloème dans les quelques jours suivant la coupe**. Cette augmentation semble causée à la fois par la forte mobilisation des acides aminés et des protéines solubles du pivot, quantitativement plus importante pour les plantes HN que LN, et par la réduction des flux de sève phloémienne généralement observée après la coupe (Richards, 1993 ; Lemaire, 1999). Le modèle suggère en outre que **les quantités d'acides aminés présentes dans le phloème sont environ 3 fois plus grandes pour les plantes HN pendant les 8 premiers jours de la repousse**. Or, Muller et Touraine (1992) ont montré que l'absorption du nitrate est réprimée lorsque le contenu en acides aminés du phloème augmente. Parmi ces acides aminés, il semble que la glutamine et/ou l'asparagine soient particulièrement responsables de cette répression de l'absorption (Imsande et Touraine, 1994 ; Von Wiren *et al.*, 1997). Chez la luzerne, nos données confirment que l'asparagine est l'acide aminé majoritairement retrouvé au niveau des parties racinaires, et que cet acide aminé représente plus de 65% des acides aminés totaux (Girousse *et al.*, 1996 ; Dhont *et al.*, 2003).

### **B.3- Les plantes LN ont des potentiels de repousse et des capacités de reconstitution de leurs réserves azotées réduites**

Malgré des capacités d'absorption plus importantes et une mobilisation massive des réserves C et N du pivot pour les plantes LN en début de repousse, on observe **une réduction très significative de leur croissance et de l'azote total de leur parties aériennes en développement, ainsi qu'une plus faible surface foliaire néoformée après seulement 6 jours de repousse**, comparativement avec les plantes HN. Ces effets rapides entraînent par la suite une **limitation des quantités d'azote absorbé** pour les plantes LN jusqu'à la fin de la repousse.

Comme l'avaient déjà montré des travaux récents, nos résultats confirment que la restauration des capacités d'acquisition du carbone par la photosynthèse et de l'azote par l'absorption se traduit au cours de la fin de la repousse (entre 13 et 28 jours) par des remises en réserve de composés C et N au niveau du pivot (Avicé *et al.*, 1996a, Volenec *et al.*, 1998, Dhont *et al.*, 2002).

*Cependant nos résultats mettent en évidence que les plantes LN ont une remise en réserve de ressources C et N au niveau du pivot qui intervient plus tardivement et qui est quantitativement beaucoup moins importante que pour les plantes HN. En outre, au terme de la repousse, la biomasse et l'azote total des plantes LN sont fortement réduites par rapport aux plantes HN.*

Par conséquent, on peut penser que l'application d'un nouveau cycle de coupe/repousse chez des plantes LN, dont le niveau initial de réserves organiques est bas, se traduirait par une production de biomasse aérienne probablement très faible.

#### **B.4- Le rôle des réserves organiques initiales du pivot est déterminant pour la production de la luzerne, notamment au début de la repousse**

Comme l'avaient déjà montré de précédents travaux (Avice *et al.*, 1997a ; Volenec *et al.*, 1998 ; Dhont *et al.*, 2003), **la variable représentée par le niveau des réserves organiques initiales**, en particulier azotées, **est déterminante pour la production** finale de biomasse chez la luzerne.

*Dans nos conditions expérimentales, une régression pas-à-pas montre que le niveau initial des réserves organiques explique à lui seul plus de 60% de la variance observée sur ce paramètre lorsque les plantes sont cultivées en hydroponie avec de bons niveaux d'éclairément.*

Nos résultats ont permis de préciser ce rôle, qui passe essentiellement par la **fourniture en ressources azotées aux organes aériens en forte croissance pendant une phase cruciale de la repousse comprise entre 0 et 9 jours après la coupe**. Or, cette phase est déterminante sur la morphologie ultérieure de la plante **au travers de l'initiation des méristèmes foliaires (qui conditionne leur développement ultérieur)**, comme chez la plupart des espèces fourragères (Richards, 1993 ; Lemaire, 1999 ; Simon *et al.*, 2003), et plus spécifiquement chez la luzerne (Simon *et al.*, 2004).

Ces dernières données plus précises de la dynamique du carbone et de l'azote confirme alors nos résultats précédents (Chapitre II A et B) montrant que **la luzerne est une espèce capable de développer des mécanismes adaptatifs visant à assurer une gestion optimale de l'utilisation et du recyclage de l'azote**. En effet, lorsque les plantes LN sont replacées dans des conditions de croissance non limitantes, nos résultats montrent qu'une mobilisation massive de l'ensemble des réserves C et N du pivot en début de repousse permet de soutenir la croissance et d'assurer une remise en réserve parallèle des ressources C et N. A l'inverse, si ces plantes avaient été replacées dans des conditions d'alimentation en azote limitantes, on peut faire l'hypothèse que la réaccumulation des réserves aurait été faible, voire nulle, et que la production de biomasse au cours du cycle coupe/repousse suivant aurait été sévèrement réduite. **L'ensemble de ces résultats souligne à nouveau le difficile équilibre existant entre l'utilisation des ressources pour la croissance (donc de la production à court terme) et/ou leur mise en réserve (donc de la pérennité de la culture sur le long terme), qui sont deux processus à la fois complémentaires et antagonistes pour une plante fourragère pérenne.**

### ***C- Effet de la hauteur de coupe (via le niveau des réserves organiques des chaumes) sur le degré de contribution des réserves C et N du pivot au potentiel de repousse***

De manière à pouvoir assurer une fourniture adéquate de ressources C et N aux parties aériennes en croissance, le début de la repousse est caractérisé par une mobilisation plus ou moins importante des réserves organiques du pivot chez la luzerne. L'intensité et la durée de cette mobilisation sont fortement liées au statut azoté initial, c'est pourquoi les plantes LN présentent la plus forte et la plus longue mobilisation de l'ensemble de leurs réserves C et N au niveau du pivot. Cette mobilisation massive ne semble cependant pas capable de subvenir à la forte demande en azote des parties aériennes en développement au début de la repousse, ce qui pénalise en retour la production fourragère finale de la culture. De nombreux travaux ont montré, sans toutefois le préciser clairement, le rôle de la hauteur de la coupe sur la production de la culture (Langer et Steinke, 1965 ; Smith et Nelson, 1967 ; Brink et Marten, 1989). Nous avons alors mis en évidence le rôle des chaumes (constituées par les tiges et les feuilles résiduelles épargnées par la coupe), *via* la taille du compartiment et le niveau initial

de ses réserves C et N, sur la dynamique de l'azote (et du carbone) et sur la production de biomasse lors de la repousse.

### **C.1- Les réserves organiques initiales des chaumes sont mobilisées au cours de la repousse**

Comme pour le pivot, la coupe s'accompagne d'une **mobilisation de l'ensemble des réserves C et N des chaumes lors des premiers jours de repousse. Cette mobilisation des réserves organiques apparaît en outre irréversible** car aucune réaccumulation n'est observée au cours de la repousse. En effet, les tiges et les feuilles épargnées par la coupe (constituant alors les chaumes) ne sont pas des organes de stockage caractérisé par des cycles de mobilisation / réaccumulation des réserves C et N comme pour le pivot au cours de la repousse. Les chaumes rentrent en sénescence et sont appelés à disparaître progressivement au cours des cycles de coupe / repousse ultérieurs (Dufour *et al.*, 1989 ; Guines *et al.*, 2003). Leurs contenus en azote et en carbone sont donc partiellement recyclés au cours de la repousse suivant la coupe et contribuent à la fourniture de ressources C et N aux parties aériennes en croissance. Dans nos conditions expérimentales (un cycle de coupe/repousse après semis en serre, suivi d'un cycle de préculture en hydroponie), on peut faire l'hypothèse que se sont les tiges apparues au cours du dernier cycle de coupe/repousse qui contiennent l'essentiel des réserves organiques potentiellement mobilisables. Cette observation renforce alors le rôle de ces tiges, qui représentent plus de 60% de la biomasse initiale des tiges des chaumes au jour de coupe (données non présentées). Par conséquent, plus les chaumes présenteront de tiges nouvelles au jour de coupe, plus leur contribution à la repousse devrait être élevée.

Par ailleurs, **nos résultats montrent que la contribution des réserves azotées des chaumes est quantitativement 2 à 3 fois plus importante lorsque les plantes sont coupées à 15 cm plutôt qu'à 6 cm, ce qui est à mettre en relation avec la différence de hauteur de cet organe de réserve selon l'intensité de la coupe.** Compte tenu du déficit de fourniture en azote aux parties aériennes en croissance par le pivot observé chez les plantes LN au début de la repousse, **la contribution des réserves azotées des chaumes est plus importante chez ces plantes que pour les plantes HN.**

*Cette contribution des réserves organiques des chaumes, essentiellement basée sur une mobilisation des acides aminés et des protéines solubles, permet d'augmenter la croissance des parties aériennes en développement, la surface foliaire, l'absorption de nitrate et la reconstitution des réserves azotées du pivot. La contribution des réserves organiques des chaumes limite donc la mobilisation des réserves organiques du pivot au début de la repousse Ceci se traduit par des quantités finales de VSP dans le pivot trois fois plus importantes pour les plantes coupées à 15 cm que pour les plantes coupées à 6 cm au terme de la repousse.*

Cet effet positif pourrait aussi passer par une fourniture conséquente de ressources carbonées aux méristèmes proches et organes aériens en croissance. En effet, **quelle que soit la hauteur de coupe, les quantités d'amidon et de sucres solubles chutent fortement au cours de la repousse pour les plantes LN.** Des études antérieures ont montré chez la luzerne que les chaumes peuvent être des organes sources pour le carbone pendant les quelques jours suivant la coupe, et que des quantités significatives de carbone pouvaient être transférées vers les organes en croissance (Hodgkinson, 1972 ; Dufour et al., 1989 ; Richards, 1993). Ces différents tissus, de par leur métabolisme actif et intense, sont en effet de grands consommateurs de ressources carbonées (Engels, 1994). Une fourniture accrue de composés carbonés à ces organes en repousse pourrait ainsi avoir un effet bénéfique sur leur croissance. Cependant, en l'absence de marquage isotopique au  $^{13}\text{C}$  et d'un suivi des transferts de carbone au cours de la repousse, nous ne pouvons pas actuellement valider cette hypothèse.

## **C.2- La hauteur de coupe joue un rôle déterminant sur la production fourragère de la luzerne**

En accord avec des travaux précédents (Kust et Smith, 1961 ; Leach, 1967 ; Brink et Marten, 1989), nos résultats montrent que **l'augmentation de la hauteur de coupe s'accompagne d'une augmentation de la croissance aérienne et de la production finale de biomasse chez la luzerne.**

*Une régression pas-à-pas montre en effet que la hauteur de coupe est une variable qui explique près de 15% de la variance totale observée (tous*

*traitements confondus) sur la production finale de biomasse de la luzerne. Cette variable a donc un poids plus faible que le niveau initial des réserves azotées, mais son incidence est néanmoins significative.*

Ceci explique en partie pourquoi des fréquences de coupe élevées (caractérisées par de plus faibles niveaux de réserves C et N initiales au niveau du pivot), accompagnées de hauteurs de coupe plus grandes, permettent d'assurer une bonne production (Langer et Steinke, 1965 ; Smith et Nelson, 1967). D'un point de vue agronomique, il est en outre à noter que des hauteurs de coupe plus élevées entraînent une amélioration de la qualité et de la digestibilité du fourrage (Jung et Deetz, 1993 ; Lemaire et Allirand, 1993 ; Guines *et al.*, 2003).

### **C.3- La hauteur de coupe est un paramètre agronomique important à prendre en compte pour une bonne gestion des luzernières**

A la différence du pivot, aucune réaccumulation de réserves C et N n'est observée dans les chaumes au cours de la repousse. Par conséquent, **on peut émettre l'hypothèse que l'effet positif d'une augmentation de la hauteur de coupe sur la production fourragère ne peut être significatif que sur un seul cycle de coupe / repousse.** Cette observation pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi de nombreux travaux n'ont pu attribuer de rôle significatif à la hauteur de coupe au cours de cycles pluriannuels de culture de la luzerne (Kust et Smith, 1961 ; Gramshaw, 1993).

Cependant, nos observations permettent de faire l'hypothèse qu'il serait intéressant d'augmenter la hauteur de coupe sur certains cycles particuliers de repousse. En effet, compte tenu qu'une hauteur de coupe plus élevée entraîne une fourniture accrue de ressources C et N aux parties aériennes en croissance, **il serait alors particulièrement intéressant d'augmenter cette hauteur pour l'avant-dernière coupe automnale, notamment dans les régions septentrionales rencontrant des hivers longs et froids.** En effet, cette augmentation pourrait contribuer à limiter la mobilisation des réserves C et N du pivot (comme c'est le cas pour les plantes HN) pendant la dernière repousse annuelle, ce qui entraînerait un plus grand niveau de réserves C et N au début de la période hivernale. Ainsi, comme plusieurs travaux l'ont montré (Chapitre II.B et C), **cette reconstitution accrue de réserves C et N devrait se traduire par une meilleure survie et persistance hivernale** (Volenec *et al.*, 1998 ; Dhont *et*

*al.*, 2002, 2003), ainsi que par une reprise de la croissance au printemps plus rapide (Cunningham et Volenec, 1998 ; Justes *et al.*, 2002 ; Dhont *et al.*, 2003).

## **D- Effet de la surface foliaire résiduelle sur le taux de contribution des réserves C et N du pivot au potentiel de repousse**

Nous avons précédemment montré que les réserves C et N initiales du pivot et des chaumes jouent un rôle prépondérant vis-à-vis de la production fourragère de la luzerne. Cependant, la hauteur de coupe fait varier non seulement les quantités de réserves C et N disponibles au niveau des chaumes mais aussi la surface foliaire résiduelle et donc la capacité d'interception du rayonnement utile à la photosynthèse. L'analyse bibliographique souligne par ailleurs que bien peu de travaux se sont intéressés au rôle des feuilles résiduelles au début de la repousse (Quinn *et al.*, 1996). L'ensemble de ces éléments nous a donc amené à préciser le rôle de ces dernières sur la dynamique de l'azote (et du carbone) au cours de la repousse ainsi que sur la production fourragère finale.

### **D.1- Le rôle de la surface foliaire résiduelle semble passer par le métabolisme carboné**

**La suppression des feuilles résiduelles au jour de coupe ne modifie pas la mobilisation des réserves azotées du pivot au début de la repousse.** Ces feuilles, qui représentent entre 10 et 20% de la biomasse initiale globale des chaumes, contiennent moins de 5% de l'azote total de l'ensemble des organes laissés en place au jour de coupe. Une éventuelle contribution à la fourniture d'azote aux organes aériens en croissance semble alors limitée, d'autant plus que **les vieilles feuilles ont des comportements d'organes puits vis-à-vis de l'azote pendant les 9 premiers jours de la repousse.** En effet, des quantités significatives d'azote exogène sont transférées vers ces organes au cours de cette période. Cependant, les quantités totales mises en jeu au niveau de ces feuilles résiduelles sont très faibles et représentent moins de 4 mg par plante, ce qui représente moins de 5% de l'azote total mobilisé pendant ces 9 premiers jours.

Le rôle des feuilles résiduelles semble essentiellement lié au métabolisme carboné. En effet, bien que les capacités photosynthétiques de ces dernières soient beaucoup plus faibles que celles des nouvelles feuilles (Annexe A.3), il semble que les feuilles résiduelles puissent néanmoins subir un processus de « rajeunissement » après la coupe et voir leurs capacités photosynthétiques augmenter (Hart et al., 1978 ; Richards, 1993 ; Lemaire, 1999).

*Ce « rajeunissement » semble en partie passer par une optimisation de l'efficacité d'utilisation de l'azote au profit du métabolisme photosynthétique car nos résultats montrent que les teneurs en azote (N%) et en protéines solubles des feuilles résiduelles sont augmentées de près de 20 % en moyenne pendant les 9 premiers jours de la repousse (données non présentées).*

Chez les plantes de type C<sub>3</sub> telle que la luzerne, il a été montré que la capacité photosynthétique des feuilles est étroitement liée aux teneurs en azote foliaire, car les protéines de la chaîne de transport des électrons et du cycle de Calvin représentent la majorité de l'azote total foliaire (Evans, 1989 ; Sinclair et Horie, 1989). De plus, cette capacité est fortement liée aux teneurs en RuBisCO, enzyme pouvant représenter près de 70% de l'azote foliaire et près de 80% des protéines solubles (Huffaker, 1982). Enfin, la coupe se caractérise par une suppression plus ou moins importante de l'ombrage et par une remise dans des conditions d'éclairement sub-optimales des feuilles résiduelles (situées sous le niveau de coupe). Des courbes de réponse à l'éclairement de feuilles résiduelles réalisées chez des plantes non-coupées montrent que le point de compensation et la photosynthèse brute maximale se situent respectivement autour de PAR de 60 et 400  $\mu\text{moles.photons}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Annexe A.3). L'ensemble de ces données suggère donc que l'acquisition de carbone par voie photosynthétique par les feuilles résiduelles peut être significative lors de premiers jours suivant la coupe. **Les feuilles résiduelles peuvent alors contribuer à une fourniture significative de ressources carbonées aux proches organes en repousse (Hodgkinson, 1972 ; Richards, 1993), notamment au niveau des méristèmes axillaires, qui serait favorable à un retour plus rapide à une balance carbonée positive.**



## **D.2- La défoliation limite la reconstitution des réserves organiques du pivot**

Ce retour plus rapide à une balance carbonée positive est accompagné par une série de modifications de la physiologie de la plante en repousse.

*Quel que soit le statut azoté initial, nos résultats mettent en évidence que l'ablation des feuilles résiduelles limite l'absorption du nitrate, notamment au début de la repousse. Comparativement aux plantes conservant leurs feuilles résiduelles, cela se traduit au niveau du pivot ou de la plante entière par des quantités finales d'azote total plus faibles. Cette ablation des feuilles résiduelles modifie aussi la distribution de l'azote entre les différentes fractions azotées solubles du pivot, en particulier pour les acides aminés et les VSP.*

Au terme de l'expérimentation C, et à hauteur de coupe constante, les quantités d'acides aminés et de VSP sont réduites d'environ 35% en moyenne par rapport aux plantes conservant leurs feuilles résiduelles (Chapitre II C).

L'ensemble de ces résultats montre que les effets de la surface foliaire résiduelle sur la dynamique de l'azote (et du carbone) et sur le potentiel de croissance interviennent précocement au cours de la repousse. **Ces effets de la surface foliaire résiduelle sont déterminants pendant les 9 premiers jours de la repousse, et agissent plus particulièrement sur les vitesses d'apparition des nouvelles feuilles et sur la croissance des organes aériens néoformés** (Simon *et al.*, 2004). Comparativement aux plantes défoliées, le nombre de nouvelles feuilles et tiges produites pendant cette période est plus élevé lorsque les plantes sont non défoliées au jour de coupe. Ces 9 premiers jours constituent ainsi une période clé vis-à-vis de ce facteur où s'établissent les différences de production des organes aériens que l'on retrouve en fin de repousse (Simon *et al.*, 2004). Cependant, ces effets sur la production finale de biomasse apparaissent plus contrastés, et semblent fortement dépendre du niveau d'éclairement reçu au niveau des feuilles résiduelles épargnées par la coupe.

### **D.3- L'importance de la surface foliaire sur la production de biomasse dépend des conditions d'éclairement**

Le poids de la surface foliaire apparaît très différent entre les expérimentations B et C. Par comparaison à l'expérimentation C, nos résultats montrent un effet beaucoup plus important de la surface foliaire résiduelle sur la biomasse finale produite dans l'expérimentation B.

*Une régression pas-à-pas montre en effet que la variable représentée par la surface foliaire résiduelle explique seulement près de 3% de la variabilité totale observée sur la biomasse finale produite pour l'expérimentation C, contre plus de 25% pour l'expérimentation B. Cette variabilité semble fortement liée aux conditions d'éclairement des feuilles résiduelles*

Cette variabilité semble résulter des conditions de culture où l'éclairement passe de 400  $\mu\text{moles.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pour l'expérimentation B, à 300  $\mu\text{moles.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pour l'expérimentation C. Des résultats complémentaires montrent qu'une telle réduction de l'éclairement induit une diminution de la photosynthèse brute de près de 10% (Annexe A.3). Compte tenu que les plantes cultivées en chambre phytotronique (Exp. C) ont des croissances en hauteur plus fortes qu'en chambre de culture (Exp. B), et que l'éclairement est ajusté à 15 cm au dessus de la canopée, cette diminution pourrait être accentuée par une extinction plus importante du rayonnement dans le couvert. Ces observations semblent expliquer cette différence de comportement entre expérimentations et tendent à montrer que l'incidence de la surface foliaire résiduelle sur la production de biomasse n'est importante que si l'éclairement reçu au niveau des vieilles feuilles des chaumes est satisfaisant.

## **E- Intérêts et limites de la modélisation de la distribution des ressources azotées au cours de la repousse**

En résumé, nous avons montré que les trois variables que sont i) le niveau initial des réserves organiques, ii) la hauteur de coupe et iii) la surface foliaire résiduelle, ont des effets déterminants sur le potentiel de repousse et sur la dynamique de l'azote (et du carbone) après la coupe. Cependant, l'ensemble des mécanismes mis en jeu lors de la repousse après la coupe reste néanmoins complexe à aborder au niveau de la plante entière, et une approche quantitative et dynamique de la contribution des réserves organiques des différents organes au potentiel de repousse s'avère nécessaire. A cet effet, un modèle gérant la distribution des ressources entre différents organes et pools biochimiques a été développé, et ses intérêts et ses limites vont être maintenant présentés.

### **E.1- Intérêts de la modélisation**

Les mécanismes complexes que sont l'acquisition, le transport et l'utilisation des ressources azotées déterminent la distribution de ces dernières au niveau de la plante entière, mais l'interprétation de leur effets sur cette distribution reste encore difficile (Escobar-Gutiérrez *et al.*, 1998 ; Le Roux *et al.*, 2001).

**Sur le plan fondamental, la modélisation de cette distribution constitue une étape déterminante vers une meilleure intégration et hiérarchisation de ces différents mécanismes au niveau de la plante entière (Dewar, 1993). Le modèle que nous avons développé s'inscrit pleinement dans cet objectif et permet de proposer une analyse à la fois quantitative et qualitative des effets de ces différents mécanismes sur la distribution des ressources azotées au niveau de la plante entière en réponse à une coupe. Il permet de faire une synthèse des connaissances acquises sur le métabolisme azoté de la plante en repousse et d'en révéler les lacunes.** Par exemple, il s'avère que bien peu de travaux se sont intéressés à analyser la dynamique de chargement du phloème et du xylème en acides aminés au niveau des parties racinaires lors des quelques heures à quelques jours suivant la suppression des parties aériennes, en particulier chez la luzerne (Pate, 1980 ; Kim *et al.*, 1991 ; Jang et Sheen, 1994 ; Delrot, communication personnelle). **Le modèle proposé**

permet aussi de passer d'une analyse physiologique semi-quantitative limitée à des dates de récolte ponctuelles, à une analyse quantitative et continue des principaux flux azotés rencontrés dans le système. Ce changement d'approche permet par exemple de mieux connaître la contribution relative des différentes ressources azotées comme les acides aminés et les VSP au potentiel de croissance de la luzerne. De plus, **le modèle développé s'attache à intégrer cette distribution au niveau de la plante entière dans le cadre très particulier de la repousse après la coupe chez une espèce fourragère pérenne**. Quelques travaux se sont attachés à décrire cette distribution dans ce cadre spécifique, mais ils ont souvent été limités à une approche conceptuelle ou ne concernaient pas des compartiments physiologiques ou des pools métaboliques précis (Tabourel-Tayot et Gastal, 1998 ; Lemaire et Millard, 1999).

**Sur le plan conceptuel, le modèle développé** repose sur une hypothèse majeure simple (développée dans la section A du Chapitre III) où l'allocation et la répartition de l'azote sont déterminées par l'offre locale en ressources et par la capacité des différents organes ou fonctions biochimiques à utiliser les ressources. Le modèle **considère le fonctionnement dynamique et coordonné de nombreux compartiments structuraux et métaboliques**. La prise en compte de ces différents compartiments confère une pertinence significative à la fois au système étudié et à l'interprétation de la physiologie de la plante en repousse. La définition de chaque organe par l'ensemble des fractions azotées qui le compose permet, en accord avec cette hypothèse majeure, de quantifier et de simuler la répartition et l'allocation de l'azote lors de la repousse après la coupe. En outre, même si cette décomposition en de nombreux compartiments semble augmenter la difficulté d'évaluation du modèle, cette complexification est cependant fortement minimisée par la structure « modulaire » du modèle qui présente une grande homogénéité de structure et de fonctionnement au niveau des différents compartiments pris en compte. **De plus, l'aspect novateur de ce modèle réside dans le fait que la répartition et l'allocation de l'azote ne sont pas définies selon une hiérarchisation des offres et des demandes fixées a priori, comme c'est le cas pour la plupart des modèles d'allocation** (Magnuson *et al.*, 1986 ; Thornley et Cannell, 1992 ; Gabrielle *et al.*, 1998), **mais selon l'offre locale et la capacité des différents organes ou fonctions biochimiques à utiliser les ressources**. Le modèle développé est donc relativement robuste et permet de simuler de manière satisfaisante des expérimentations présentant des conditions initiales contrastées comme celles que nous avons pu intégrer, c'est-à-dire pour des plantes présentant des états initiaux contrastés et des cinétiques de repousse très différentes.

Enfin, le modèle actuellement proposé a été paramétré sur un seul jeu de données. Sa validation sur un autre jeu de données a montré qu'il était nécessaire de réajuster certains paramètres. Ce réajustement a conduit à une simulation satisfaisante de la distribution de l'azote au cours de la repousse pour des conditions initiales très différentes. **Ce réajustement a permis d'isoler et d'identifier les paramètres ayant un rôle déterminant lors de la repousse après coupe** pour des plantes présentant des niveaux initiaux de réserves azotées faibles. Ces paramètres concernent exclusivement les vitesses maximales des réactions anaboliques permettant la synthèse de protéines solubles ou de N insoluble, et les vitesses maximales des réactions permettant une distribution plus rapide de ressources azotées aux parties aériennes en repousse. **Leur identification ouvre alors de nouvelles pistes pour une meilleure compréhension et intégration de la distribution des ressources lors de la repousse après la coupe.** Cependant, dans l'état actuel de notre modèle, ce réajustement des paramètres constitue une limite significative à son évaluation.

## **E.2- Limites du modèle :**

Le réajustement de quelques paramètres sur le jeu de données issu de l'expérimentation 6LN (Tableau III.3) ne permet pas de valider pleinement le modèle développé pour la distribution de l'azote chez des plantes présentant de faibles niveaux initiaux de réserves azotées. Toutefois, du fait de la nature « extrême » des conditions testées entre les deux expérimentations 15HN et 6LN, on peut supposer que les valeurs obtenues pour ces paramètres constituent les limites minimales et maximales du système étudié. Par conséquent, **l'intégration des jeux de données issus des autres expérimentations devrait être réalisée, de manière à pouvoir décrire l'évolution des paramètres impliqués entre ces deux limites.** Leur description mathématique permettrait alors de pouvoir tester le modèle sur un plus grand nombre de conditions de repousse, sans pour cela avoir recours à l'expérimentation.

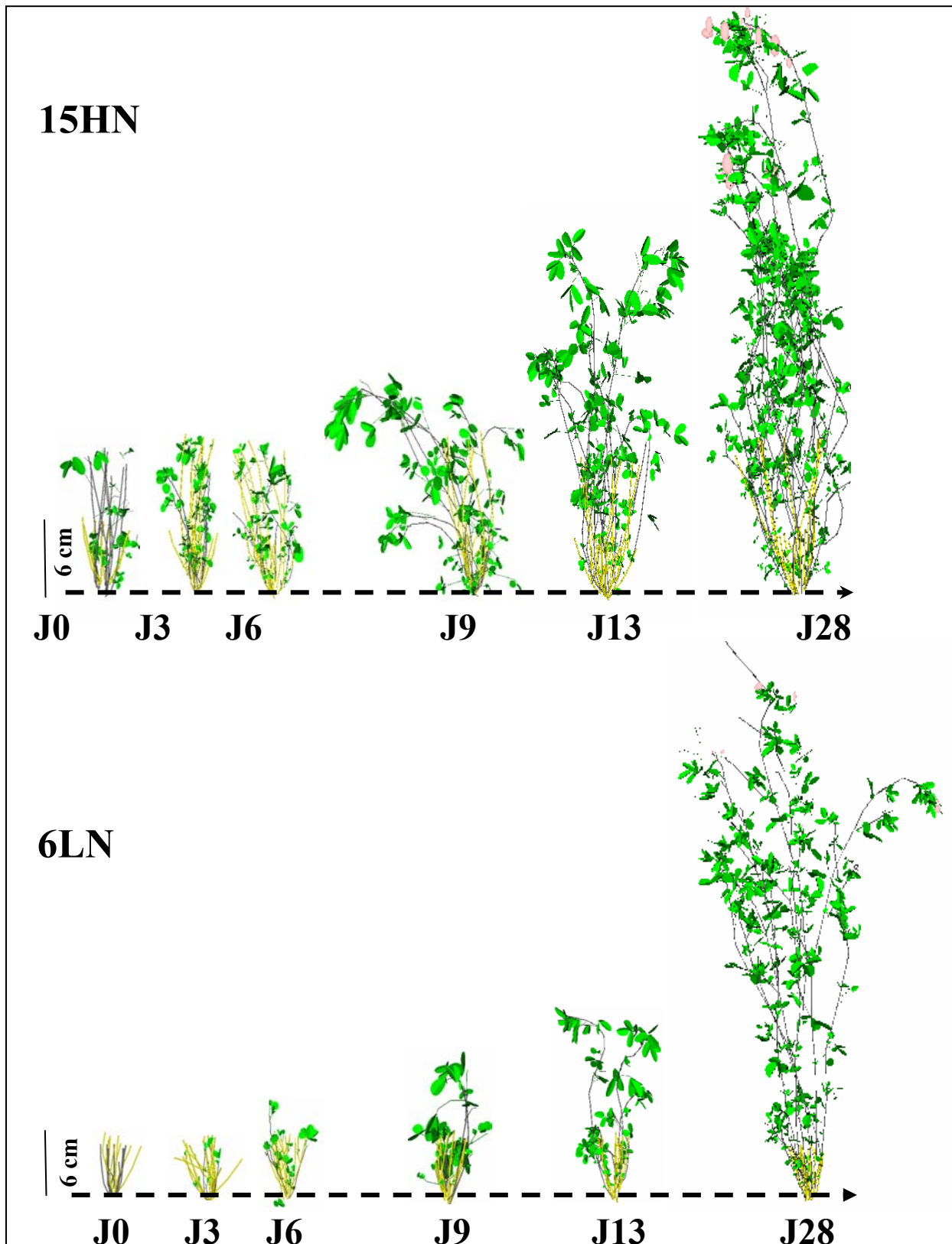
Du fait de la complexité et du nombre de mécanismes impliqués dans le modèle, comme de l'impact des réserves azotées et leur contribution à la repousse après la coupe chez la luzerne, seul l'azote a été jusqu'alors considéré. Par conséquent, **le modèle n'intègre ni le métabolisme carboné ni les interactions de ce dernier avec le métabolisme azoté, ce qui**

**constitue une des limites principales du modèle proposé.** Comme l'ont suggéré de nombreux travaux (Gleeson et Tilman, 1992 ; Champigny, 1995 ; Thornley, 1995 ; Reynolds et Chen, 1996), l'hypothèse d'une distribution des ressources contrôlée à la fois par l'azote et par le carbone ne peut être actuellement testée. A plus long terme, il serait donc particulièrement intéressant d'intégrer le métabolisme carboné au modèle actuellement proposé. **Néanmoins, malgré ces limites importantes, nous avons réussi à poser les bases d'un modèle déterministe simulant de manière satisfaisante la distribution des ressources azotées au cours de la repousse après une coupe pour des plantes présentant des niveaux de réserves organiques initiales et des cinétiques de repousse très contrastées.**

L'objectif principal du modèle étant de simuler la répartition et l'allocation de l'azote au cours de la repousse chez la luzerne, **la croissance et l'absorption de nitrate ont été considérées comme deux variables d'entrée afin de ne pas introduire de complexité supplémentaire dans le modèle.** De nombreux travaux ont en effet montré la difficulté de la modélisation de ces deux variables multifactorielles et hautement régulées au niveau de la plante entière (Jeuffroy et Recous, 1999 ; Le Roux *et al.*, 2001). Des développements ultérieurs devraient donc s'attacher à intégrer au mieux ces différentes données. De la même manière, les données acquises par digitalisation au cours des différentes expérimentations (Fig. IV.1) et concernant la morphogenèse de la luzerne pourraient être intégrées au niveau d'un module de croissance et de développement.

Enfin, si **le nombre important de compartiments** retenus dans notre modèle permet une analyse détaillée de la dynamique de l'azote au sein de la plante, ce nombre **s'accompagne en contre-partie d'une augmentation mécanique du nombre de paramètres à prendre en compte, ce qui rend son évaluation difficile** (Dewar, 1993). Cette difficulté a été partiellement contournée en utilisant la même fonction pour plusieurs organes ou fonctions physiologiques chaque fois que cela était possible. **La structure du modèle proposé apparaît donc modulaire et le nombre de paramètres a ainsi été significativement réduit.**

De manière à améliorer le modèle actuellement développé et à pouvoir le tester sur un plus grand nombre de conditions de repousse, un certain nombre d'évolutions et



**Figure IV.1:** Digitalisation des parties aériennes de la luzerne au cours de la repousse après la coupe pour des plantes coupées à 15 cm, avec 100 % de surface foliaire résiduelle, et possédant de niveaux initiaux de réserves organiques élevées (**15HN**), ou pour des plantes coupées à 6 cm, avec 0 % de surface foliaire résiduelle, et présentant des niveaux initiaux de réserves organiques faibles (**6LN**).

d'améliorations sont nécessaires. Ces dernières seront abordées dans le chapitre suivant, traitant plus particulièrement des perspectives de recherche.



## **CHAPITRE V : PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives de recherche se dessinent. Elles peuvent s'articuler autour des trois problématiques principales suivantes :

- Approfondissement des connaissances sur la physiologie des plantes en repousse, à l'échelle de la plante entière ;
- Validation et amélioration du modèle de distribution des ressources ;
- Evolution des fonctions physiologiques impliquées lors de la repousse en conditions de plein champ.

### ***A- Approfondissement des connaissances sur la physiologie des plantes en repousse, à l'échelle de la plante entière***

#### **A.1- Surface foliaire et métabolisme carboné**

Lorsque l'on augmente la hauteur de coupe ou lorsque les plantes sont cultivées dans des conditions où l'éclairement n'est pas limitant pour la croissance, nos résultats montrent que la surface foliaire résiduelle joue un rôle non négligeable en début de repousse. Cet effet semble passer par une fourniture accrue d'assimilats carbonés vers les méristèmes axillaires et les tissus aériens en développement les plus proches. Il semblerait donc particulièrement intéressant d'étudier plus finement les capacités photosynthétiques des feuilles résiduelles présentes sur les chaumes, notamment en début de repousse, ainsi que le métabolisme carboné associé à l'acquisition et à la distribution du carbone au niveau de la plante entière. Une expérimentation visant à étudier la capacité photosynthétique des feuilles résiduelles selon divers facteurs de variation devrait être envisagée. Les facteurs retenus pourraient être l'âge des feuilles, leur position dans le couvert et la qualité et la quantité de lumière reçue. Ces différentes données permettraient de valoriser les résultats déjà acquis par digitalisation dans l'expérimentation C sur l'architecture des plantes en repousse. Les résultats obtenus permettraient de confirmer ou d'infirmer chez la luzerne les observations sur d'autres espèces concernant un éventuel « rajeunissement » des feuilles des chaumes associé à la suppression de l'ombrage et à leur remise dans des conditions de fort éclairement (Hodgkinson, 1972 ; Hart *et al.*, 1978). En associant cette étude à un marquage continu par  $^{13}\text{C}$  et à des mesures des capacités photosynthétiques des feuilles des chaumes, il sera alors possible de suivre

l'acquisition, l'utilisation et la distribution du carbone nouvellement acquis lors de la repousse après la coupe au niveau de la plante entière en réponse aux facteurs de variation cités précédemment.

## **A.2- Co-régulation C-N des fonctions physiologiques de la luzerne**

A l'issue de ces expérimentations, les résultats obtenus pourraient servir à préciser le rôle du métabolisme carboné sur la régulation des principales fonctions physiologiques associées au métabolisme azoté telles que l'absorption, la mobilisation et la mise en réserve de l'azote lors de la repousse après la coupe. En effet, nous avons montré que les plantes présentant les niveaux de nitrate et d'acides aminés les plus bas avaient les capacités d'absorption d'azote les plus fortes lors des premiers jours suivant la coupe. Compte tenu du fait que les acides organiques et le saccharose peuvent avoir un rôle positif sur l'absorption de l'azote (Touraine *et al.*, 1994, 2001 ; Tischner, 2000 ; Lejay *et al.*, 2003), on pourrait émettre l'hypothèse qu'une surface foliaire résiduelle importante puisse contre-balancer l'effet répressur des acides aminés et du nitrate sur l'absorption chez les plantes présentant les plus forts niveaux initiaux de ces composés. Le marquage continu au  $^{13}\text{C}$  (au côté d'un marquage utilisant le  $^{15}\text{N}$ ) et notamment le suivi des différentes fractions azotées et carbonées des racines latérales (telles que le saccharose, les acides aminés et le nitrate) pourraient alors permettre de préciser le rôle de la surface foliaire résiduelle sur l'absorption de l'azote. L'ensemble des résultats obtenus pourrait enfin servir de base à l'élaboration d'un modèle fonctionnel plus complet gérant la distribution des ressources à la fois carbonées et azotées lors de la repousse après la coupe chez la luzerne.

## **B- Validation et amélioration du modèle de distribution des ressources**

### **B.1- Validation sur des données indépendantes**

Dans l'état actuel des travaux, le modèle a été construit sur un jeu de données (15HN) et a été testé sur un seul jeu de données indépendantes (6LN). Les paramètres déterminants vis-à-vis de la distribution de l'azote ont été identifiés lors de cette validation. A court terme, il sera néanmoins indispensable de décrire mathématiquement leur évolution à partir des

autres jeux de données disponibles. Ces données concernent les autres traitements étudiés dans l'article C du chapitre II. Il serait particulièrement intéressant de commencer par ceux concernant la suppression de la surface foliaire résiduelle initiale afin de préciser son rôle au début de la repousse. En outre, cette validation devrait passer par la mise en place systématique de procédures algorithmiques d'analyse de sensibilité sur les différents paramètres du modèle, ce qui devrait permettre de déterminer les paramètres les plus sensibles aux effets des différents traitements étudiés. Une description mathématique de l'évolution de ces différents paramètres en fonction des conditions de traitement devrait alors être possible tout en permettant de valider le modèle sur un plus grand nombre de situations initiales. Sur le plan fondamental, cette analyse de sensibilité devrait enfin conduire à une meilleure connaissance de la dynamique de l'azote et à préciser des étapes déterminantes dans la gestion de cet élément au cours de la repousse après la coupe chez la luzerne.

## **B.2- Utilisation des données $^{15}\text{N}$**

Le modèle développé au cours de ce travail de thèse est majoritairement basé sur des cinétiques enzymatiques de type Michaelis – Menten de premier ordre utilisant la concentration en substrat et des paramètres cinétiques apparents tels que  $V_{\max}$  et  $K_m$ . Ces paramètres ont été ajustés à partir des mesures effectuées au cours des différentes expérimentations et traduisent des équilibres apparents entre synthèse et dégradation pour la majeure partie des fonctions physiologiques observées. L'utilisation des données  $^{15}\text{N}$  actuellement disponibles dans les différents organes et pools métaboliques et leur intégration au niveau du modèle devrait être envisagée à court terme. Il s'agirait ainsi de développer un modèle permettant de gérer les flux de  $^{15}\text{N}$  (donc de l'azote d'origine exogène) entre les différents organes et pools métaboliques au cours de la repousse. La structure d'un tel modèle serait identique en tous points au modèle déjà existant et l'intégration des flux de  $^{15}\text{N}$  dans le modèle déjà développé permettrait alors de préciser les différents paramètres cinétiques apparents utilisés. Cette amélioration permettrait en outre d'avoir une idée plus précise du recyclage de l'azote endogène et de la dynamique de l'azote exogène au niveau de la plante entière, ainsi que des mécanismes de mobilisation et d'accumulation des réserves azotées lors de la repousse après la coupe.

### **B.3- Validation des compartiments xylème et phloème**

Des compartiments représentatifs des tissus du xylème et du phloème ont par ailleurs été créés pour pouvoir assurer le transfert de composés azotés entre les différents organes de la plante. Le comportement de ces deux compartiments a été déterminé à partir des connaissances bibliographiques et des expérimentations réalisées. Toutefois, aucune mesure directe n'a été faite au niveau de ces deux compartiments. De la même manière, il s'avère que la connaissance des flux d'assimilats C et N dans ces tissus spécifiques lors de la repousse après la coupe reste encore largement parcellaire au niveau de la bibliographie. Une expérimentation visant à préciser la nature de ces flux d'azote au niveau de ces tissus semble donc nécessaire, tant au niveau fondamental que pour la validation du modèle développé. Une telle expérimentation pourrait passer par des dosages des assimilats tels que le nitrate ou les acides aminés après exudation facilitée pour le xylème, ou stylectomie de pucerons pour le phloème. Ces mesures seraient à effectuer au niveau de différents organes cibles, et ce dans les quelques heures à quelques jours après la coupe. L'acquisition de telles données pourrait permettre de valider l'hypothèse du double contrôle de la synthèse des VSP par les concentrations locales en acides aminés et par le rapport des acides aminés dans le phloème et le xylème. Enfin, ces données permettraient de tester certaines hypothèses concernant la régulation du métabolisme azoté, notamment au niveau de l'absorption racinaire de nitrate. Par exemple, la simulation d'une augmentation des quantités d'acides aminés circulant au niveau du phloème pourrait être testée sur l'absorption racinaire du nitrate. L'acquisition des connaissances sur la régulation de l'absorption du nitrate réalisée par l'équipe Azote de l'UMR INRA-EVA sera un atout considérable pour mener à bien ces perspectives de recherche.

### **B.4- Modélisation de la distribution du carbone**

Le modèle actuellement développé est centré sur la distribution de l'azote au cours de la repousse et considère la croissance comme une donnée d'entrée. A moyen terme, il sera nécessaire d'améliorer ce modèle par la prise en compte du métabolisme carboné, ce qui devrait permettre l'intégration concertée des flux de carbone et d'azote au niveau de la plante entière. Une première étape pour atteindre cet objectif consisterait à développer un modèle s'attachant à décrire les flux de carbone entre les différents organes et pools métaboliques, à

l'image de ce que nous avons développé pour l'azote. Les expérimentations précédemment envisagées pourraient alors être intégrées à ce niveau et devraient permettre de faire évoluer le modèle vers la prise en compte d'aspects liés à la régulation des métabolismes azoté et carboné. Ensuite, de manière à centrer les recherches sur les mécanismes impliqués dans la distribution des ressources, une collaboration avec les équipes INRA de Lusignan (UEPF) et de Clermont-Ferrand (PIAF) pourrait être envisagée. Des modules de morphogénèse et de photosynthèse seraient alors intégrés au niveau de ce modèle, de manière à simuler l'acquisition du carbone et la croissance aussi simplement que possible.

Sur un plan fondamental, l'amélioration du modèle de base développé au cours de cette thèse devrait être un axe prioritaire de recherche pour une meilleure compréhension de la distribution des ressources lors de la repousse après la coupe chez la luzerne (et chez les plantes fourragères en général). Cet outil devrait aussi avoir pour objectif de devenir un modèle prédictif de croissance et devrait ainsi permettre une optimisation de la gestion de la production et de la pérennité de cette culture. Le passage d'une analyse des réponses d'une plante isolée cultivée en conditions contrôlées, à une plante en peuplement cultivée au champ, ainsi que la simulation de plusieurs cycles de coupes et de repousse devraient être envisagées sur le long terme.

## ***C- Evolution des fonctions physiologiques impliquées lors de la repousse en conditions de plein champ***

### **C.1- Rôle de la fixation symbiotique**

De manière à pouvoir suivre et quantifier les flux d'azote provenant de l'absorption de l'azote minéral grâce à l'utilisation du marqueur isotopique  $^{15}\text{NO}_3$ , les différentes expérimentations ont été réalisées avec des luzernes non-nodulées. A court terme, il conviendrait d'étudier la distribution des ressources C et N pour des plantes présentant une nodulation effective et se développant sur un milieu dépourvu d'azote minéral. Une telle étude devrait passer par la mise au point de techniques de marquage isotopique utilisant le  $^{15}\text{N}_2$ . Il serait alors particulièrement intéressant d'étudier la contribution de l'azote provenant de la fixation symbiotique aux parties aériennes en repousse, et l'effet de cet azote exogène sur la mobilisation plus ou moins importante des réserves C et N lors du début de la repousse.

On pourrait en effet se demander si la fourniture d'azote aux parties aériennes en repousse est significativement augmentée par l'azote d'origine symbiotique chez des plantes présentant de faibles réserves azotées initiales. Ces résultats devraient trouver un intérêt particulier lors du passage à des luzernes cultivées en plein champ.

## **C.2- Conditions environnementales et échelle agronomique**

A plus long terme, il importerait d'étudier les effets de conditions environnementales contrastées (température, éclairage, statut hydrique) sur l'utilisation, le recyclage et la mise en réserve des ressources C et N lors de la repousse après la coupe. L'ensemble des données permettrait de confirmer ou d'infirmer les différentes hypothèses émises sur une plante isolée, cultivée en conditions contrôlées, sur des plantes en peuplement au champ, notamment sur des durées de culture plus longues faisant intervenir plusieurs cycles de coupe et de repousse. Par exemple, il serait particulièrement intéressant de tester l'hypothèse (expérimentalement et *via* l'utilisation du modèle) concernant les effets positifs d'une hauteur de coupe plus importante durant l'avant dernière coupe automnale sur la persistance hivernale et la reprise de croissance au printemps. Du fait de l'importance de la survie et de la persistance hivernale de la luzerne dans les régions septentrionales connaissant des hivers longs et froids, une validation au champ au travers d'une collaboration avec les équipes canadiennes de Sainte-Foy (Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy, Québec) et / ou américaines (Department of Agronomy, Purdue University, West Lafayette, IN) pourrait être envisagée.

Le modèle qui pourrait être développé à long terme devrait permettre d'intégrer ces nouvelles données (régulation par les facteurs environnementaux) et ainsi de rendre possible la simulation de contraintes environnementales ou trophiques variées. Cet outil serait alors d'une aide précieuse pour une meilleure gestion de la production et de la pérennité chez la luzerne. Enfin, ce modèle a été originalement conçu et élaboré pour être transposable à d'autres espèces fourragères (ray-grass notamment). Les travaux issus de cette thèse devraient offrir des perspectives de recherche qui pourraient dépasser le cadre de la luzerne et de la repousse après la coupe.

## CHAPITRE VI : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

*A*méziane R., Richard-Molard C., Deléens E., Morot-Gaudry J.F. et Limami A.M., 1997.

**Nitrate ( $15\text{NO}_3^-$ ) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 202, 303-312.**

Amthor J.S., 1984. **The role of maintenance respiration in plant growth. *Plant, Cell and Environment* 7, 561-569.**

Andrews M., Sutherland J.M., Thomas R.J. et Sprent J.I., 1984. **Distribution of nitrate reductase activity in six legumes: the importance of the stem. *New Phytol.* 98, 301-310.**

Atkins C.A., Pate J.S. et MacNeil D.L., 1980. **Phloem loading and metabolism of xylem-borne amino compounds in fruiting shoots of a legume. *J. Exp. Bot.* 31, 1509-1520.**

Avice J-C. 1996. **Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago sativa* L. : Etude par marquage  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ , caractérisation des protéines de réserve du pivot et relations avec le potentiel de repousse après une coupe. Mémoire de Doctorat, Université de Caen.**

Avice J-C., Ourry A., Lemaire G. et Boucaud J., 1996a. **Nitrogen and carbon flows estimated by  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  pulse-chase labelling during regrowth of alfalfa. *Plant Physiol.* 112, 281-290.**

Avice J-C., Ourry A., Volenec J.J., Lemaire G. et Boucaud J., 1996b. **Defoliation-induced changes in abundance and immunolocalization of vegetative storage proteins in taproots of *Medicago sativa* L. *J. Plant Physiol. Biochem.* 34, 561-570.**

Avice J-C., Lemaire G., Ourry A. et Boucaud J., 1997a. **Effects of the previous shoot removal frequency on subsequent shoot regrowth in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Plant Soil* 188, 189-198.**

Avice J-C., Ourry A., Lemaire G., Volenec J.J. et Boucaud J., 1997b. **Root protein and vegetative storage proteins are key organic nutrients for alfalfa shoot regrowth. *Crop Sci.* 34, 1187-1193.**

- Avice J-C., Noquet C., Ourry A. et Volenec J.J. 2001. Effects of photoperiod, low temperature and N nutrition on VSP accumulation in taproot of alfalfa. *In Proceedings of XIX<sup>th</sup> International Grassland Congress, Brazil*, pp 52-53.
- Barber L.D., Joern B.C., Volenec J.J. et Cunningham S.M., 1996. Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen remobilization from roots. *Crop Sci.* 36, 1217-1223.
- Barneix A.J. et Causin H.F., 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J. Plant Physiol.* 149, 358-362.
- Beaudoin N., Denys D., Muller J.C., Monbrun M.O. et Ledain C., 1992. Influence d'une culture de luzerne sur le lessivage du nitrate dans les sols de champagne crayeuse. *Fourrages* 129, 45-57.
- Bélanger G., Gastal F. et Warembourg F.R. 1992. The effects of nitrogen fertilization and the growing season on carbon partitioning in a sward of tall fescue (*Festuca arundinacea* Shreb). *Ann. Bot.* 70, 239-244.
- Bélanger G. et Richards J.E. 2000. Dynamics of biomass and N accumulation of alfalfa under three N fertilization rates. *Plant Soil* 219, 177-185.
- Bijlsma R.J. et Lambers H. 2000. A dynamic whole-plant model of integrated metabolism of nitrogen and carbon. Balanced growth driven by C fluxes and regulated by signal from C and N substrate. *Plant and Soil* 220, 71-87.
- Bilbrough C.J. et Richards J.H. 1993. Growth of sagebrush and ditterbrush following simulated winter browsing : mechanisms of tolerance. *Ecology* 74, 481-492.
- Boucaud J. et Bigot J., 1989. Changes in the activities of nitrogen assimilation enzymes of *Lolium perenne* L. during regrowth after cutting. *Plant Soil.* 114, 121-125.
- Boyce P.J. et Volenec J.J., 1992.  $\beta$ -amylase from taproots of alfalfa. *Phytochem.* 31, 427-431.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Brink G.E. et Marten G.C., 1989. Harvest management of alfalfa: Nutrient yield vs. Forage quality, and relationship to persistence. *J. Prod. Agric.* 2, 32-36.



- Briske D.D., 1996. Strategies of plant survival in grazed systems : A functional interpretation. *In: Grazing Management : An Ecological Perspective*. Eds J. Hodgson and A.W. Illius. CAB International, Wallingford, pp 37-67.
- Broderick G.A., 2001. Maximizing utilization of alfalfa protein; the example of the lactating dairy cow, *Options Méditerranéennes* 45, 183-192.
- Brophy L.S. et Heichel G.H. 1989. Nitrogen release from roots of alfalfa and soybean grown in sand culture. *Plant and Soil* 116, 77-84.
- Brouwer R. 1963. Some aspects of the equilibrium between overground and underground plant parts. *Modelling IBS*. 213, 31-39.
- Brown L.G., Hoveland C.S. et Karnok K.J., 1990. Harvest management effects on alfalfa yield and root carbohydrate in three georgia environments. *Agron. J.* 82, 267-273.
- Cabon G., 1982. Les pertes en cours de récolte et de conservation de la luzerne et du trèfle violet. *Fourrages* 90, 161-180.
- Cannell M.G.R. et Dewar R.C., 1993. Carbon allocation in trees: a review of concepts for modelling. *Advances in Ecological Research* 25, 59-104.
- Champigny M.L. 1995. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. *Photosynthesis Research* 46, 117-127.
- Chapin F.S. III, Schulez E.D. et Mooney H.A. 1990. The ecology and economics of storage plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 21, 423-447.
- Chatterton N.J., Harrison P.A., Bennet J.H. et Asay K.H. 1989. Carbohydrates partitioning in 185 accesions of gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134, 169-179.
- Cherney J.H. et Duxbury J.M. 1994. Inorganic nitrogen supply and N fertilization on constituents of alfalfa. *J. Plant Nutr.* 17, 2053-2067.
- Chu C.C., Coleman J.S. et mooney H.A. 1992. Controls of biomass partitioning between roots and shoots : Atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment and the acquisition and allocation of carbon and nitrogen in wild radish. *Oecologia* 89, 580-587.
- Clement C.R., Hopper M.J., Jones L.P.H. et Leafe E.L., 1978. The uptake of nitrate by *Lolium perenne* L. from flowing nutrient solution. Effect of light; defoliation, and relationship to CO<sub>2</sub> flux. *J. Exp. Bot.* 37, 589-596.

- Coleman G.D., Englent J.M., Chen T.H.H., Ernst S.G. et Fuchigami L. 1993. **Physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation.** *Plant Physiol.* 102, 53-59
- Constable G.A., Sheridan K.P. et Gleeson A.C. 1977. **Effects of sequential defoliation on lucerne (*Medicago sativa* L.).** *Australian Journal of Agricultural Research* 28: 769-776.
- Cooper H.D. et 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.
- Cralle H. et Heichel G.H. 1981. **Nitrogen fixation and vegetative regrowth of alfalfa and birdsfoot trefoil after successive harvests or floral debudding.** *Plant Physiol.* 67, 898-905.
- Cunningham S.M. et Volenec J.J. 1996. **Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) taproots.** *J. Plant Physiol.* 147, 625-632.
- Cunningham S.M. et Volenec J.J. 1998. **Seasonal carbohydrate and nitrogen metabolism in roots of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars.** *J. Plant Physiol.* 153, 220-225.
- Cyr D.R., Bewley J.D. et Dumbroff E.P. 1990. **Seasonal variation in nitrogen storage reserves in the roots of leafy spurge (*Euphorbia escula*) and response to decapitation and defoliation.** *Physiol. Plant.* 78, 361-366.
- Cyr D.R. et Bewley J.D. 1990. **Proteins in the roots of the perennial weeds of chicory (*Cichorium intybus* L.) and dandelion (*Taraxacum officinalis* Weber) are associated with overwintering.** *Planta.* 182, 370-374.
- Danckwerts J.E. et Gordon A.J. 1987. **Long term partitioning, storage and remobilization of <sup>14</sup>C assimilation by *Lolium perenne* (cv Melle).** *Ann. Bot.* 59, 55-66.
- Davidson R. 1969. **Effects of soil nutrients and moisture on root/shoot ratio in *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L.** *Ann. Bot.* 33, 571-577.
- Dhont C., Castonguay Y., Nadeau P., Bélanger G. et Chalifour F-P. 2002. **Alfalfa root carbohydrates and regrowth potential in response to fall harvests.** *Crop Sci.* 42, 754-765.
- Dhont C., Castonguay Y., Nadeau P., Bélanger G. et Chalifour F-P. 2003. **Alfalfa root nitrogen reserves and regrowth potential in response to fall harvests.** *Crop Sci.* 43: 181-194.

- De Wald D.B., Sadka A. et Mullet J.E. 1994. Sucrose modulation of soybean vegetative storage proteins VSP $\alpha$  and VSP $\beta$  are acid phosphatases active on polyphosphates. *J. Biol. Chem.* 22, 15958-15964.
- De Visser R., Vianden H. et Schnyder H. 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  steady state labelling. *Plant Cell and Environ.* 20, 37-46.
- Demarquilly C., 1982. Valeur alimentaire des légumineuses (luzerne et trèfle violet) en vert et modifications entraînées par les différentes méthodes de conservation. *Fourrages* 90, 181-202.
- Denisson R.F., Hunt S. et Layzell D.B. 1992. Nitrogenase activity, nodule respiration, and  $\text{O}_2$  permeability following detopping of alfalfa and birdsfoot trefoil. *Plant Physiol.* 98, 894-900.
- Dewar R.C., 1993. A root-shoot partitioning model based on carbon-nitrogen-water interactions and Münch phloem flow. *Functional Ecology* 7, 356-368.
- Dufour L., Faucher M. et Lemaire G. 1989. Etude des transferts d'assimilats entre tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.) par l'utilisation du  $^{14}\text{CO}_2$ . *Agronomie* 9, 377-382.
- Edminsten K.L. et Wolf D.D. 1988. Fall harvest management of alfalfa : The implications of photosynthesis, respiration and taproot nonstructural carbohydrate accumulation on fall harvest management. *Agron. J.* 80, 688-693.
- Engels C., 1994. Effect of root and shoot meristem temperature on shoot to root dry matter partitioning and the internal concentrations of nitrogen and carbohydrates in maize and wheat. *Ann. Bot.* 73, 211-219.
- Enquist B.J., 2001. Cope's rule and the evolution of long-distance transport in vascular plants: allometric scaling, biomass partitioning and optimization. *Plant Cell and Environment* 26, 151-161.
- Escobar – Gutiérrez A.J., Daudet F.A., Gaudillère J.P., Maillard P. et Frossard J.S., 1998. Modelling of allocation and balance of carbon in walnut (*Juglans regia* L.) seedlings during heterotrophy-autotrophy transition. *J. Theor. Biol.* 194, 29-47.
- Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of  $\text{C}_3$  plants. *Oecologia* 78, 9-19.

- F**rankhauser J.J. Jr, Volenec J.J. et Brown G.A., 1989. Composition and structure starch of taproots of contrasting genotypes of *Medicago sativa* L. *Plant Physiol.* 90, 1189-1194.
- Faye L., Landry N., Lerouge P., Gomord V. et Vézina L.P., 2001. La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. *Médecine Sciences* 17, 867-877.
- Fishbeck K.A. et Philipps D.A. 1981. Combined nitrogen and vegetative regrowth of symbiotically-grown alfalfa. *Agron. J.* 73, 975-978.
- Fischer D.B., 1978. The estimation of sugar concentration in individual sieve-tube elements by negative staining. *Planta* 139, 19-24.
- Fischer W.N., André B, Rentsch D., Krolkiewicz S., Tedeger M., Breikreuz K. et Frommer W.B., 1998. Amino acids transport in plants. *Trends in Plant Science* 3, 188-195.
- Fouldrin K. et Limami A.M. 1993. The influence of nitrogen ( $^{15}\text{NO}_3^-$ ) supply to chicory plants during forcing on the uptake and remobilization of N reserves for chicory growth. *J. Exp. Bot.* 44, 1313-1319.
- Foutz A.L., Wilhelm W.W. et Dobrenz A.K. 1976. Relationship between physiological and morphological characteristics and yield of nondormant alfalfa clones. *Agronomy J.* 68, 587-591.
- Forde B.G. 2002. Local and long-range signalling pathways regulating plant responses to nitrate. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53, 203-226.
- G**abrielle B., Denoroy P., Gosse G., Justes E., Andersen M.N. 1998. Development and evaluation of a CERES-type model for winter oilseed rape. *Field Crops Research* 57, 95-111.
- Gana J.A., Kalengamaliro N.E., Cunningham S.M. et Volenec J.J. 1997. Expression of  $\beta$ -amylase from alfalfa taproots. *Plant Physiol.* 118, 1495-1506.
- Geiger D.R. et Fondy B.R., 1991. Regulation of carbon allocation and partitioning: status and research agenda – In: *Recent Advances in phloem transport and assimilate compartmentation, control of allocation and partitioning*, Bonnemain J.L., Delrot S., Lucas W.J. et Dainty J., Eds., Ouest Editions, Presses Académiques, 1-9.

- Gifford R.M. et Evans L.T., 1981. Photosynthesis, carbon partitioning, and yield. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 485-509.
- Girousse C., Bourneville R. et Bonnemain J.L. 1996 Water deficit induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol* 111,109-113.
- Gleeson S.K. et Tilman D. 1992. Plant allocation and the multiple limitation hypothesis. *Am. Nat.* 139, 1322-1343.
- Gold W.G. et Caldwell M.M. 1989. The effects of the spatial pattern of defoliation on regrowth of a tussock grass. *Oecologia* 81, 437-442.
- Gordon A.J. et Kessler W., 1990. Defoliation-induced stress in nodules of white clover. *J. Exp. Bot.* 41, 1255-1262.
- Graber L.F., Nelson N.T., Luekel W.A. et Albert W.B. 1927. Organic food reserves in relation to growth of alfalfa and other perennial herbaceous plants. *Res. Bull.* 80, Univ. Of Wisconsin, Madison.
- Granfield C.O. 1943. Food reserves and their translocation to the crown buds as related to cold and drought resistance in alfalfa. *J. Agric. Res.* 67, 33-47.
- Gramshaw D., Lowe K.F. et Lloyd D.L. 1993. Effect of cutting interval and winter dormancy on yield, persistence, nitrogen concentration and root reserves of irrigated lucerne in the queensland subtropics. *Aust. J. of Exp. Agric.* 33: 847-854.
- Grayston S.J., Vaughan D. et Jones D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants : the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5, 29-56.
- Guines F., Julier B., Ecalle C. et Huyghe C., 2003. Among and within-cultivar variability for histological traits of lucerne (*Medicago sativa* L.) stem. *Euphytica* 130, 293-301.

*H*aagenson D.M., Cunningham S.M., Joern B.C. and Volenec J.J. (2003) Autumn defoliation effects on alfalfa winter survival, root physiology, and gene expression. *Crop Science* 43, 1340-1348.

- Habben J.E. et Volenec J.J. 1990. Starch grain distribution in taproots of defoliated *Medicago sativa* L. *Plant Physiol.* 94, 1056-1061.
- Hansen S., Jensen H.E., Nielsen N.E., et Svendsen H. 1991. Simulation of the nitrogen dynamics and biomass production in winter wheat using the Danish simulation model DAISY. *Fertilizer Research* 27, 245-259.

- Harper J.E., Schrader L.E. et Lowell R.W. 1990. eds, *Am. Soc. Plant Physiol.*, Rockville MD. pp 55-71.
- Hart R.H., Pearce R.B., Chatterton N.J., Carlson G.E., Barnes D.K. et Hanson C.H. 1978. Alfalfa yield, specific leaf weight, CO<sub>2</sub> exchange rate, and morphology. *Crop Sci.* 18, 649-653.
- Heilmeyer H., Freund M., Steinlein T., Schulze E.D. et Monson R.K., 1994. The influence of nitrogen availability on carbon and nitrogen storage in the biennial *Cirsum vulgare* (Savi) Ten. I. Storage capacity in relation to resource acquisition, allocation and recycling. *Plant Cell Env.* 17, 1125-1131.
- Hendershot K.L. et Volenec J.J. 1993a. Taproot nitrogen accumulation and use in overwintering alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 141, 68-74.
- Hendershot K.L. et Volenec J.J. 1993b. Nitrogen pools in taproots of *Medicago sativa* L. after defoliation. *J. Plant Physiol.* 141, 129-135.
- Hildbert D.W. et Reynolds J.F., 1991. A model allocating growth among leaf proteins, shoot structure, and root biomass to produce balanced activity. *Annals of Botany* 68, 417-425.
- Hodgkinson K.C. 1969. The utilization of root organic compounds during the regeneration of lucerne. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1113-1123.
- Hodgkinson K.C., Smith N.G. et Miles G.E. 1972. The photosynthetic capacity of stubble leaves and their contribution to growth of the lucerne plant after high level cutting. *Aust. J. Agric. Res.* 23, 225-238.
- Huffaker R.C., 1982. Biochemistry and physiology of leaf proteins. In : *Nucleic Acids and Proteins in Plants. 1. Encyclopedia of Plant Physiology*, Boulter D. And Parthier B. eds, Springer Verlag, Berlin, pp. 370-400.
- Huyghe C., 2003. Les fourrages et la production de protéines. *Fourrages* 174, 145-162.
- I*msande J. et Touraine B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* 105, 3-7.
- J*ang J.C. et Sheen J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6, 1665-1679.
- Jarrige R., 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins : *Ed INRA*, ISBN : 2-7380-0021-5, 472 pages.

- Jarvis S.C. et Macduff J.H. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *J. Exp. Bot.* 40, 965-975.
- Jeuffroy M.H. et Recous S. 1999. Azodyn : a simple model simulating the date of nitrogen deficiency for decision support in wheat fertilization. *European Journal of Agronomy* 10, 129-144.
- Jeuffroy M.H., Ney B. et Ourry A. 2002. Integrated physiological and agronomic modelling of N capture and use within the plant. *J. Exp. Bot.* 53, 809-823.
- Johnson I.R. et Thornley J.H.M., 1983. Vegetative crop growth model incorporating leaf area expansion and senescence, and applied to grass. *Plant , Cell and Environment* 6, 721-729.
- Johnson I.R. et Thornley J.H.M., 1985. Dynamic model of the response of a vegetative grass crop to light, temperature and nitrogen. *Plant, Cell and Environment* 8, 485-499.
- Jones C.A. et Kiniry J.R., 1986. CERES-Maize, a simulation model of maize growth and development. Texas: Texas A&M University Press.
- Jung H.G. et Deetz D.A., 1993. Cell wall lignification and degradability. In: *Forage cell wall and digestibility*, Eds H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph , Madison, Wisconsin, USA, pp. 315-346
- Justes E., Thiébeau P., Avice J-C., Lemaire G., Volenec J.J. et Ourry A. 2002 Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 53, 111-121.
- Kalengamaliro N.E., Volenec J.J., Cunningham S.M., et Joern B.C. 1997 Seedling development and deposition of starch and storage proteins in alfalfa roots. *Crop Science* 37, 1194-1200.
- Kim T.H., Ourry A., Boucaud J. et Lemaire G. 1991. Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (*Medicago sativa* L.) following removal of shoots. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 593-602.
- Kim T.H., Bigot J., Ourry A. et Boucaud J. 1993. Amino acid contents of xylem sap of regrowing lucerne (*Medicago sativa* L.): relations with N uptake, N<sub>2</sub> fixation and reserves remobilization. *Plant Soil.* 149, 167-174.

- Koch G.W, Schulze E.D., Percival F., Mooney H.A. et Chu C. 1988. **The nitrogen balance of *Raphanus sativus* \* *raphanistrum* plants. II Growth, nitrogen redistribution and photosynthesis under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> deprivation.** *Plant, Cell Environ* 11, 755-767.
- Kunelius H.T. 1974. Effect of weed control and N fertilization at establishment on the growth and nodulation of alfalfa. *Agron. J.* 66, 806-808.
- Kust C.A. et Smith D. 1961. **Influence of harvest management on level of carbohydrate reserves, longevity of stands, and yields of hay and protein from Vernal alfalfa.** *Crop Sci.* 1, 267-269.
- Laemmli U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227, 680-685.
- Lalonde S., Tedeger M., Throne-Holst M., Frommer W.B. et Patrick J.W., 2003. **Phloem loading and unloading of sugars and amino acids.** *Plant, Cell and Environ.* 26, 37-56.
- Landsberg J.J., Kaufmann M.R., Binkley D., Isebrands J. et Jarvis P.G., 1991. **Evaluating progress towards closed forest models based on fluxes of carbon, water and nutrients.** *Tree Physiology* 9, 1-15.
- Langer R.H. et Steinke T.D. 1965. **Growth of lucerne in response to height and frequency of defoliation.** *J. Agric. Sci.* 64, 291-294..
- Langheinrich U. et Tischner R. 1991. **Vegetative storage protein in polar: induction and characterization of a 32 and a 36 kD polypeptide.** *Plant Physiol.* 97, 1017-1025.
- Lauter F.R., Ninnemann O., Bucher M., Riesmeier J.W. et 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.
- Leach G.J. 1967. **The growth of the lucerne plant after cutting: The effects of cutting at different stages of maturity and at different intensities.** *Aust. J. Agric. Res.* 19, 517-530.
- Le Gall A., 1991. **La luzerne, culture et utilisation.** Brochure ITEB, GNIs et ITCF, 40 pages
- Le Gall A., 1993. **Les grandes légumineuses : Situation actuelle, atouts et perspectives dans le paysage fourrager français.** *Fourrages* 134, 121-144.



- Lejay L., Gansel X., Cerezo M., Tillard P., Müller C., Krapp A., Von Wirén N., Iel-Vedele F. et Gojon A. 2003. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: Functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15, 2218-2232.
- Lemaire G., Khaity M., Onillon B., Allirand J.M., Chartier M. et Gosse G. 1992. Dynamics of accumulation and partitioning of N in leaves, stems and roots of lucerne (*Medicago sativa* L.) in a dense canopy. *Ann. Bot.* 70, 429-435.
- Lemaire G. et Allirand J.M., 1993. Relation entre croissance et qualité de la luzerne : interaction génotype-mode d'exploitation. *Fourrages* 134, 183-198.
- Lemaire G. et Millard P. 1999. An ecophysiological approach to modelling resources fluxes in competing plants. *J. Exp. Bot.* 330, 15-28.
- Lemaire G. 2001. Ecophysiology of grasslands : Dynamic aspects of forage plant populations in grazed swards. In *Proceedings of the XIX International Grassland Congress 2001, Brasil*, 29-37.
- Le Roux X., Lacoïnte A., Escobar-Gutiérrez A. et Le Dizès S., 2001. Carbon-based models of individual tree growth : a critical appraisal. *Ann. For. Sci.* 58, 469-506.
- Levy P.E., Lucas M.E., MacKay H.M., Escobar-Gutiérrez A.J. et Rey A. Testing a process-based model of tree seedling growth by manipulating [CO<sub>2</sub>] and nutrient uptake. *Tree Physiology* 20, 993-1005.
- Li R., Joern B.C., Volenec J.J. et Cunningham S.M. 1996. Seasonal changes in non-structural carbohydrates, protein and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop Sci.* 36, 617-623.
- Louahlia S., Macduff J.H., Ourry A., Humphreys M. et Boucaud J. 1999. N reserves status affects the dynamics of remobilization and mineral N uptake during recovery from defoliation by contrasting cultivars of *Lolium perenne* L. *New Phytol.* 142, 451-462.
- MacDowall F.D.H. 1983. Kinetics of first-cutting regrowth of alfalfa plants and nitrogenase activity in a controlled environment with or without added nitrate. *Can. J. Bot.* 61, 2405-2409.
- MacDuff J.H., Jarvis S.C. et Mosquera A. 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. Assimilation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and short-term effects on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. *J. Exp. Bot.* 40, 977-984.

- Mac Kee H.S., 1962. Nitrogen metabolism in plants. Clarendon Press, Oxford.
- Magnuson C.E., Goeschl J.D., et Fares Y., 1986. Experimental tests of the Münch-Horwitz theory of phloem transport: effects of loading rates. *Plant, Cell and Environment* 9, 103-109.
- Mäkelä A.A. et Sievänen R.P., 1987. Comparison of two Shoot-Root partitioning models with respect to substrate utilization and functional balance. *Ann. Bot.* 59, 129-140.
- Marcelis L.F.M., 1993. Simulation of biomass allocation in greenhouse crops, a review. *Acta Horticulturae*, 328-49-67.
- Marcelis L.F.M., 1994. A simulation model for dry matter partitioning in cucumber. *Ann. Bot.* 74, 43-52.
- Marriot C.A. et Haystead A. 1990. The effects of defoliation on the nitrogen economy of white clover: regrowth and the remobilization of plant organic nitrogen. *Ann. Bot.* 66, 465-474.
- Mason M.S., Dewald D.B., Creelman R.A. et Mullet J.E. 1992. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyljasmonate and soluble sugars. *Plant Physiol.* 98, 859-867.
- Maurières M., 1994. La luzerne aujourd'hui. *Editions France Agricole*, p 255.
- Meuriot F., Avice J-C., Decau M-L., Simon J-C. et Ourry A. 2003. Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. *Plant Science* 165: 709-718.
- Meuriot F., Noquet C., Avice J-C., Volenec J.J., Cunningham S.M., Sors T., Caillot S. et Ourry A. 2004. Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserves accumulation and induces gene expression of a 32-kDa vegetative storage protein that possess chitinase activity in *Medicago sativa* L. taproot. *Physiol. Plant.* 119: 1-11.
- Mifflin B.J. et Lea P.J., 1977. Amino acids metabolism. *Annu Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329.
- Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* 11, 1-8.
- Millard P., Thomas R.J. et Buckland S.T. 1990. Nitrogen supply affects the remobilization of nitrogen for the regrowth of defoliated *Lolium perenne* L. *J. Exp. Bot.* 41, 941-947.
- Millard P. et Proe M.F. 1993. Nitrogen uptake, partitioning and internal cycling in *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. as influenced by nitrogen supply. *New Phytol.* 125, 113-119.

- Miller A.J. et Smith S.J., 1996. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *J. Exp. Bot.* 47, 843-854.
- Minchin P.E.H., Thorpe M.R. et Farrar J.F., 1993. A simple mechanistic model of phloem transport which explains sink priority. *J. Exp. Bot.* 44, 947-955.
- Morvan-Bertrand A., Boucaud J. et Prud'homme M.P. 1999. Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. Bravo following defoliation. *J. Exp. Bot.* 50: 1817-1826.
- Muller B. et Touraine B. 1992. Inhibition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43, 617-623.
- Münch E., 1930. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Gustav Fischer, Jena.

Noquet C., Avice J-C., Ourry A., Volenec J.J., Cunningham S.M. et Boucaud J. 2001.

Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot storage protein accumulation in *Medicago sativa* L. *Aust. J. of Plant Physiol.* 28: 279-288.

Noquet C., Meuriot F., Avice J-C., Ourry A., Cunningham S.M. et. Volenec J.J. 2003. Short-day photoperiod-induced changes in N uptake, N partitioning and accumulation of vegetative storage proteins in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Functional Plant Biology*, 30, 1-11.

Ortiz-Lopez A., Chang H.C. et Bush D.R., 2000. Amino acid transporters in plants.

*Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 275-280.

Ourry A., Boucaud J. et Salette J. 1988. Nitrogen mobilization from stubble and roots during regrowth of defoliated perennial ryegrass. *Crop Sci.* 30, 1251-1254.

Ourry A., Kim T.H. et Boucaud J. 1994. Nitrogen reserve mobilization during regrowth of *Medicago sativa* L.: relationships between their availability and regrowth yield. *Plant Physiol.* 105, 831-837.

Ourry A., Macduff J., Volenec J.J. et Gaudillère J.P. 2001. Nitrogen traffic during plant growth and development. *In Plant Nitrogen*. Eds JF Morot-Gaudry and P. Lea, Springer Verlag, pp. 255-273.

- P**assioura J.B. et Ashford A.E., 1974. Rapid translocation in the phloem of wheat roots. *Aust. J. of Plant Physiol.* 1, 521-527.
- Pate J.S., 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 313-340.
- Paul M.J. et Driscoll S.P. 1997. Sugar repression of photosynthesis : the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source / sink imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20, 110-116.
- Penning de Vries F.W.T., Jansen D.M., Den Berge H.F.M. et Bakema A., 1989. *In: Simulation of ecophysiological processes of growth in several annual crops – Simulation Monographs 29*, Pudoc, Wageningen, pp. 82-88.
- Peoples M.B., Sudin M.N. et Herridge D.F., 1987. Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate-fed amide-exporting legumes. *J. Exp. Bot.* 38, 567-579.
- Peterson G.L. 1983. Determination of total protein. *Meth. Enzymol.* 91, 95-119.
- Philippot S., Allirand J-M., Chartier M. et Gosse G. 1990. The role of daily irradiations on shoot growth and shoot/root ratio in lucerne (*Medicago sativa* L.). in *Plant Metabolism*, ed Denis D.T., Turpin D.H., Lefebvre D.D., et Layzell D.B., 2<sup>nd</sup> Edition, Longman, 33, 525-538.
- Picard J., 1982. Les légumineuses dans la production fourragère française ; évolution au cours des 20 dernières années. *Fourrages* 90, 17-26.
- Prud'homme M-P., Gonzalez B., Billard J-P. et Boucaud J. 1992. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne* L.) as affected by source/sink modifications after cutting. *J. Plant Physiol.* 140, 282-291.
- Q**uinn M.A. et Hall M.H. 1996. Compensatory growth response of the legume, *Medicago sativa*, to defoliation and denodulation. *Entomologia Exp. et App.* 78, 243-252.
- R**astetter E.B., Ryan M.G., Shaver G.R., Melillo J.M., Nadelhoffer K.J., Hobbie J.E. et Aber J.D. 1991. A general biogeochemical model describing the responses of the C

- and N cycles in terrestrial ecosystems to changes in CO<sub>2</sub> and climate, and N deposition. *Tree Physiol.* 9, 101-126.
- Raven J.A., 1987. The role of vacuoles. *New Phytologist.* 106, 357-422.
- Rechel, E 1993. Etiolated growth as a measure of non structural biomass in lucerne taproots. *Ann. Bot.* 72, 103-106.
- Reynolds J.H. 1971. Carbohydrate trends in alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots under several forage harvest schedules. *Crop Sci.* 11, 103-106.
- Reynolds J.F. et Chen J. 1996. Modelling whole-plant allocation in relation to carbon and nitrogen supply: Coordination versus optimization :Opinion. *Plant and Soil* 185, 65-74.
- Riens B., Lohaus G., Heineke D. et Heldt H.W., 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol.* 97, 227-233.
- Richards J.H. 1993. Physiology of plants recovering from defoliation. *In: M.J. Bakes, ed Grassland for our world.* Wellington, New Zealand: SIR Publishing, 46-54.
- Rossato L., Lainé P. et Ourry A., 2001. Nitrogen storage and remobilization 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., Ledantec C., Lainé P. et Ourry A. 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: Identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein. *J. Exp. Bot.* 53, 265-275.
- Rufty T.W., Raper C.D. et Huber S.C. 1984. Alterations in interal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Can. J. Bot.* 62, 501-508.
- Ryle G.J.A., Powell C.E. et Gordon A.J., 1986. Defoliation in white clover: Nodule metabolism, nodule growth and maintenance, and nitrogenase functioning during growth and regrowth. *Ann. Bot.* 57, 263-271.
- Sakano K. et Tazawa M., 1984. Intracellular distribution of free amino acids between the vacuolar and extravacuolar compartments in internodal cells of *Chara australis*. *Plant Cell Physiol.* 25, 1477-1486.

- Simon J.C., Jacquet A., Decau M.L., Goulas E. et Le Dily F., 2003. **Influence of cutting frequency on the morphology and the C and N reserve status of two cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.).** *Europ. J. Agron.* 19, 1-10.
- Simon J-C., Decau M-L., Jacquet A., Avice J-C., Meuriot F. et Allirand J-M.. 2004. **Effect of residual leaf area and N reserve status after cutting on leaf area establishment and dry matter production during regrowth of alfalfa.** *Can. J. Plant Sci.*, sous presse.
- Sinclair T.R. et Horie T. 1989. **Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency : a review.** *Crop Sci.* 29, 90-98.
- Smith D. et Nelson C.J. 1967. **Growth of birdsfoot trefoil and alfalfa. Responses to height and frequency of cutting.** *Crop Sci.* 7, 130-133.
- Smith L.H. et Marten G.C. 1970. **Foliar regrowth of alfalfa utilizing <sup>14</sup>C-labeled carbohydrates stored in roots.** *Crop Sci.* 10, 146-150.
- Staswick P.E. 1989. **Developmental regulation and influence of plants sinks on vegetative storage protein gene expression in soybean leaves.** *Plant Physiol.* 89, 309-315.
- Staswick P.E. 1990. **Novel regulation of vegetative storage protein genes.** *Plant Cell* 2, 1-6.
- Staswick P.E., Huang J. et Rhee Y. 1991. **Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes.** *Plant Physiol.* 96, 130-136
- Staswick P.E. 1994. **Storage proteins in vegetative plant tissues.** *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 302-322.
- Stephenson L.C., Bunker T.W., Wesly E.D. et Grimes H.D. 1998. **Specific soybean lipoxygenases localized to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status.** *Plant Physiol.* 116, 923-933.
- Stépien V., Sauter J.J. et Martin F. 1994. **Vegetative storage proteins in woody plants.** *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 32, 185-192.
- Sutherland J.M., Andrews M., Mac Inroy S. et Sprent J.I., 1985. **The distribution of nitrate assimilation between root and shoot in *Vicia faba* L.** *Ann. Bot.* 56, 259-263.
- Ta T.C., MacDowall F.D.H. et Faris M.A. 1990 **Utilization of carbon and nitrogen reserves of alfalfa roots in supporting N<sub>2</sub>-fixation and shoot regrowth.** *Plant Soil* 127: 231-236.
- Tabourel-Tayot F. et Gastal F. 1998. **MecaNiCAL, a supply-demand model of carbon and nitrogen partitioning applied to defoliated grass. 1. Model description and analysis.** *European Journal of Agronomy* 9, 223-241.

- Thorgeirson H., 1988. The modelling and measurement of respiratory carbon use and net carbon gain to two Agropyron bunchgrasses. *Ph. D. Dissertation*, Utah State University, Logan.
- Thornley J.H.M. 1972. A balanced quantitative model for root: shoot ratios in vegetative plants. *Ann. Bot.* 36, 431-441.
- Thornley J.H.M. et Cannell M.G.R. 1992. Nitrogen relations in a forest plantation. Soil organic matter ecosystem model. *Ann. Bot.* 70, 137-151.
- Thornley J.M. 1995. Shoot : root allocation with respect to C, N and P: an investigation and comparison of resistance and teleonomic models. *Ann. Bot.* 75, 391-405.
- Thornton B., Millard P., Duff E.I. et Buckland S.T. 1993. The relative contribution of remobilization and root uptake in supplying nitrogen after defoliation for regrowth of laminae in four grass species. *New Phytol.* 124, 689-694.
- Thornton B., Millard P. et Duff E.I. 1994. Effects of nitrogen supply on the source of nitrogen used for regrowth of laminae after defoliation in four grass species. *New Phytol.* 128, 615-620.
- Thornton B. et Millard P. 1997. Increased -defoliation frequency depletes remobilization of nitrogen for leaf growth in grasses. *Ann. Bot.* 80, 89-95.
- Thornton B., Millard P. et Bausewein U. 2000. Reserve formation and recycling of carbon and nitrogen during regrowth of defoliated plants. In: *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 85-97.
- Tischner R. 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment* 23, 1005-1024.
- Touraine B., Clarkson D.T., et Muller B., 1994. Regulation of nitrate uptake at the whole plant level. In: *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions, coupling of nitrogen and carbon metabolisms for resource acquisition and use*. Eds Garnier R.J., SPB Academic Publishing, 11-31.
- Touraine B., Daniel-Vedèle F. et Forde B.G. 2001. Nitrate uptake and its regulation in plant. Lea PJ & Morot Gaudry JF eds, New York, 1-36.
- Touraine B. et Gojon A. 2001. Integration of nitrate uptake in the whole plant. In: *Nitrogen Assimilation by Plants*, Ed Morot-Gaudry J.F., INRA, pp 95-114.
- Tranbarger T.J., Franceschi V.R., Hildebrand D.F. et Grimes H.D. 1991 The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mésophylle cell vacuoles. *Plant Cell* 3, 973-987.

Trimble M.W., Barnes D.K., Heichel G.H. et Shaeffer C.C. 1987. Forage yield and nitrogen partitioning responses of alfalfa to two cutting regimes and three soil nitrogen regimes. *Crop Sci.* 27, 909-914.

Vance C.P., Heichel G.H., Barnes D.K., Bryan J.W. et Johnson L.E. 1979. Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. *Plant Physiol.* 64, 1-8.

Vance C.P. et Heichel G.H. 1981. Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa. *Plant Physiol.* 68, 1052-1056.

Van Cleve B et Apel K. 1993. Induction by nitrogen and low temperature of storage protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* 189, 157-160.

Van Keulen H. et Seilman N.G., 1987. In: Simulation of water use, nitrogen nutrient and growth of spring wheat crop – *Simulation Monographs*, Pudoc, Wageningen, 310 p.

Volenc J.J., Ourry A. et Joern B.C. 1996. A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiol. Plant.* 97, 185-193.

Volenc J.J., Joern B.C., Cunningham S.M. et Ourry A. 1998. Molecular analysis of alfalfa root vegetative storage proteins. In: *Molecular and Cellular Technologies for Forage Improvement. Crop Sci. Soc. of Am.* Madison, USA. pp 59-73.

Von Wirén N., Gazzarrini S. et Frommer W.B. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil* 196, 191-199.

Wallace W. 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and comparison with wheat. *Physiol. Plant.* 66, 630-636.

Wardlaw I.F., 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.* 116, 341-381.

Whyte R.O., Nilsson-Leissner G. et Trumble H.C. 1953. Legumes in agriculture. *FAO Agriculture Studies, series 21*, Rome, Italy.

Williams L.E. et Miller A.J., 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 659-688.

Wittenbach V.A. 1983. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. *Plant Physiol.* 73, 125-129.



- Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M., Xiong F., Yang D.S.C., Wiseman S.B., Sarhan F., Danyluk J., Xue Y.Q., Hew C.L., Doherty-Kirby A. et Lajoie G. 2000. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol.* 124, 1251-1263.
- Zamski E., 1996. Anatomical and physiological characteristics of sink cells. In: Zamski E. and Schaffer A.A. eds *Photoassimilate Distribution in Crop Plants: Source – Sink Relationships*. Marcel Dekker, New York, pp 283-310.
- Zhang N. et MacKown C.T. 1993. Nitrate fluxes and nitrate reductase activity of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 102, 851-857.
- Zhu B. et Coleman G.D. 2001. Phytochrome-mediated photoperiod perception, shoot growth, glutamine, calcium, and protein phosphorylation influence the activity of the poplar bark storage protein gene promoter (*bspA*). *Plant Physiol.* 126, 342-351.
- Ziegler H., 1975. Nature of transported substances. In *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, *Transport in Plants*. 1. *Phloem Transport*. Zimmermann M.H. and Milburn J.A., ed., Springer Verlag, Berlin, 59-100.



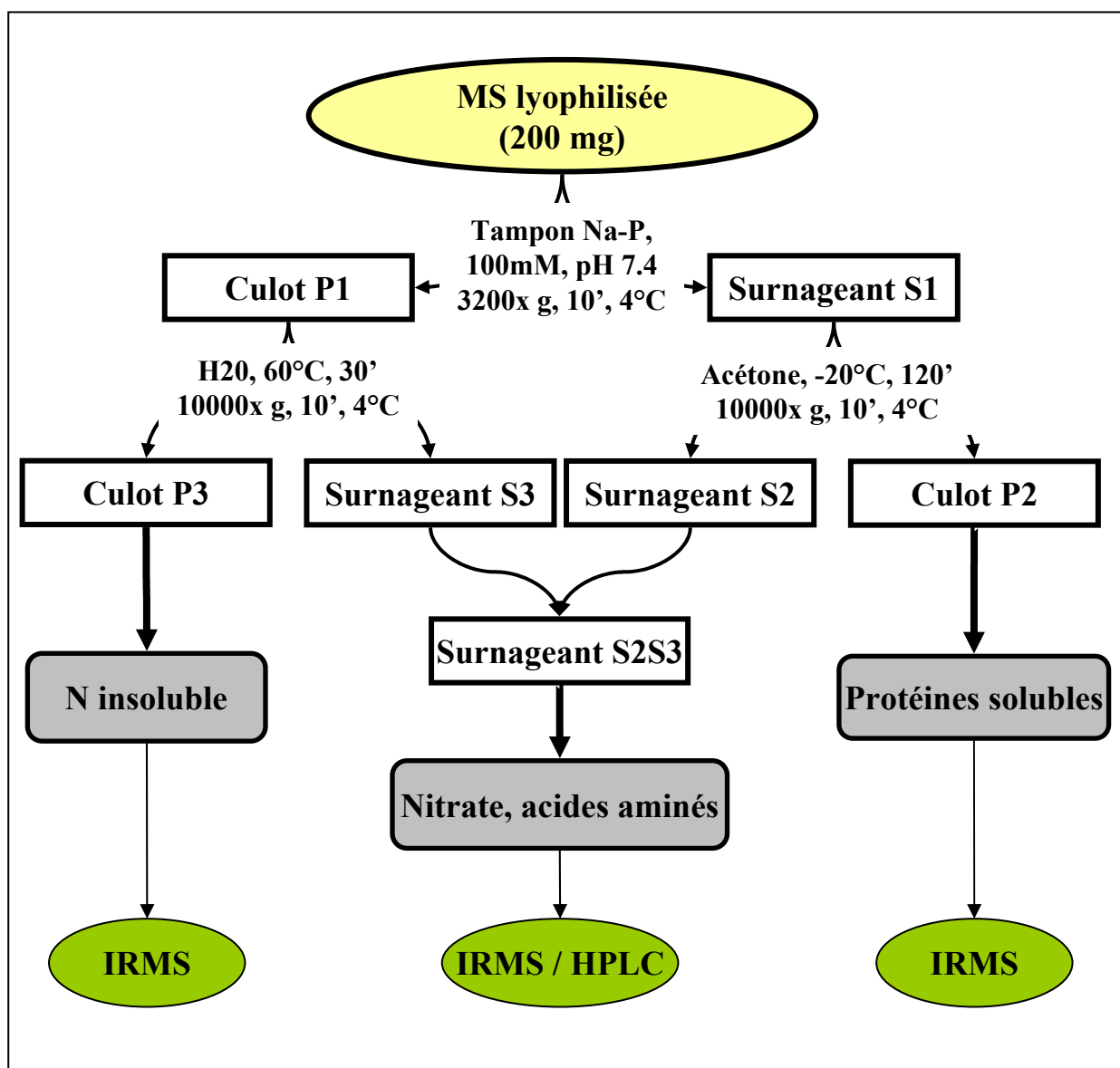
## ANNEXES

### A - Modélisation de la distribution de l'azote chez la luzerne

#### A.1- Diagramme conceptuel

Un modèle déterministe dynamique rendant respectivement compte de la répartition et de l'allocation de l'azote entre les différents organes et pools N chez la luzerne a été présenté dans le chapitre III. Le diagramme conceptuel représentatif de ce modèle est présenté en Annexe A.1.

La plante est modélisée comme un réseau dans lequel seuls le nitrate et les acides aminés peuvent circuler dans les vaisseaux du xylème et / ou du phloème entre les différents organes structuraux du végétal (tels que racines latérales, pivot, vieilles feuilles...). Ces organes agissent comme des sources et / ou des puits vis-à-vis de l'azote, et ils représentent les principaux noeuds du système. Dans un organe puit, la demande en azote est représentée par la somme de trois demandes élémentaires pour : l'N associé à la croissance structurale, l'N associé à des composés à activité métabolique, et l'N mis en réserve. Le fonctionnement de chaque organe permet de rendre compte de la distribution de l'azote, et est modélisé avec deux niveaux de contrôle, i) la disponibilité en pools N rapidement utilisables (tels que le nitrate et les acides aminés) dans chaque organe (offre en N), et ii) la capacité de chaque organe à utiliser ces ressources (demande N). Ceci constitue l'hypothèse de base du modèle. Quatre sources N principales sont représentées dans le modèle : trois sources d'N solubles, telles que le nitrate, les acides aminés et les protéines solubles, et une source d'N insoluble, associée à la structure du tissu. Toutefois, compte tenu de l'importance des VSP du pivot quant à la reprise de la croissance au printemps ou après la coupe (avice *et al.*, 1996a ; Volenec *et al.*, 1996, 1998 ; Justes *et al.*, 2002), un quatrième source en N représentative de ces VSP a été intégrée au niveau du pivot. Enfin, des pertes racinaires par exsudation et / ou mortalité et senescence racinaires étant rencontrées chez la luzerne après la coupe, un compartiment représentatif de ces pertes a été créé. La croissance et l'absorption sont des données d'entrée du modèle, et les flux d'N, ainsi que la répartition et l'allocation de cet élément constituent les sorties.

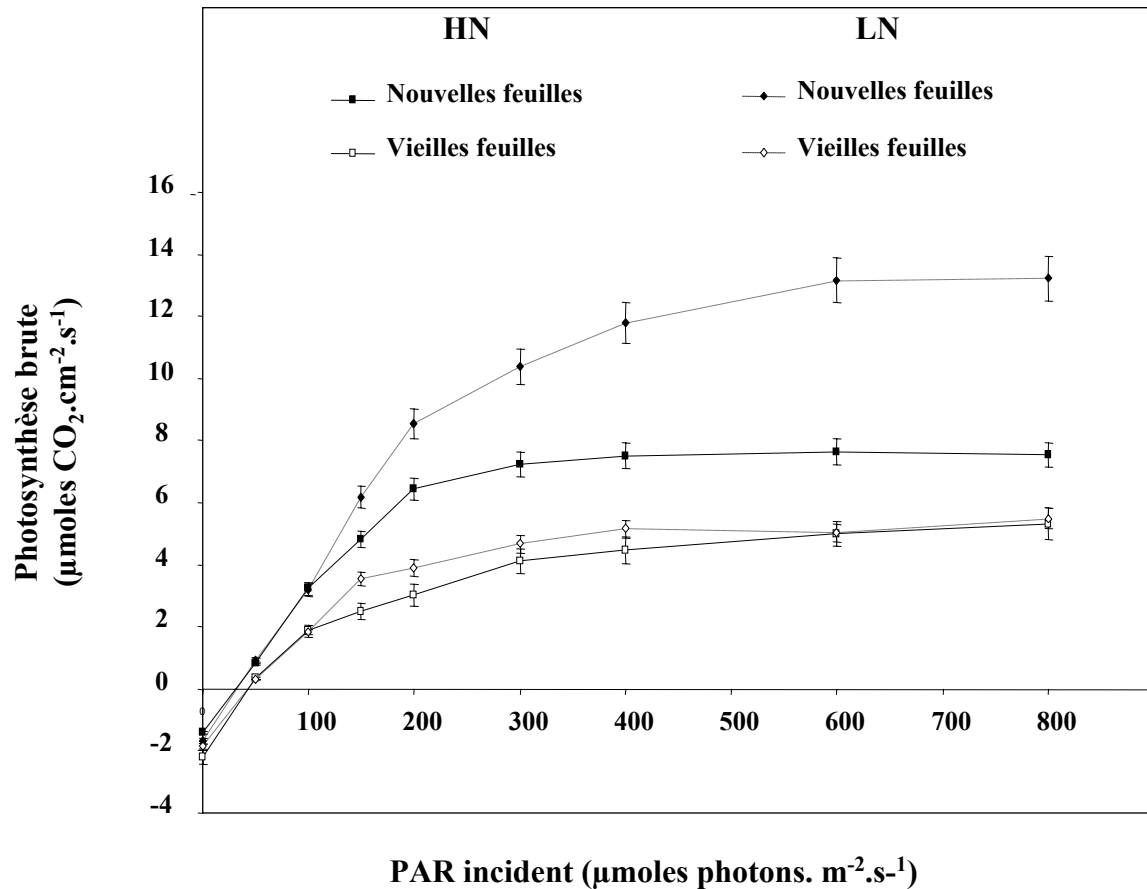


**Annexe A.2** : Schéma expérimental utilisé pour le dosage par IRMS et HPLC des différentes fractions azotées mesurées dans les différents tissus de la luzerne.

## **A.2- Protocole d'extraction et dosages des fractions C-N par IRMS**

Les principales fractions azotées (nitrate, acides aminés, protéines solubles et N insoluble) des différents organes de la luzerne ont été extraites après séparation physico-chimique selon le protocole décrit dans la section C.4.4. du chapitre II, et adapté pour les dosages par IRMS (Annexe A.2). Les fractions C-N ont été extraites en suspendant 200 mg de poudre lyophilisée dans 2 ml de tampon d'extraction (pH 7) contenant 100 mM de sodium-phosphate à 4°C dans des tubes falcon de 14 ml (Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, France). Après centrifugation (3200 x g, 4°C, pendant 10 min), le culot (appelé P1) a été ré-extrait dans 2 ml de tampon d'extraction et les deux surnageants ont été regroupés après une nouvelle centrifugation (3200 x g, 4°C, pendant 10 min). Le surnageant résultant (appelé S1) a ensuite été complété à 4 ml avec le tampon d'extraction et un aliquot de 1 ml a été conservé pour la quantification biochimique des différentes fractions azotées décrite dans la section C.4.5 du chapitre II.

D'une part, l'ensemble des protéines solubles a été précipité à partir de ces 3 ml avec 10 ml d'acétone (à -20°C pendant un temps minimum de 2 heures, puis après centrifugation à 10000 x g pendant 10 min à 4°C). Le culot ainsi obtenu (appelé P2) a été desséché sous vide, resuspendu dans 1 ml d'eau ultra-pure, et des dosages IRMS ont été réalisés après dépôt sur Chromosorb (Chromosorb W, 30 – 60 mesh Acid Washed, Europa Scientific Ltd., UK). Le surnageant (appelé S3) a été évaporé sous vide, resuspendu dans 1 ml d'eau ultra-pure, et conservé à -20°C. D'autre part, le culot P1 a été ré-extrait dans 4 ml d'eau ultra-pure à 60°C pendant 30 minutes de manière à solubiliser les composés solubles à chaud dans l'eau. Après centrifugation (10000 x g, 4°C, 10 min), le surnageant résultant (appelé S3) a été complété à 4 ml avec de l'eau ultra-pure et seulement 3 ml (75%) ont été additionnés au surnageant S2 (qui représente par ailleurs aussi 75% de S1). Ces 4 ml de surnageant (appelé S2S3) contenant l'ensemble des composés solubles de faible masse moléculaire (nitrate et acides aminés) ont ensuite été précipités pendant une nuit à -20°C avec de 10 ml d'éthanol à 95%, et centrifugés à 10000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu (appelé S4), et contenant tout le nitrate et les acides aminés du tissu, a ensuite été desséché sous vide, resuspendu dans 1 ml d'eau ultra pure, et des dosages IRMS ont été réalisés après dépôt sur Chromosorb. Un dosage du nitrate a ensuite été réalisé par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) en utilisant le système DIONEX AI 450 (DIONEX corp., Sunnyvale, CA, USA), et l'azote présent sous la forme d'acides aminés a alors été obtenu par défaut de bilan entre le dosage IRMS du surnageant S4 et



**Annexe A.3 :** Courbes de réponse à l'éclairement de nouvelles feuilles des parties aériennes en croissance et de vieilles feuilles des chaumes au jour de coupe selon deux statuts azotés initiaux contrastés (High N; HN et Low N; LN). Les barres verticales représentent  $\pm$  E.S. de la moyenne pour  $n = 6$ .

le dosage du nitrate par HPLC. Enfin, la fraction azotée représentée par l’N insoluble a été obtenue après que le culot (appelé P3) issu de l’extraction à l’eau ait été desséché sous vide, resolubilisé dans 1 ml d’eau ultra-pure, et que 50 µl aient été déposés sur chromosorb avant passage en IRMS.

### **A.3- Photosynthèse brute**

Une expérimentation complémentaire a été réalisée afin de comparer la capacité photosynthétique des nouvelles feuilles des parties aériennes en croissance et des vieilles feuilles des chaumes, et ce pour des plantes présentant deux statuts N initiaux contrastés. Les courbes de réponse à l’éclairement de ces feuilles au jour de coupe sont présentées en Annexe A.3. Les plantes ont été cultivées avec les mêmes conditions de culture que celles décrites dans l’article C du Chapitre II. Les statuts N initiaux ont été obtenus en précultivant les plantes pendant 21 jours sur des milieux contenant 1.0 (plantes HN) ou 0.2 (plantes LN) mM de KNO<sub>3</sub>. Les mesures ont été réalisées au terme de ces 21 jours (J0) sur plante entière, non coupée.

Quel que soit le type de feuille ou le statut N initial, le point de compensation pour la photosynthèse est d’environ 60 µmoles photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La photosynthèse brute maximale est atteinte pour des éclaircements de 400 µmoles photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> pour l’ensemble des feuilles, à l’exception des nouvelles feuilles des plantes LN où cette valeur est atteinte pour des éclaircements de 600 µmoles photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Quel que soit le statut N initial, la photosynthèse brute des nouvelles feuilles est toujours supérieure à celle des vieilles feuilles. Les nouvelles feuilles des plantes LN ont des photosynthèses brutes supérieures à celles des plantes HN. Avec un éclairciment de 600 µmoles photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, cette photosynthèse est presque doublée pour les plantes LN, comparativement aux plantes HN.

## **B- Valorisation des compétences – Un nouveau chapitre de thèse**

### **Présentation :**

« Le programme « valorisation des compétences – Un nouveau chapitre de thèse » aide les doctorants en fin de thèse à faire un bilan critique de leurs compétences et à les valoriser pour faciliter leur insertion professionnelle. 110 doctorants issus de 72 écoles doctorales ont été retenus pour participer à la campagne 2003. Ils sont encadrés par 24 mentors, consultants spécialistes du recrutement, qui accompagnent et guident cette démarche. La campagne 2003 est conduite par l'Association Bernard Gregory (ABG) pour le compte du Ministère chargé de la Recherche, avec le soutien de la Région Ile-de-France, du CNRS et du CEA. Créée en 1980, l'ABG a pour vocation de promouvoir la formation par la recherche dans le monde socio-économique, et d'aider les jeunes docteurs de toutes disciplines à s'insérer en entreprise. »

Dans le cadre de la campagne 2003, j'ai pu bénéficier de cette formation avec le soutien de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie-Biologie et de l'ABG. A cet effet, et selon les recommandations de l'Ecole Doctorale, un document de synthèse présentant les compétences et savoir-faire que j'ai acquis ou développé au cours de mon projet de recherche est présenté. Ce document a vocation à constituer la première étape de la démarche de recherche d'emploi, et peut s'adresser à un public de non-spécialistes du domaine de recherche.

### **B.1- Objectifs et enjeux de la thèse :**

Mon travail de recherche au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR) est intitulé « Effet de la sévérité de la coupe et du niveau des réserves organiques sur les flux d'azote et de carbone au cours de la repousse chez la luzerne (*Medicago sativa* L.). Modélisation de l'allocation et de la répartition de l'azote lors d'un cycle coupe / repousse ». Ce travail a consisté à étudier l'impact des réserves carbonées et azotées sur la dynamique de repousse de la luzerne et à créer un modèle informatique de fonctionnement afin de mieux comprendre la régulation des mécanismes essentiels à la productivité et la pérennité de cette espèce.



Les enjeux scientifiques, mais aussi agronomiques, de ce travail sont très importants. **En effet, la culture de cette légumineuse fourragère présente de nombreux avantages agronomiques et zootechniques qui en font une culture de choix pour l'alimentation animale. Sa culture représente encore environ 0.5 et 32 millions d'hectares en France et dans le monde. Cependant, on assiste depuis plusieurs années à un recul des surfaces cultivées dû en partie au manque de connaissances sur la dynamique d'utilisation des réserves carbonées et azotées au cours de la repousse après la coupe. En effet, la luzerne est soumise à des cycles successifs de coupes et de repousses au cours de l'année et la reconstruction des parties aériennes récoltées est assurée par la mobilisation de réserves préalablement accumulées dans les organes épargnés par la coupe. Toutefois, les mécanismes physiologiques à la base de cette accumulation et mobilisation restent encore imparfaitement compris et ne permettent pas une gestion optimale de la productivité et de la pérennité de la culture. Mon travail de recherche a alors consisté à étudier et ces différents mécanismes physiologiques et à les intégrer au niveau du fonctionnement de la plante entière. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont ainsi permis de mieux comprendre ces mécanismes et leur modélisation informatique a contribué au développement d'une approche plus dynamique et intégrée de leurs effets sur la repousse. L'ensemble de ces résultats devrait permettre de mieux maîtriser la productivité et la pérennité de la culture de la luzerne.**

## **B.2- cadre de la recherche et choix du projet :**

**L'essentiel de ces travaux de thèse (pour laquelle j'ai par ailleurs bénéficié d'une allocation de recherche cofinancée par l'Institut National de la Recherche Agronomique - INRA et la Région Basse-Normandie) a été réalisé au sein de l'UMR INRA 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie – Nutrition NCS de l'Université de Caen, dirigée par le professeur A. Ourry. Cet établissement, implanté sur le campus 1 de l'université de Caen, est l'un des premiers laboratoires français traitant de la dynamique de l'azote et du carbone chez les plantes fourragères. Il a acquis une grande renommée au niveau national et international. Ceci explique en partie le choix de mon entrée dans ce laboratoire.**

**Les travaux de cette thèse à finalité agronomique s'inscrivent dans le cadre de la thématique T1 du Département Environnement – Agronomie de l'INRA portant sur l'«**

**Ecophysiologie et la conduite des cultures » et traitant plus particulièrement de l' « Etude de la réponse des plantes aux contraintes du milieu, métabolisme et nutrition minérale »** Dans le cadre du projet global du laboratoire, cette thèse constitue par ailleurs un support majeur de recherche **pour une équipe de plusieurs chercheurs (équipe « Carbone-Défoliation ») travaillant sur la thématique « Adaptation des plantes et des couverts prairiaux à la défoliation »**. Le sujet de cette thèse et les objectifs à atteindre m'ont ainsi **fortement motivé au cours de ces trois années**.

**D'autre part, je me suis spécialisé dans les domaines de la physiologie et de la biochimie végétales au cours de mes études universitaires, domaines pour lesquels je suis particulièrement sensibilisé au travers de ma curiosité et de mes activités extra-scolaires. J'ai par exemple été membre de l'ACEN (Association Caennaise des Etudiants Naturalistes) et j'ai ainsi participé à de nombreuses sorties botaniques organisées en Basse-Normandie. L'ensemble de ces éléments a alors particulièrement motivé mon entrée au sein de l'UMR et correspond à mon projet professionnel qui est de faire de la recherche dans le domaine du végétal.**

### **B.3- Gestion et coût du projet :**

#### **B.3.1 Préparation et conduite du projet :**

La stratégie de recherche repose ici essentiellement sur la démarche expérimentale, qui consiste à formuler des hypothèses, puis à les confirmer ou les infirmer par des expériences réalisées au laboratoire. A cet effet, le sujet de recherche a été établi en collaboration avec les différentes équipes de l'UMR, mais aussi avec des chercheurs d'autres laboratoires tels que C. Robin de l'ENSAIA de Nancy et J.M. Allirand de l'EGC Paris-Grignon. Ces chercheurs ont par la suite suivi mes travaux au cours de comités de pilotage annuels. Enfin, ce travail de thèse, du fait de son intérêt pour l'équipe « Défoliation », a fait l'objet de réunions de travail trimestrielles au sein du laboratoire. Un bilan sur l'état d'avancement des travaux et sur les réorientations éventuelles y était réalisé.

Le sujet de cette thèse étant ambitieux sur le plan expérimental, il a nécessité la présence pendant trois mois de deux stagiaires que j'ai encadré et formé. Par ailleurs, une partie de mon travail a consisté à développer un modèle informatique simulant le fonctionnement du végétal sous l'effet de la coupe. J'ai alors initié et entretenu une collaboration étroite avec l'Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères (UEPF) INRA de Lusignan (France), dirigée par F. Gastal. Cette collaboration a nécessité de nombreux déplacements de durées variables (de quelques jours à quelques semaines) au cours desquels j'ai aussi présenté mes résultats à des chercheurs spécialisés dans la génétique de l'amélioration de la luzerne et des chargés de programmes agronomiques tel que le D<sup>r</sup> M. Peoples (Australie).

#### **B.3.2 Evaluation du coût consolidé du projet :**

Le laboratoire, Unité Mixte de Recherche entre l'INRA et l'Université, bénéficie de financements de l'Etat, de la Région Basse-Normandie, ainsi que de contrats industriels.

Pour réaliser cette thèse, j'ai bénéficié d'une allocation de recherche cofinancée par l'INRA et la région Basse-Normandie de 1295 euros brut par mois, soit un total de

46620 euros au terme des trois années de thèse. L'ensemble des dépenses associées au projet est répertorié dans le Tableau 1 et ne concerne pas les salaires des différents chercheurs avec lesquels j'étais en interaction et dont les salaires et la participation à la conduite du projet sont variables et difficilement chiffrables. De même, le coût des différentes analyses tient compte de la maintenance et du fonctionnement des appareils.

Dépenses	(en euros et sur 3 ans)
Allocation de recherche	1295 * 36 = 46620
Analyses spectrométrie de masse	7.67 * 7000 échantillons = 53690
Analyses biochimiques	3.25 * 4000 échantillons = 13000
Cultures de plantes	10 expérimentations * 350 = 3500
Consommables	= 500
Déplacements (collaborations, congrès...)	= 2500
Frais de fonctionnement (photocopies...)	= 1000
Infrastructures	= 2000
<b>Total</b>	= 122810 euros (805580 francs)

Tableau 1 : Evaluation des coûts associés au projet de recherche (Déc 2000 – Déc 2003).

L'analyse des coûts associés à mon projet de recherche montre que celui-ci a coûté environ 123000 euros et que le total des coûts des analyses effectuées au cours de ces trois ans représente plus de 54% de celui-ci. Mon allocation de recherche représente quant à elle plus de 37% de ce total.

#### **B.4-** Compétences développées dans le cadre du projet :

Tout d'abord, ma formation universitaire m'a permis de me spécialiser dans les domaines de la biochimie et de la physiologie végétales. La démarche expérimentale que j'ai été amené à développer au cours de ce projet m'a aussi permis d'acquérir puis de renforcer ces acquis scientifiques théoriques et pratiques, notamment au travers de :

- 1) l'utilisation de la spectrométrie de masse isotopique m'a donné la possibilité de quantifier et tracer le carbone et l'azote dans la plante. Ceci m'a alors

permis d'étudier l'effet de l'accumulation et de la mobilisation de ces réserves lors de la repousse après coupe,

- 2) l'analyse des protéines par électrophorèse mono-dimensionnelle et western-blotting,
- 3) l'analyse des acides aminés et des sucres par chromatographie liquide à haute performance (HPLC),
- 4) l'analyse des ARN par northern-blotting,
- 5) la modélisation informatique sous Model Maker IV du fonctionnement du végétal

L'ensemble de ces acquis a ainsi permis d'élargir mon champ de compétences et d'avoir une vision intégrée et transversale du fonctionnement du végétal à différents niveaux d'organisation (cellule, organe et plante entière).

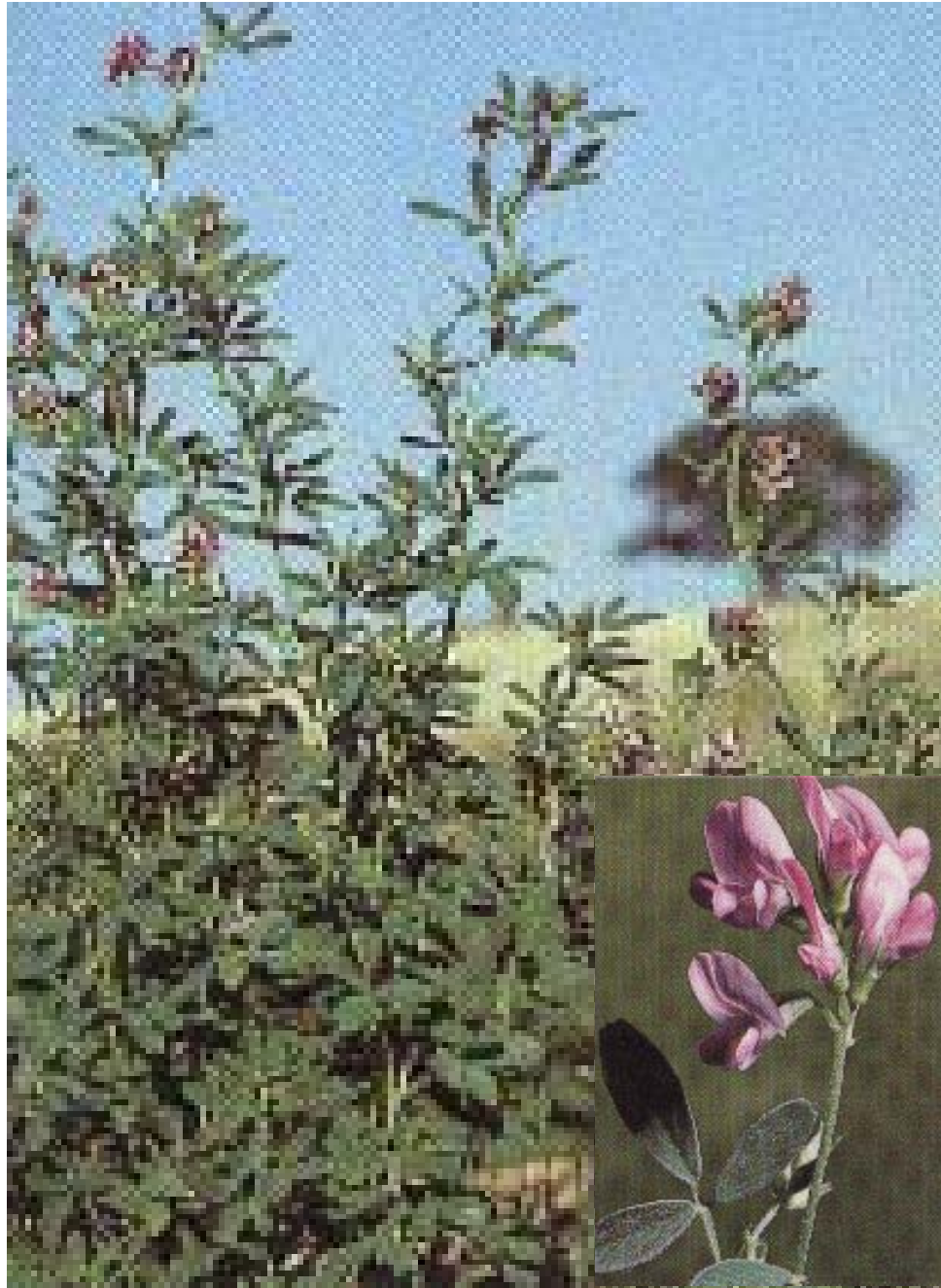
D'autre part, j'ai été souvent amené à présenter mes travaux à des personnes extérieures lors des nombreuses réunions et présentations qui ont eu lieu au cours de ce projet de recherche. Ceci a été fondamental et a développé chez moi le sens de l'animation et de la pédagogie, et m'a aussi permis de prendre du recul par rapport à mon travail et à le replacer dans son contexte. L'encadrement de stagiaires ainsi que les 56 heures de tutorat que j'ai dispensées au cours de cette thèse m'ont aussi permis de renforcer mes qualités relationnelles et pédagogiques. De même, j'ai consacré une bonne partie de mon travail de recherche à la communication sous forme d'articles soumis à des revues internationales telles que *Physiologia Plantarum* et *Plant Science*, et sous forme de posters lors de plusieurs congrès internationaux. L'ensemble de ces éléments a développé en moi le sens de la rigueur et de l'analyse scientifique.

Enfin, j'ai abordé une grande diversité de sujets au cours de mon projet de recherche, réalisé dans un premier temps sur deux plantes très différentes (le ray-grass et la luzerne), et qui a aussi bien concerné la morphogenèse et la dynamique de peuplement, que la répartition et l'allocation du carbone et de l'azote au sein du végétal. J'ai alors renforcé mon sens de la polyvalence et de l'autonomie.

**B.5- Evaluation des résultats de la thèse :**

De par sa nature pluridisciplinaire (biochimie, physiologie et modélisation informatique), ce projet de recherche a contribué à réunir des équipes de travail différentes, notamment au sein du laboratoire, et à développer des collaborations avec des structures externes. Sur le plan scientifique, ce travail a principalement permis de mieux comprendre et intégrer l'effet des réserves carbonées et azotées sur la productivité et la pérennité de cultures de luzerne dont nous avons préalablement pu montrer l'importance tant agronomique qu'économique. L'objectif final constitué par la modélisation a par ailleurs contribué à mieux comprendre le fonctionnement du végétal au cours de la repousse, et de faire un bilan sur les connaissances acquises et manquantes actuelles. De plus, les résultats obtenus ont pu faire l'objet de plusieurs articles publiés (ou soumis) dans des revues internationales d'importance.

En ce qui me concerne, cette expérience a été très enrichissante, non seulement pour toutes les compétences scientifiques et humaines que j'ai pu acquérir ou développer, mais aussi pour l'assurance que j'y ai acquise. Ces différentes compétences sont d'autant plus importantes qu'elles sont le fruit de nombreux mois de travail intense et assidu au sein du laboratoire, et de multiples contacts et entretiens que j'ai pu avoir au cours de ce projet. Mon travail de doctorant fut donc pour moi une expérience professionnelle aboutie, et devrait me permettre de réaliser mon projet professionnel, c'est-à-dire intégrer la recherche publique en qualité de Chargé de Recherches au sein de l'INRA.



*Medicago sativa* L.