



HAL
open science

Absorption racinaire de l'azote minéral chez le chêne sessile (*Quercus petraea*) et la molinie bleue (*Molinia caerulea*) en compétition : caractérisation cinétique et structurale

M. Fernandez

► To cite this version:

M. Fernandez. Absorption racinaire de l'azote minéral chez le chêne sessile (*Quercus petraea*) et la molinie bleue (*Molinia caerulea*) en compétition : caractérisation cinétique et structurale. Sciences de l'environnement. 2015. hal-02602225

HAL Id: hal-02602225

<https://hal.inrae.fr/hal-02602225v1>

Submitted on 16 May 2020

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

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

Master Biologie Environnement
Génomique, Ecophysiologie et Production Végétale

RAPPORT DE STAGE MASTER 1

Soutenu le 2 septembre 2015

Par **Marine Fernandez**

Absorption racinaire de l'azote minéral chez le chêne sessile (*Quercus Petraea* (Matt.) Liebl.) et la molinie bleue (*Molinia caerulea* (L.) Moench) en compétition : caractérisation cinétique et structurale



Membres du jury :

Mélanie Decourteix (MCU) • Aurélie Gousset (MCU) • Patricia Drevet (Pr)



Institut National de la Recherche Agronomique

Centre INRA de Clermont-Ferrand

Unité Mixte de Recherche Physique et Physiologie Intégrée de l'Arbre Fruitier et Forestier

(UMR PIAF, Inra-Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II)

Equipe de recherche : MicroEnvironnement et Arbre (MEA)

Maître de stage : Philippe Malagoli, Maître de Conférences (UBP Clermont-Ferrand II)

Co-encadrant : Philippe Balandier, Directeur de Recherche (IRSTEA Nogent-sur-Vernisson)

INRA Site de Crouël

5, chemin de Beaulieu

63039 Clermont-Ferrand cedex 2

France

Tél : +33 4 73 62 43 73

Fax : + 33 4 73 62 44 54

UBP Campus Universitaire des Cézeaux

8 Avenue Blaise Pascal

63178 Aubière Cedex

France

Tél : +33 4 73 40 79 09

Fax : +33 3 73 40 79 51

Remerciements

Je remercie toute l'équipe du laboratoire PIAF UBP, dirigée par Monsieur Jean-Louis Julien, de m'avoir accueillie pendant 3 mois, plus précisément Lise Pomiès, Jérôme Franchel et Thierry Allario, qui m'ont fait une place dans leur bureau et qui ont répondu à toutes mes interrogations, tant professionnelles que personnelles. Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Christelle Boisselet qui a grandement participé à l'installation très personnalisée de mes plantes en serre et en chambre de culture.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire PIAF INRA qui m'a également souvent accueillie pour les manipulations les plus conséquentes, en particulier Madame Brigitte Saint-Joanis et Monsieur Marc Vandame, sans lesquels je serais probablement encore en train de broyer mes chênes. Et bien entendu un très grand merci à Antoine Vernay, doctorant et futur enseignant chercheur que je souhaite à tout étudiant d'avoir, pour sa capacité à communiquer son enthousiasme malgré les épreuves et pour sa disponibilité.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'unité que j'ai croisé et qui se sont montrés particulièrement attentionnés et chaleureux envers la petite stagiaire de Master 1 que j'ai été. Merci à Monsieur Norbert Frizot pour son aide au niveau informatique et pour sa sympathie.

Enfin, un grand merci à Monsieur Philippe Malagoli, mon maître de stage dont la patience a certainement dû être mise à rude épreuve parfois. Je le remercie pour sa confiance, pour l'autonomie qu'il m'a donnée et qui n'a fait que renforcer ma motivation à continuer dans la recherche. Merci également à Monsieur Philippe Balandier pour sa contribution.

Résumé

L'intensification du prélèvement forestier aboutit à une modification de la disponibilité des ressources (rayonnement, eau et éléments minéraux) dans la parcelle forestière. Cette dernière va réduire la régénération du peuplement en raison de la compétition entre les jeunes arbres et les espèces de sous-bois. La disponibilité en azote minéral du sol et sa captation par les espèces en compétition pourraient constituer un élément important de l'établissement du rapport de dominance entre le chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) et la molinie bleue (*Molinia caerulea* (L.) Moench). L'objectif de cette étude est donc de tester l'hypothèse selon laquelle la captation massive de l'azote du sol par la molinie au détriment du jeune plant de chêne résulterait à la fois d'une meilleure prospection du système racinaire et / ou d'une capacité intrinsèque d'absorption de l'azote minéral du sol supérieure à celle du chêne. Une expérimentation menée en serre a permis de caractériser la croissance et la morphologie des systèmes racinaires du chêne et de la molinie en compétition soumis à deux niveaux de disponibilité en azote minéral du sol. Parallèlement, les cinétiques d'absorption du nitrate et de l'ammonium chez le chêne et chez la molinie en chambre de culture ont été déterminées par l'utilisation du ^{15}N . Il ressort que la molinie a une capacité de prospection du sol plus importante que chez le chêne en raison (i) d'une longueur spécifique supérieure à celle du chêne, (ii) une biomasse plus abondante et (iii) de racines plus fines. D'un point de vue fonctionnel, les capacités d'absorption du nitrate sont plus élevées chez le chêne alors que celles de l'ammonium sont plus fortes chez la molinie. Pour des concentrations faibles de nitrate ou d'ammonium dans la solution nutritive, cette étude met aussi en exergue l'importance de prendre en compte l'équilibre entre les concentrations en nitrate et en ammonium de la solution du sol dans les capacités d'absorption des deux ions chez chaque espèce.

Mots clés : Absorption, compétition, chêne, *Molinia*, ^{15}N , nitrate, ammonium, racine

Intensification of forest intake leads to modification in resource availability (light, water and nutrients) into forest field. This may decrease regeneration ability due to competition exerted by understory species on young trees. Availability of mineral nitrogen as well as its capture by competing species may significantly contribute to establishment of dominance between sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) and purple moor (*Molinia caerulea* (L.) Moench). This study aims at investigating to what extent massive capture by *Molinia* root may be explained by larger root growth and / or higher intrinsic capacity in root uptake compared to oak root. Growth and morphology of root compartment of both intercropped species have been characterized when grown under two levels of soil mineral N availability. Concomitantly, kinetics of root nitrate and ammonium uptake in both species based upon use of ^{15}N have been established under controlled conditions. From a structural viewpoint, results showed a better prospection of root in *Molinia* due to (i) a higher specific root length, (ii) a larger allocation of C resulting in increased root biomass and (iii) thinner root allowing visiting a wider range of soil pore size. From a functional viewpoint, oak roots exhibit larger capacities to take nitrate up whereas roots in *Molinia* show larger capacity to take ammonium up. However, under low concentrations of nitrate or ammonium in external solution, this study also reveals that ratio between nitrate and ammonium concentration on external solution has to be accounted as this may greatly inhibit either nitrate or ammonium uptake. Level of inhibition depends on species.

Key words: Absorption, competition, oak, *Molinia*, ^{15}N , nitrate, ammonium, root

Liste des abréviations

AI	Abondance isotopique
CHATS	Constitutive high affinity transport system
CLATS	Constitutive low affinity transport system
d	Durée de l'incubation exprimée en heure
E	Excès isotopique de l'échantillon
EI	Excès isotopique de la solution nutritive marquée au ^{15}N
IHATS	Inducible high affinity transport system
ILATS	Inducible low affinity transport system
I_{max}	Influx massique maximale
I_n	Influx massique
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L	Light
Long.	Longueur
max	Valeur maximale
min	Valeur minimale
MM	Michaelis-Menten
MS	Masse sèche
MSr	Masse sèche racinaire
N	Nitrogen
Nb	Nombre
ONF	Office National des Forêts
PA	Partie aérienne
PAR	Photosynthetically active radiation
PE	Plante entière
R	Racine
R²	Coefficient de régression
SE	Erreur standard
SLA	Specific leaf area
Sol.	Solution
SRL	Specific root length
TE	Teneur en eau
W	Water

Liste des illustrations

Figure 1 : Volume de bois sur pied des principales essences dans les forêts (privées et publiques) française. (Observatoire Forêt Bois France, 2015).

Figure 2 : Aire de distribution européenne du Chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). (EUFORGEN, 2009).

Figure 3 : Modèle représentant l'effet de l'azote, de l'eau et de la lumière sur l'établissement du chêne (Davis *et al.*, 1999).

Figure 4 : Schéma conceptuel illustrant la manière dont la cinétique d'absorption des nutriments, ainsi que de divers autres facteurs, peuvent influencer la disponibilité et l'absorption des nutriments en réponse à la concentration élevée de CO₂, l'augmentation de la température du sol et des dépôts d'azote atmosphérique. (BassiriRad, 2000).

Figure 5 : Vitesse d'éluion du ¹³N [log (cpm libéré).g⁻¹.min⁻¹] en fonction du temps d'éluion chez des racines intactes d'épinette blanche (*Picea glauca* [Moench] Voss.) placées dans une concentration de 100 µM de [NO₃⁻] (A) ou de [NH₄⁺] (B) (Kronzucker *et al.*, 1995a et 1995b).

Figure 6 : Influx massique (µmol.g⁻¹(MSr).h⁻¹) de nitrate NO₃⁻ (A) et d'ammonium NH₄⁺ (B) en fonction de la concentration (mM) de l'ion azoté chez l'épinette blanche (*Picea glauca* [Moench] Voss.) (Kronzucker *et al.*, 1995c et 1996).

Figure 7 : Succession des étapes et dispositif expérimental mis en place pendant et après le marquage.

Figure 8 : Influx massique et de K¹⁵NO₃⁻ (A et B) et de ¹⁵(NH₄)₂SO₄⁺ (C et D) dans les racines de chêne et de molinie.

Tableau 1 : Composition nutritive de la solution hydroponique des chênes et des molinies.

Tableau 2 : Quantité de solution hydroponique non marquée dans laquelle ont été acclimatés les différents lots de 6 plantes et nombre de plantes par b cher de 1L lors des manipulations de marquage au ¹⁵KNO₃⁻ et au ¹⁵(NH₄)₂SO₄⁺, chez le chêne et chez la molinie.

Tableau 3 : Diamètre, surface, masse, longueur et longueur racinaire spécifique d'un lot de dix chênes et dix molinies cultivés en pot ayant reçu (+N) ou non un apport d'azote de 90 kg.ha⁻¹

Tableau 4 : Masse sèche (MS) des parties aériennes (PA), des racines (R), du rapport parties aériennes sur racines (PA/R) et de la plante entière (PE), et teneur en eau ($TE = \frac{PF-PS}{PF}$) des parties aériennes, des racines et de la plante entière, en fonction de la concentration en nitrate ou en ammonium, chez le chêne (n=6). SRL et longueur racinaire (Long. R) (n=5).

Tableau 5 : Masse sèche (MS) des parties aériennes (PA), des racines (R), du rapport parties aériennes par racines (PA/R) et de la plante entière (PE), et teneur en eau ($TE = \frac{PF-PS}{PF}$) des parties aériennes, des racines et de la plante entière, en fonction de la concentration en nitrate ([KNO₃⁻]) ou en ammonium ([NH₄)₂SO₄⁺]), chez la molinie.

Tableau 6 : I_{max} et K_m définie selon l'équation de Michaelis-Menten pour le système HATS (concentration < 500 µM) et coefficient a et b des droites cinétiques du système LATS (concentration > 500 µM).

Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des illustrations

Introduction	1
A. La structure d'accueil	1
B. Contexte général	1
C. Contexte scientifique	1
1. L'accès aux ressources entre le jeune arbre et les espèces de sous-bois	2
1.1. Impact des prélèvements forestiers sur la disponibilité des ressources	2
1.2. Compétition pour l'azote entre les ligneux et les herbacées	3
2. Mécanismes d'absorption de l'azote minéral chez les végétaux	4
2.1. Compartimentation du nitrate et de l'ammonium dans les racines	4
2.2. Systèmes de transport impliqués dans l'influx du nitrate et de l'ammonium	4
D. Problématique du stage	5
Matériels et méthodes	6
1. Expérimentations en serre	6
2. Expérimentations en chambre de culture	7
2.1. Chênes sessiles (<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.)	7
2.2. Molinies bleues (<i>Molinia caerulea</i> (L.) Moench)	7
3. Mesure d'influx de NO₃⁻ et NH₄⁺	7
4. Récoltes des plants en pots et des plants en chambre de culture	8
4.1. Récolte des chênes et molinies placés en pots	8
4.2. Récolte des chênes et molinies placés en chambre de culture	8
5. Broyage et dosage ¹⁴N/¹⁵N	8
6. Analyse morphologique des systèmes racinaires	8
7. Calculs et analyses statistiques	9
7.1. Calcul de la quantité d'azote total et de ¹⁵ N dans la plante	9
7.2. Calcul de l'influx de ¹⁵ N et cinétique de Michaelis-Menten	9
7.3. Analyses statistiques	9
Résultats et discussion	10
1. Expérimentation en serre : caractérisation des systèmes racinaires de chêne et de molinie placés en compétition avec ou sans apport d'azote	10
2. Expérimentation en chambre de culture : cinétique d'absorption racinaire du nitrate et de l'ammonium	11
2.1. Caractérisation du matériel végétal utilisé : biomasse sèche et teneur en eau	11
2.2. Cinétiques de l'absorption racinaires du nitrate et de l'ammonium	12
2.2.1. Courbes de réponse de l'influx de NO ₃ ⁻	12
2.2.2. Courbes de réponse de l'influx de NO ₄ ⁺	13
Conclusion et perspectives	14

Réflexions personnelles	15
--------------------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

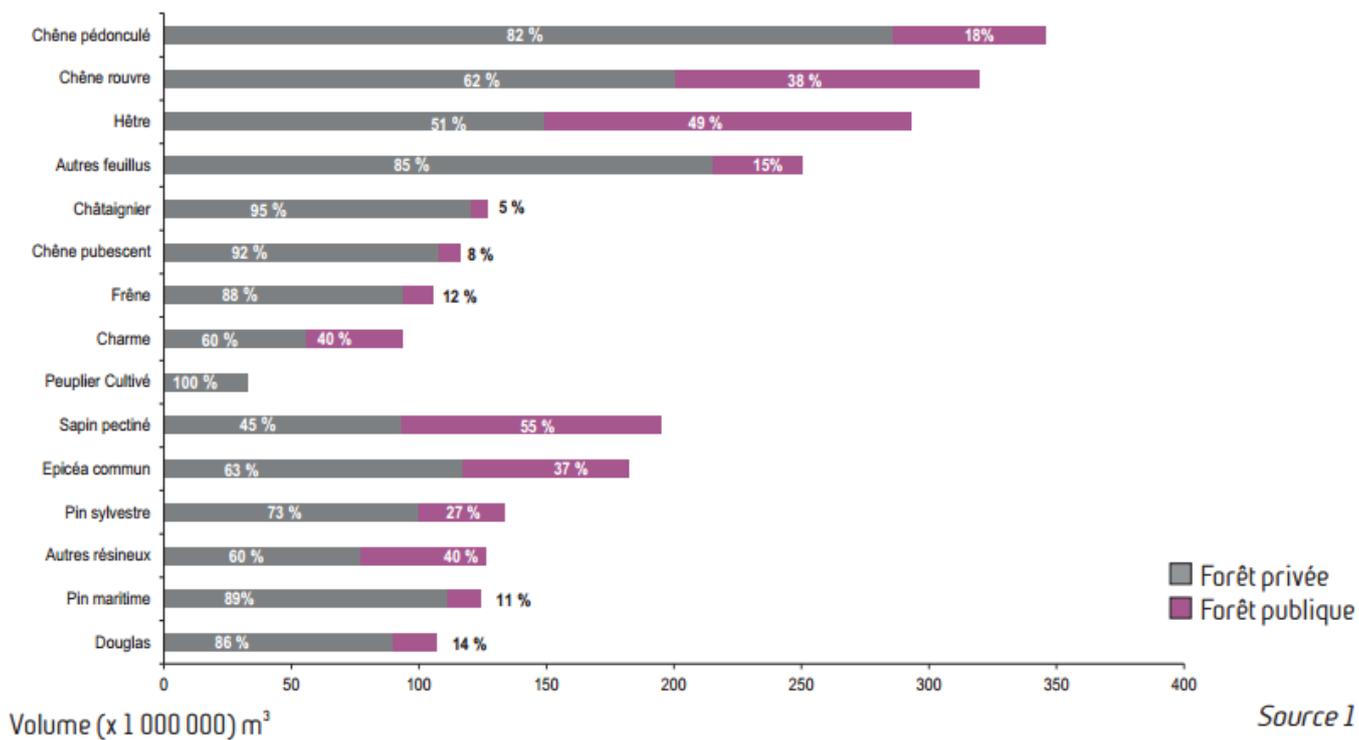


Figure 1 : Volume de bois sur pied des principales essences dans les forêts (privées et publiques) française. D'après l'observatoire Forêt Bois France (2015).

Introduction

A. La structure d'accueil

L'Unité Mixte de Recherche « Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier » 547 résulte de l'association de deux établissements : l'Université Blaise Pascal-Clermont II et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). L'INRA est un organisme de recherche scientifique publique finalisée. Placé sous la double tutelle du ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche et du ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, il constitue par sa taille (8000 personnes) le premier institut de recherche agronomique en Europe et le troisième EPST (établissement public à caractère scientifique et technologique) en France, après le CNRS et l'INSERM. Les missions de l'INRA sont de fournir des connaissances par la recherche et de les valoriser afin de tendre vers une agriculture à la fois durable, économiquement compétitive et capable de produire une alimentation saine et équilibrée. Rattachée aux départements EA (Environnement – Agronomie) et EFPA (Ecosystèmes Forestiers, Prairiaux et Aquatiques) de l'INRA, les recherches menées au sein de l'UMR PIAF visent à mieux comprendre le fonctionnement de l'arbre soumis à des contraintes biotiques et abiotiques en tenant compte des aspects fonctionnels et architecturaux tout au long du cycle annuel des espèces étudiées (Noyer, Pommier, Peuplier, Hévée, Chêne). Les niveaux d'études s'échelonnent de la molécule au couvert végétal en passant par la cellule et l'organe. L'unité est composée de quatre équipes distinctes : MEA (Micro Environnement et Arbres), HYDRO (Hydraulique et résistance à la sécheresse des arbres) et MECA (Contraintes Mécaniques et activité des zones en croissances). J'ai été accueillie par l'équipe MEA qui focalise plus précisément ses recherches sur l'écophysiologie de l'arbre en caractérisant les interactions entre le couvert végétal et sa structure ainsi que la conduite de l'arbre et l'environnement microclimatique, en particulier dans le cadre de la vulnérabilité des plantes aux bio-agresseurs, gel, phénologie hiverno-printanière, et aux contraintes multiples et récurrentes telles que les risques liés au changement climatique.

B. Contexte général

Avec un chiffre d'affaire d'environ 60 milliards d'euros par an et 440 000 emplois (organisme France Bois Forêt, Les chiffres clés de la forêt privée édition 2015), la filière bois française a un poids économique considérable. La France est rapidement devenue le premier pays producteur de chênes en Europe et le deuxième dans le monde, après les États-Unis (Forêt Privée Française – la sylviculture du chêne). Cet arbre représente 47 % du volume de bois sur pied feuillu en forêt privée. Les chênes pédonculés et sessile (rouvre) sont les deux essences prédominantes en forêt française (**Figure 1**) et font l'objet d'une exploitation accrue depuis quelques années.

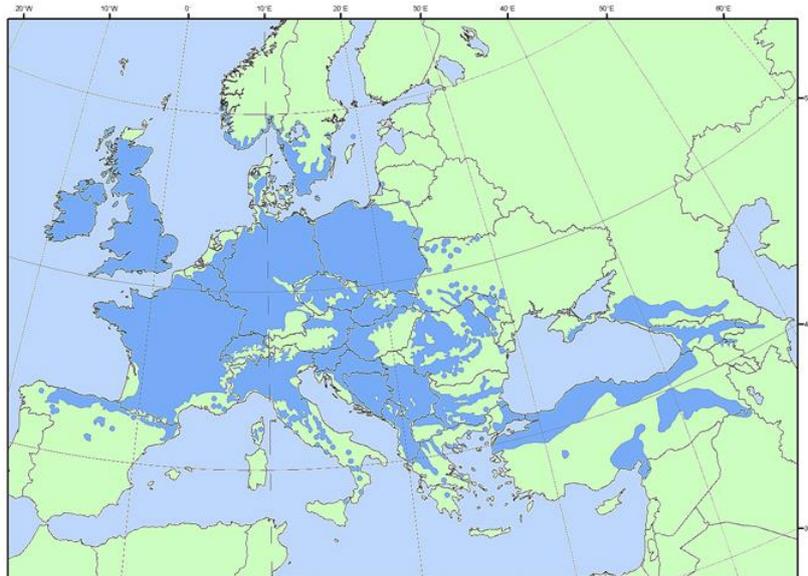


Figure 2 : Aire de distribution européenne du Chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). D'après EUFORGEN (2009).

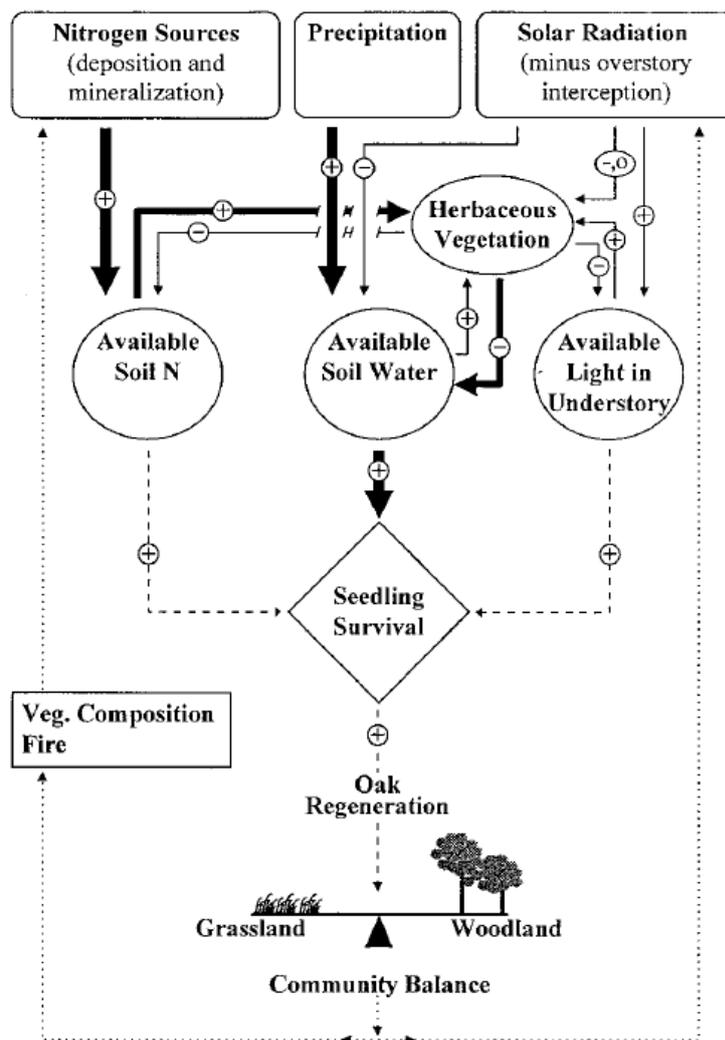


Figure 3 : Modèle représentant l'effet de l'azote, de l'eau et de la lumière sur l'établissement du chêne (Davis *et al.*, 1999).

Ainsi, l'accroissement du prélèvement en bois dans les chênaies peut s'expliquer par plusieurs raisons : (i) qualité du bois récolté (à forte valeur unitaire économique) et volume sur pied disponible, (ii) utilisation de la biomasse comme alternative intéressante à « l'après-pétrole » pour lesquelles les chênaies pourraient être un fournisseur non négligeable et (iii) les changements climatiques. Dans le dernier cas évoqué, l'intensification du prélèvement des arbres permettrait de réduire la demande en eau pendant les périodes critiques et ainsi de limiter les effets néfastes sur la croissance et le développement des individus restants. Cependant, ce recours à un retour plus fréquent sur les chênaies doit s'inscrire dans une gestion durable et donc modifiée des pratiques forestières afin de préserver, à long terme, le potentiel économique et environnemental des chênaies (Kuster *et al.*, 2013). En effet, dans le cadre de la limitation de l'émission des gaz à effet de serre, ces dernières sont capables de fixer près de 65 millions de tonnes par an équivalent CO₂, représentant plus de 10% des émissions nationales (ONF – La France face au défi du changement climatique). En outre, les chênaies continentales contribuent à la protection des milieux et des paysages mais aussi au maintien d'une importante biodiversité. Le chêne sessile, largement étendu en Europe (**Figure 2**) est l'une des espèces emblématiques de la forêt française.

C. Contexte scientifique

1. L'accès aux ressources entre le jeune arbre et les espèces de sous-bois

1.1. Impact des prélèvements forestiers sur la disponibilité des ressources

De façon générale, la quantité de rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) disponible au sein d'un couvert végétal fermé est considérée comme le principal facteur limitant pénalisant la croissance et le développement des jeunes arbres et des espèces de sous-bois (Gammel *et al.*, 1996). L'intensification du prélèvement des arbres forestiers entraîne la formation d'une trouée dans laquelle le PAR incident n'est plus limitant pour les deux types de végétaux. Le poids relatif de la disponibilité des ressources du sol (eau et nutriments) dans la compétition pour l'accès à ces dernières entre les jeunes ligneux et les poacées augmente alors. Ainsi, il a été clairement mis en évidence qu'une contrainte hydrique apparaissait dans les sites ouverts au point de réduire la croissance voire la survie lors de la phase de régénération (Kozlowski et Davies, 1975 ; Coll *et al.*, 2003). Cette contrainte résulte à la fois (i) d'un bilan énergétique augmentant l'évaporation en lien avec un PAR incident plus important, (ii) et d'un système racinaire se développant plus rapidement, en plus grande quantité et de façon plus superficielle chez les poacées que chez les jeunes arbres (Coll *et al.*, 2004). Un effet indirect induit par la variation de la disponibilité en eau dans le sol est la chute de la disponibilité en azote minéral (Löf et Welander, 2004 ; Barber, 1962) due à une production (minéralisation de l'azote organique) amoindrie (Löf, 2000 ; Rennenberg *et al.*, 2009) et à une mobilité réduite (chute du flux de masse du nitrate NO₃⁻). Davis et al (1999) ont élaboré un modèle décrivant comment l'azote, l'eau et la PAR affectent la régénération du chêne sous les climats tempérés (**Figure 3**).

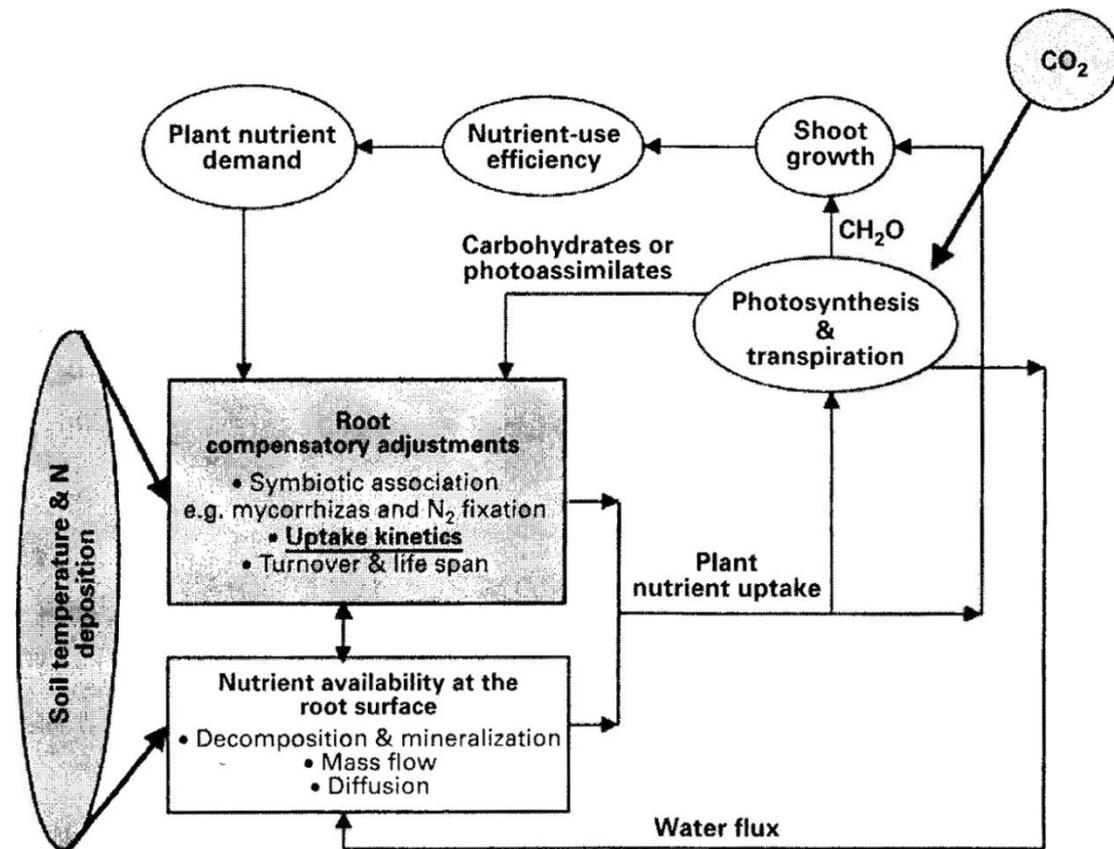


Figure 4 : Schéma conceptuel illustrant la manière dont la cinétique d'absorption des nutriments, ainsi que de divers autres facteurs, peuvent influencer la disponibilité et l'absorption des nutriments en réponse à la concentration élevée de CO₂, l'augmentation de la température du sol et des dépôts d'azote atmosphérique. Le diagramme montre également que des changements concernant d'autres caractéristiques racinaires telles que la croissance, la morphologie, l'architecture, la durée de vie et l'association mycorhizienne, pourraient contrebalancer et/ou éviter les ajustements de la cinétique qui serait autrement être obtenue (BassiriRad, 2000).

Par ailleurs, si les écosystèmes forestiers contiennent des quantités importantes d'azote, dont près de 90% sont sous forme organique séquestrée dans la biomasse végétale ou animale, la litière ou le sol, il est à noter que l'arbre n'utilise que l'azote inorganique (nitrate NO_3^- et ammonium NH_4^+) qui représente moins de 1% et dont la concentration est comprise entre 10 et 100 μM . De plus, les augmentations en température, en CO_2 et en dépôts d'azote atmosphérique (Berger et Glatzel, 1994) affectent la cinétique d'absorption de nitrate et d'ammonium (Zerihun et BassiriRad, 2001) et altèrent la physiologie des végétaux (**Figure 4**) ainsi que les processus de régénération des ligneux dans les écosystèmes forestiers.

1.2. Compétition pour l'azote entre les ligneux et les herbacées

Au stade adulte, le caractère pérenne des plantes ligneuses impose une gestion saisonnière de l'azote variable au cours de la vie de la plante. Les espèces ligneuses forestières sont le plus souvent cultivées avec un stock d'azote limitant et constant ce qui suppose des mécanismes permettant un recyclage efficace de cet élément tout au long du cycle de développement : depuis la phase de remobilisation et d'absorption à partir du débourrement jusqu'à la pleine feuillaison, puis le stockage de l'azote foliaire vers organes puits à l'automne. Par ailleurs, l'allélopathie négative pour l'azote est très fréquente entre les ligneux (gymnospermes et angiospermes) eux-mêmes. Malgré la stratégie de recyclage de l'azote et la résistance aux conditions de sécheresse modérée, le chêne sessile est fortement concurrencé par les systèmes racinaires de l'érable dans le cas où le dépôt en azote augmente significativement, comme c'est le cas depuis les dernières années (BassiriRad *et al.*, 2015). De même, les racines fines du hêtre colonisent les zones riches en azote dans les horizons organiques de la forêt de façon plus optimales que celles du chêne. Cette compétition asymétrique interspécifique en faveur du hêtre est également due à une biomasse racinaire supérieure (Leuschner *et al.*, 2001). Ces éléments mettent en évidence l'importance des caractéristiques racinaires tant au niveau de l'architecture que des capacités d'absorption de l'azote minéral du sol. Ceci est d'autant plus important dans le cas de l'acquisition de l'azote minéral du sol quand plusieurs espèces sont en compétition pour l'accès aux ressources. Au stade jeune plante, les travaux menés au PIAF ont mis en évidence une modification rapide et précoce du fonctionnement du jeune chêne. L'ouverture du couvert entraîne une réduction significative de la photosynthèse chez le chêne tandis que chez la poacée (molinie bleue), une augmentation a été observée. Il s'avère que l'azote du sol est plus largement capté par la molinie, en raison d'un système racinaire plus prospectif. L'ouverture du couvert va accentuer l'avantage de compétition pour l'acquisition de cette ressource en raison d'une demande azotée plus importante par les parties aériennes chez la molinie. Dans ce cas, l'azote est massivement alloué vers les PA pour assurer la mise en place des feuilles afin d'optimiser la photosynthèse et, *in fine*, la croissance et l'allocation de masse sèche vers les racines pour une prospection améliorée chez la poacée. Il va alors y avoir une interaction directe entre la nutrition azotée et carbonée (Agren et Ingestad, 1987)

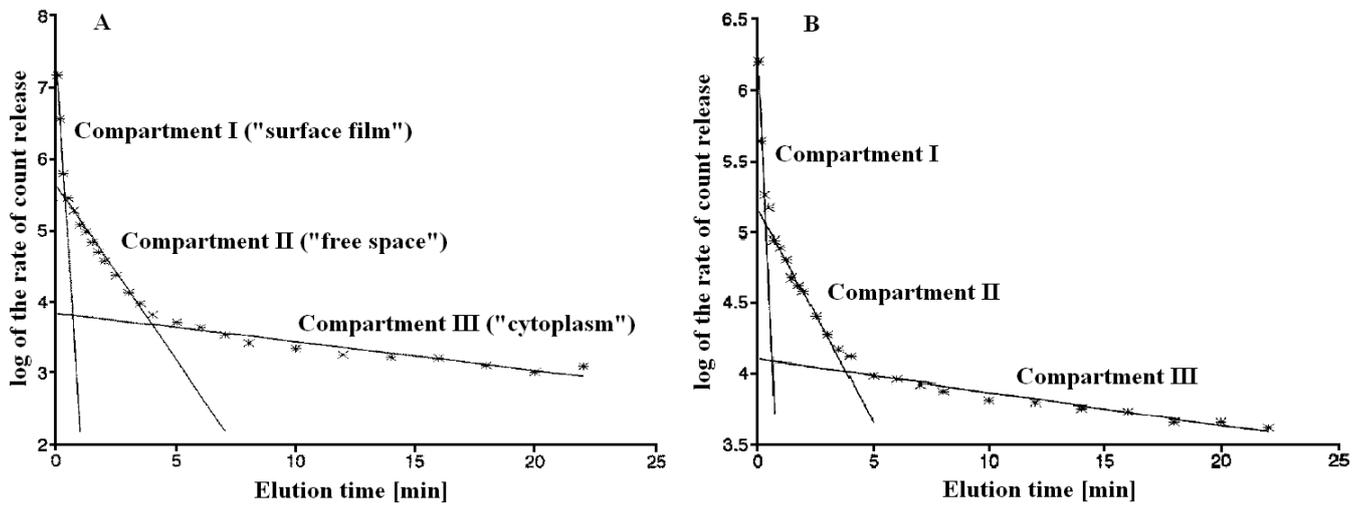


Figure 5 : Vitesse d'élution du ^{13}N [$\log(\text{cpm libéré}) \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] en fonction du temps d'élution chez des racines intactes d'épinette blanche (*Picea glauca* [Moench] Voss.) placées dans une concentration de $100 \mu\text{M}$ de $[\text{NO}_3^-]$ (A) ou de $[\text{NH}_4^+]$ (B). Les racines ont été préalablement exposées à du $100 \mu\text{M}$ de $^{13}\text{N}\text{-NO}_3^-$ ou de $^{13}\text{N}\text{-NH}_4^+$ pendant une heure avant d'être transférées dans une solution non marquée. Les quantités de ^{13}N mesurées dans la solution non marquée permettent de suivre l'élution du ^{13}N à partir des 3 compartiments : la surface racinaire, l'espace libre et le cytoplasme. (Kronzucker *et al.*, 1995a et 1995b).

Dans un milieu où des espèces à la morphologie et à la physiologie différentes cohabitent et où certains nutriments deviennent rapidement limitants, il est d'autant plus nécessaire de comprendre les mécanismes d'absorption azotée afin de permettre la régénération d'espèces rentables et écologiquement intéressantes.

2. Mécanismes d'absorption de l'azote minéral chez les végétaux

Pour la plupart des espèces végétales, la machinerie cellulaire (photosynthèse, respiration, orientation du flux de carbone...) et plus spécifiquement la synthèse protéique dépendent en grande partie du prélèvement de l'azote minéral du sol. L'absorption de cet élément minéral est rendu possible par la fourniture en azote par la rhizosphère, par l'activité des systèmes de transport racinaire et par les symbioses bactériennes et mycorhiziennes (Harley et Smith, 1983). En effet, les bactéries et les champignons vont transformer l'azote organique en ammonium (NH_4^+). Celui-ci va être oxydé en nitrates (NO_3^-) par des bactéries chimiotrophes utilisant le CO_2 comme source de carbone, ou par des bactéries hétérotrophes se servant de la matière organique comme source de carbone et d'azote (De Boer et Kowalchuk, 2001). Les espèces à feuilles caduques tendent à faciliter la nitrification (Son et Lee, 1997). Ce sont principalement les racines fines (< 2 mm) très abondantes dans la litière, qui vont assurer l'activité d'absorption. Elles forment un chevelu racinaire qui correspond à 90% de la longueur de l'arbre et à 10% de sa masse totale (Leuschner *et al.*, 2001).

2.1. Compartimentation du nitrate et de l'ammonium dans les racines

L'azote absorbé par la plante correspond aux particules azotées exogènes ayant traversées le plasmalemme racinaire via des transporteurs spécifiques et se trouvant alors dans le cytoplasme des cellules. Le mouvement de ces molécules chargées est influencé par des différences de potentiels électriques de part et d'autres de la membrane. Le passage à l'intérieur de la cellule nécessite de transiter à la fois en surface de la racine puis dans la paroi cellulaire. Cette compartimentation a été mise en évidence par des mesures d'efflux (flux orienté de l'intérieur vers l'extérieur d'un compartiment) de nitrate et d'ammonium en fonction du temps (**Figure 5**). Trois compartiments aux cinétiques distinctes ont donc été identifiés, représentant l'adsorption de surface, l'espace libre de la paroi cellulaire et le cytoplasme. Seul l'azote ayant pénétré le cytoplasme est considéré comme absorbé par la plante, le reste correspond à de l'adsorption.

2.2. Systèmes de transport impliqués dans l'influx de nitrate et de l'ammonium

L'entrée de l'azote dans la plante est un processus hautement régulé. Des approches physiologiques ont permis de caractériser différents types de transport membranaire pour le nitrate et l'ammonium. Deux grandes catégories de systèmes de transport subdivisés en différentes familles multigéniques forment un réseau organisé entre tous les organes de la plante (Nacry et al, 2013).

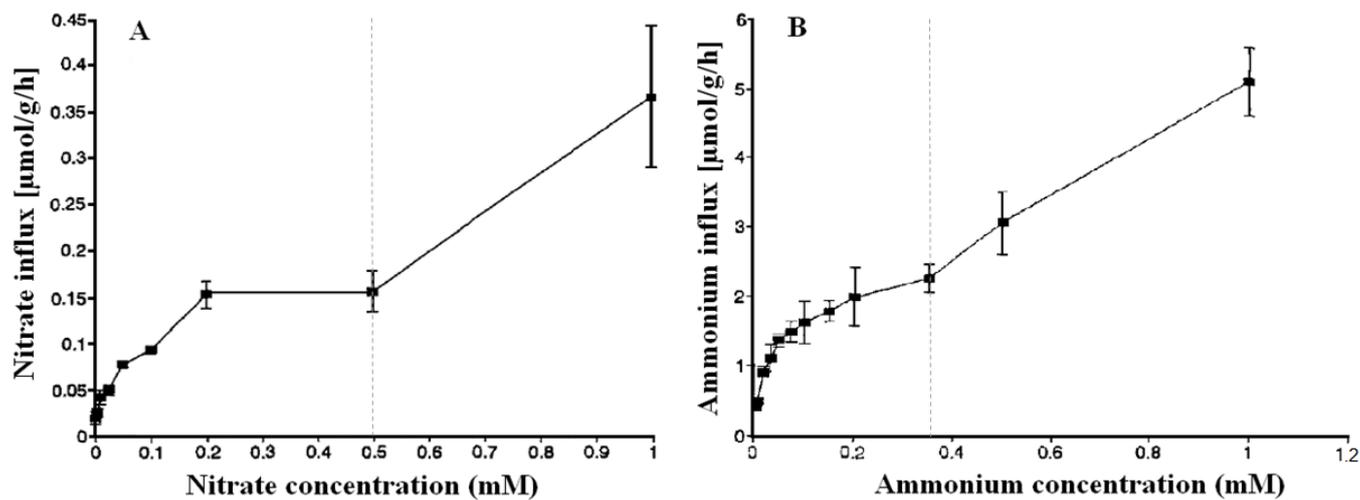


Figure 6 : Influx massique ($\mu\text{mol.g}^{-1}(\text{MSr}).\text{h}^{-1}$) de nitrate NO_3^- (A) et d'ammonium NH_4^+ (B) en fonction de la concentration (mM) de l'ion azoté chez l'épinette blanche (*Picea glauca* [Moench] Voss.). Les données sont les moyennes $\pm\text{SE}$. La courbe a une allure biphasique représentative du fonctionnement des systèmes de transport HATS et LATS, séparés par le trait pointillé sur les graphiques. (Kronzucker *et al.*, 1995c et 1996).

Elles ont été mises en évidence par des mesures d'influx unidirectionnel à travers la membrane plasmique et par leur affinité spécifique avec leur substrat respectif. L'influx correspond à la vitesse d'absorption de l'ion par les racines en fonction de sa concentration dans le milieu extérieur. Généralement rapporté à la masse sèche des racines, il peut aussi l'être à la longueur spécifique racinaire (SRL en cm.g^{-1}), révélatrice de la vitesse de prolifération du système racinaire (Eissenstat, 1991). Les caractérisations cinétiques ont permis d'établir que l'influx suivait une allure biphasique (**Figure 6**) formée par les deux systèmes. D'une part un système de transport à forte affinité (HATS) et faible capacité (Wang *et al.*, 1994), présentant une cinétique de type Michaelis-Menten, saturable à partir de concentrations en ions azotés atteignant 200 à 500 μM selon les espèces (Doddema et Telkamp, 1979) et pouvant être caractérisée par deux paramètres, la constante apparente d'affinité (K_M) et l'influx maximal (I_M). Le caractère constitutif (CHATS) est majoritaire mais il est également inductible (IHATS) par son substrat après une phase de latence de quelques dizaines de minutes à quelques heures (Mäck et Tischner, 1994). Ce système à forte affinité D'autre part, un système de transport à faible affinité (LATS) et forte capacité. Il forme la composante linéaire du transport des ions azotés. Il ne fonctionne que lorsque son substrat est présent dans le milieu à une concentration relativement élevée et contrairement au HATS, il n'est pas saturable. Longtemps considéré comme étant exprimé de façon constitutive (CLATS) (Siddiqi *et al.*, 1990 ; Glass et Siddiqi, 1995), des études moléculaires plus récentes ont confirmées l'existence d'un système LATS inductible (ILATS) (Faure-Rabasse *et al.*, 2002). Le contrôle des transporteurs responsable de cet influx est sous dépendance d'acteurs moléculaires d'origine diverses (phytohormones, ions azotés endogènes, acides aminés, acides organiques, sucres) et de facteurs environnementaux (température). L'absorption et l'assimilation de l'azote varient au cours de la journée mais également au cours de la vie de la plante, notamment lors de la transition entre la phase végétative et la phase reproductrice ou au moment de la frondaison.

Les racines sont donc l'organe moteur de l'absorption de l'azote chez les plantes. Par des régulations du système architectural et de l'activité des transporteurs, elles ont la capacité de répondre à la disponibilité en nutriments exogènes et permettent le maintien de l'homéostasie de ces éléments nutritifs au niveau endogène (Aibara et Miwa, 2014).

D. Problématique du stage

L'intensification du prélèvement forestier dans les chênaies va aboutir à une modification du microclimat y régnant (températures, rayonnement, humidité). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une réponse rapide du fonctionnement de jeunes plants de chêne sessile, photosynthèse notamment, lors de sa mise en compétition avec des espèces herbacées telles que la molinie bleue. En effet, cette espèce a été décrite comme l'un des végétaux les plus nuisibles à la croissance des jeunes chêne à cause de sa compétitivité pour l'eau, la lumière et les nutriments (Davies, 1987 ; Frochot *et al.*, 1986).

Son fort potentiel allélopathique (Becker, 1984 a et b ; Becker et Levy, 1983) est également à l'origine d'une altération du système mycorhizien chez le chêne adulte (Timbal *et al.*, 1990). Cette capacité à capter intensément les ressources du milieu est due à son système racinaire plus développé et plus véloce pour explorer le sol. Cependant, dans les horizons du sol prospectés par les racines des deux espèces, l'avantage de captation de l'azote minéral du sol au profit de la molinie pourrait aussi s'expliquer par une activité potentielle des systèmes du transport azotés plus élevée que celle dans les racines de plants de chêne en phase de régénération. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le chêne ait une plus faible capacité d'absorption que les autres ligneux des écosystèmes forestiers (Lajtha, 1994). Au regard de la bibliographie, leur potentiel de croissance en sera limité et leur survie sur le long terme pourra en être affectée. Ainsi, l'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en s'intéressant à (i) l'architecture racinaire (croissance) du chêne sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) et de la molinie bleue (*Molinia caerulea* (L.) Moench) et (ii) à la cinétique d'absorption de ces derniers par des mesures d'influx via l'utilisation de ^{15}N à différentes concentrations de NO_3^- ou de NH_4^+ .

Matériels et méthodes

1. Expérimentations en serre

L'objectif de cette expérimentation est de caractériser la croissance et la morphologie des systèmes racinaires du chêne et de la molinie, et ce pour deux niveaux de disponibilité en azote minérale du sol. Dans le cadre de la thèse d'Antoine Vernay, (sujet de thèse : « Rôle des interactions azote eau du sol dans les rapports de compétition entre plantes »), des plants de chêne et de molinie, cultivés dans un même pot depuis novembre 2014 (**Annexe 1**), ont été soumis dès le mois de mars 2015 à la variation de trois facteurs : la lumière (L+/L-), l'eau (W+/W-) et l'azote minéral (N+/N-). Pour mon étude, nous n'avons retenu que les traitements pour lesquels la lumière et l'eau n'étaient pas limitants (L+/W+). En revanche, le facteur N (N+ et N-) a été pris en compte. Au total, 10 pots ont été utilisés : 5 pots (L+/W+/N+) et 5 pots (L+/W+/N-). Des mesures ont permis d'établir que la teneur initiale en nitrate NO_3^- était de 129,6 kg/ha et celle en ammonium NH_4 de 5,3 kg/ha. Le 25 mars, le 16 avril et le 27 mai 2015, 0,5L de solution contenant du nitrate et de l'ammonium à une concentration de 20 mM à été déversée dans cinq pots, soit la moitié. Ceci représente un apport total de 90 kg d'azote par hectare et par pot.

Tableau 1 : Composition nutritive de la solution hydroponique des chênes et des molinies.

Elément	Molarité solution finale (mM)
Macroéléments	
K ⁺	4
Mg ²⁺	0,55
Ca ²⁺	0,73
NH ₄ ⁺	0,1
Na ⁺	0,09
Cl ⁻	2
PO ₄ ⁻	1,38
SO ₄ ⁻	1
NO ₃ ⁻	
Microéléments	
Zn ²⁺	3,06 x 10 ⁻³
Mn ²⁺	3,61 x 10 ⁻³
B	9,06 x 10 ⁻³
Cu ²⁺	1,23 x 10 ⁻³
Mo ³⁺	0,51 x 10 ⁻³
Fe ²⁺	0,0002%

Tableau 2 : Quantité de solution hydroponique non marquée dans laquelle ont été acclimatés les différents lots de 6 plantes et nombre de plantes par béccher de 1L lors des manipulations de marquage au ¹⁵KNO₃⁻ et au ¹⁵(NH₄)₂SO₄⁺, chez le chêne (2 premières lignes) et chez la molinie (2 dernières lignes). Les expériences de marquage sur le chêne qui ont été répétées une seconde fois pour certaines concentrations sont indiquées par les astérisques (* : répétitions uniquement pour un marquage au ¹⁵KNO₃⁻, ** : répétitions pour un marquage au ¹⁵KNO₃⁻ et au ¹⁵(NH₄)₂SO₄⁺). Pour la concentration 500 µM chez le chêne (italique), les marquages ont eu lieu lors de cette deuxième série.

Concentration (µM)	1	2	5	10	25	75	100	250	500	750	1000	3500	7500
Quantité de sol. d'acclimatation (L)	5	5	5	3	1	1	1	1	<i>1</i>		1	1	
Nb chêne/béccher	2	2	2	2*	2**	2*	2**	2**	2		6	6	
Quantité de sol. d'acclimatation (L)				5	5	3	1	1	1	1	1	1	1
Nb molinie/béccher				3	3	3	3	3	3	3	6	6	6

2. Expérimentations en chambre de culture

2.1. Chênes sessiles (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)

Plusieurs lots de glands de chêne sessiles en provenance de la sécherie de La Joux (ONF) ont été mis à germer en serre courant mars. Après 7 à 10 semaines (en raison de l'hétérogénéité de la germination des glands), les jeunes plants de chêne ont été transférés sur une solution nutritive (**Tableau 1**) en conditions hydroponiques. Un lot de jeunes chênes de 17 semaines a été utilisé ultérieurement pour répéter des mesures d'influx. Ces plantes ont été utilisées au regard des mesures de croissance équivalentes à celles observées chez les lots de 7 à 10 semaines. L'acclimatation en chambre de culture a duré deux semaines. Parallèlement, 50 chênes ont été acclimatés pendant 48 heures à ces mêmes concentrations mais sans marquage, pour des analyses morphologiques racinaires sur les effets de la concentration en nitrate et en ammonium.

2.2. Molinies bleues (*Molinia caerulea* (L.) Moench)

Les plants de molinies ont été prélevés dans le domaine forestier de Paray-le-Fresil (**Annexe 3**) et ramenés au laboratoire le 12 juin. Les feuilles ont été coupées à une hauteur de 15 cm à partir des racines puis transférées en pot avec de la vermiculite, dans la serre. 160 ont été transférées en chambre dans une cuve rectangulaire (140L) de solution hydroponique identique à celle du chêne (**Annexe 2**). Les expérimentations ont débutées le 6 juillet.

3. Mesure d'influx de NO_3^- et NH_4^+

Un lot de 10 béciers de 1 à 5 litres (**Tableau 2**) a été placé dans la chambre de culture (**Annexe 2**). 48 heures avant la mesure de l'influx, 6 plantes ont été placées dans des solutions nutritives dont la concentration en NO_3^- ou NH_4^+ correspond à celle utilisées pour ces mesures d'influx. (chêne : 1, 2, 5, 10, 25, 75, 100, 250, 1000 et 3500 μM ; molinie : 10, 25, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 3500 et 7500 μM). Le but de ces démarches est d'acclimater les plantes et d'éviter d'induire des biais causés par des perturbations (changement brutal de concentration, azote limitant) lors des mesures d'influx. La solution a été renouvelée une fois. Après ces 48h d'acclimatation, les végétaux sont transférés dans des béciers de 1L au nombre de 2, 3 ou 6 par béciers (**Tableau 2**), selon la concentration testée. Ces béciers contiennent les mêmes concentrations de nitrate ou d'ammonium auxquelles les plantes ont été acclimatés, mais sous forme marquée (^{15}N). Après 5 minutes de marquage, les plantes ont été transférées 5 secondes dans une solution de rinçage (1L) identique à la solution hydroponique afin d'éliminer le ^{15}N adsorbé en surface. Pour finir, les racines ont été immergées pendant 5 minutes dans la solution de rinçage (2L) pour enlever le ^{15}N dans l'apoplasme. La durée de ces étapes est basée sur les demi-vies d'échange de NO_3^- et NH_4^+ de la surface de la racine, l'espace libre, et le cytoplasme déterminé par analyse d'efflux (Kronzucker *et al.*, 1995a et b).

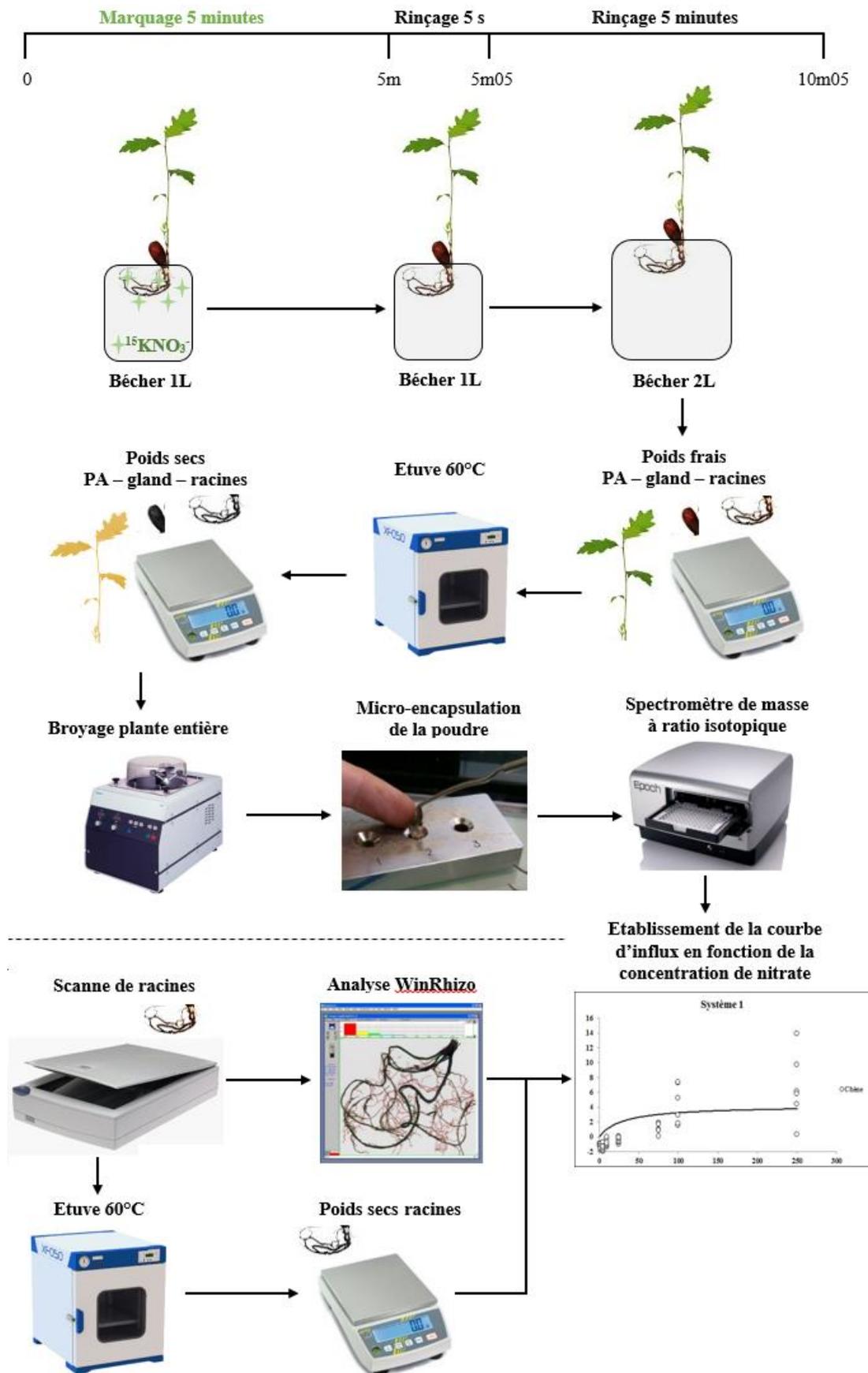


Figure 7 : Succession des étapes et dispositif expérimental mis en place pendant et après le marquage. Le trait pointillé sépare les analyses fonctionnelles (en eau) des analyses structurales (en bas). La même méthodologie a été utilisée pour la molinie. Le nombre de plante par b cher est précisé en **tableau 2**.

4. Récoltes des plants en pot et des plants en chambre de culture

4.1. Récolte des chênes et molinies placés en pots

Le 1^{er} juillet, les racines des 10 chênes et 10 molinies ont été tamisées avec un tamis de diamètre 2 mm, afin d'éviter les pertes de matériel végétal, puis lavées à l'eau. Les racines ont été séparées des parties aériennes et placées à -70°C.

4.2. Récolte des chênes et des molinies placés en chambre de culture

Suite au rinçage, les racines, les parties aériennes et le gland dans le cas du chêne ont été séparés puis pesés afin de déterminer la masse fraîche. Ils ont ensuite été placés dans du papier d'aluminium et mis à l'étuve 4 jours à 60°C. Pour les molinies, 48 heures suffisent. Après les avoir pesés pour définir la masse sèche, les PA, racines et glands (pour le chêne) ont été poolés plante par plante. Durant les expérimentations, 15 chênes et 11 molinies restées dans la cuve de solutions hydroponiques ont été récoltés et seules les racines ont été conservées à -70°C pour les analyses de morphologie racinaire.

5. Broyage et dosage ¹⁴N/¹⁵N

Chaque chêne marqué provenant de la chambre de culture a ensuite été broyé à l'aide d'un broyeur muni d'une plaque 0,75 mm et la poudre obtenue a été transférée dans des tubes en plastique de 10 mL. Les molinies ont été prédécoupées manuellement. L'utilisation d'un broyeur à bille a permis d'obtenir une poudre plus fine afin d'en prélever 3 à 3,5 mg et de la transférer dans des microcapsules en étain. Les échantillons, disposés dans des microplaques 96 puits, ont été envoyés à l'INRA de Nancy Champenoux pour une analyse de la quantité de ¹⁵N au spectromètre de masse à ratio isotopique (**Annexe 4**).

6. Analyse morphologique des systèmes racinaires

Les racines récoltées dans les deux expérimentations (serre et chambre de culture) ont été scannées (scanner Epson). La totalité de ces racines a ensuite été placée à l'étude (60°C) pendant une semaine, puis pesées pour déterminer la masse sèche. Les scans ont été traités par un logiciel d'analyse d'image nommé WinRHIZO spécialement conçu pour des mesures racinaires (morphologie, topologie, architecture, analyses couleur). Seules les données de diamètre, surface et longueurs racinaires ont été retenues. Les masses sèches et la longueur racinaire ont permis de calculer la longueur racinaire spécifique (SRL en cm.g⁻¹). Le schéma récapitulatif des manipulations est présenté en **figure 7**.

7. Calculs et analyses statistiques

7.1. Calcul de la quantité d'azote total et de ^{15}N dans la plante

La quantité d'azote total (N_{tot} , mg) dans un échantillon est déterminée par le calcul suivant :

$$N_{\text{tot}} = \frac{\%N_{\text{total}} \times MS}{100} \times 1000, \text{ avec } \%N_{\text{total}} : \text{teneur en azote (\% MS)} ; MS : \text{masse sèche (g)}. \text{ La quantité}$$

d'azote marqué (^{15}N) est donnée par le rapport suivant : $^{15}\text{N} = \frac{(AI_{\text{échantillon}} - AI_{\text{nat}}) \times N_{\text{tot}}}{100}$, avec $AI_{\text{échantillon}}$

(%) : abondance isotopique en ^{15}N de l'échantillon marqué ; AI_{nat} (%) : abondance isotopique de l'échantillon non marqué. L'abondance isotopique correspond à la proportion d'azote 15 de la quantité

d'azote total présent dans l'échantillon, soit : $AI = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \times 100$.

7.2. Calcul de l'influx de ^{15}N et cinétique de Michaelis-Menten

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

la vitesse d'influx ($\mu\text{mol.g}(\text{MS}_r)^{-1}.\text{h}^{-1}$) du nitrate avec la formule suivante : $\frac{MS \times \frac{N_{\text{tot}}}{100} \times \frac{E}{100}}{d \times MS_r \times 15 \times EI} \times 100 \times 10^6$ avec

MS : masse sèche de l'échantillon en g ; N_{tot} : teneur en azote total de l'échantillon en % ; E : l'excès isotopique de l'échantillon en % ; EI : l'excès isotopique de la solution nutritive marquée au ^{15}N , ici $EI = 0,3678$; d : durée de l'incubation exprimée en heure ; MS_r : masse sèche des racines en g.

L'équation cinétique de Michaelis-Menten permet de décrire l'influx d'ion en fonction de la concentration de nitrate ou d'ammonium au niveau racinaire : $I_n = \frac{I_{\text{max}}}{K_m}$ Avec I_n (influx massique : $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$; influx surfacique : $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{cm}.\text{h}^{-1}$) l'influx ionique ; I_{max} est l'influx maximal ; K_m (μM) est la constante de Michaelis-Menten et elle représente la concentration à laquelle l'influx est égal à $0,5I_{\text{M}}$.

7.3. Analyses statistiques

Dans les différentes expériences, chaque plante est considérée comme une unité expérimentale. Pour les expérimentations en pots, les mesures de diamètre, surface, masse sèche, longueur et SRL ont été comparées intraspécifiquement puis interspécifiquement pour chaque traitement, par un test de Student indépendant ($\alpha = 5\%$), avec le logiciel R (package Rcmdr). Pour les expériences en chambre de culture, les comparaisons statistiques de masse et de teneur en eau des différentes parties de la plante ont été réalisées par un ANOVA 1 (facteur : masse ou teneur en eau, modalité : concentration, $\alpha = 5\%$). Les classes statistiques sont établies par ce programme et permettent de mettre en évidence des différences significatives, ainsi que leur degré de variation à l'échelle de toutes les concentrations ($n = 11$ pour le chêne, $n = 10$ pour la molinie). Pour les mesures de longueur racinaire et de SRL chez le chêne, les mêmes comparaisons statistiques ont été appliquées, pour un nombre de répétitions égal à 5.

Tableau 3 : Diamètre, surface, masse, longueur et longueur racinaire spécifique d'un lot de dix chênes et dix molinies cultivés en pot ayant reçu (+N) ou non un apport d'azote de 90 kg.ha⁻¹ (un pot contient un chêne et trois molinies, dont une seule a été utilisée pour les mesures). Un test de Student indépendant ($\alpha = 5\%$) a été réalisé pour chaque mesure. Les valeurs sont les moyennes des 5 répétitions (\pm SE). La probabilité que la différence entre les deux traitements (N+/N-) ou les deux espèces soit significative est représentée par la valeur *p*.

Mesures racinaires	Traitement azoté	Chêne	<i>p</i> chêne N+/N-	Molinie	<i>p</i> molinie N+/N-	<i>p</i> N chêne/molinie
Diamètre (mm)	N+	3 \pm 0,19	< 0,05	0,38 \pm 0,01	> 0,05	< 0,05
	N-	1,72 \pm 0,04		0,42 \pm 0,01		< 0,05
Surface (cm ²)	N+	37 \pm 0,98	< 0,05	44 \pm 0,38	> 0,05	< 0,05
	N-	46 \pm 0,48		43 \pm 0,17		< 0,05
Masse sèche (g)	N+	9,30 \pm 0,32	> 0,05	91,20 \pm 8,42	> 0,05	< 0,05
	N-	10,35 \pm 0,79		49,71 \pm 4,44		< 0,05
Longueur (m)	N+	79 \pm 7,45	< 0,05	63820 \pm 5301	> 0,05	< 0,05
	N-	129 \pm 3,31		31357 \pm 2678		< 0,05
SRL (cm.g ⁻¹)	N+	821 \pm 51	< 0,05	71688 \pm 3653	> 0,05	< 0,05
	N-	1310 \pm 73		65317 \pm 2972		< 0,05

Résultats et discussion

1. Expérimentation en serre : caractérisation des systèmes racinaires de chêne et de molinie placés en compétition avec ou sans apport d'azote

Dans le *traitement N+*, la croissance racinaire de la molinie est nettement supérieure à celle du chêne en termes de matière sèche produite (x 9,1 supérieure), et, dans une moindre mesure, en termes de longueur racinaire (x 1,85 supérieure). Il en résulte une valeur de SRL supérieure chez la poacée (**Tableau 3**). Ces résultats rendent compte d'une meilleure allocation du carbone vers les parties racinaires. De plus, une valeur supérieure de SRL traduit une meilleure utilisation du carbone pour accroître la capacité de prospection racinaire. Bien que statistiquement supérieures chez la molinie, les valeurs de surfaces racinaires mesurées sont proches : $37 \pm 0,98 \text{ cm}^2$ pour le chêne et $44 \pm 0,38 \text{ cm}^2$ pour la molinie, malgré des longueurs différentes. Cela s'explique par des valeurs de diamètre nettement supérieures chez le chêne ($3 \pm 0,19 \text{ mm}$) par rapport à la molinie ($0,38 \pm 0,01 \text{ mm}$). Chez cette dernière, la faible valeur de diamètre racinaire permet une pénétration dans les espaces du sol les plus étroits facilitant ainsi la prospection du milieu. Ceci confère également une capacité de captation de l'eau et des nutriments supérieure à celle du chêne. De plus, le système racinaire des graminées, par sa croissance rapide et son abondance va avoir tendance à former une enveloppe qui serait susceptible d'étouffer celui des jeunes ligneux. Le développement du chêne est donc fortement concurrencé par celui de la molinie au niveau morphologique et physiologique.

Dans le *traitement N-*, qui correspond à un niveau d'influx plus limité en azote du sol quand les deux espèces sont cultivées simultanément, la comparaison interspécifique de la croissance racinaire montre des valeurs toujours supérieures chez la molinie. Ces observations sont constatées aussi bien pour la biomasse sèche ($10,35 \pm 0,79 \text{ g}$ chez le chêne et $49,71 \pm 4,44 \text{ g}$ chez la molinie) que pour la longueur racinaire ($129 \pm 3,31 \text{ m}$ chez le chêne et $63820 \pm 5301 \text{ m}$ chez la molinie). En revanche, l'analyse intraspécifique des résultats met en évidence une réponse contrastée à la disponibilité en azote : la longueur et la surface sont significativement augmentées dans le traitement N- chez le chêne (+ 63% pour la longueur et +24% pour la surface racinaire). Chez la molinie les mesures racinaires entre les différents traitements sont statistiquement identiques. Ainsi, dans la gamme de l'offre en azote testée dans cette expérimentation à l'échelle du système racinaire, il est constaté qu'une réduction de cette offre entraîne une amélioration de la prospection racinaire chez le chêne (SRL de $821 \pm 51 \text{ cm.g}^{-1}$ et de $1310 \pm 73 \text{ cm.g}^{-1}$, pour les traitements N+ et N-, respectivement), résultant d'une utilisation du carbone plus optimale. Néanmoins, les valeurs de SRL restent nettement inférieures à celle de la molinie. En termes de capacité pour l'accès aux ressources du sol, ces dernières sont améliorées, aboutissant à une surface racinaire légèrement supérieure chez le chêne (**Tableau 3**).

Tableau 4 : Masse sèche (MS) des parties aériennes (PA), des racines (R), du rapport parties aériennes sur racines (PA/R) et de la plante entière (PE), et teneur en eau ($TE = \frac{PF-PS}{PF}$) des parties aériennes, des racines et de la plante entière, en fonction de la concentration en nitrate ou en ammonium, chez le chêne (n=6). SRL et longueur racinaire (Long. R) (n=5).

[KNO ₃] NO ₃ /NH ₄ ⁺		1	2	5	10	25	75	100	250	500	1000	3500
MS (g)	PA	0,55ab	0,6ab	0,67b	0,46ab	0,48ab	0,60b	0,39ab	0,33a	0,40ab	0,37ab	0,42ab
	R	0,55a	0,6a	0,57a	0,42a	0,50a	0,60a	0,45a	0,41a	0,61a	0,40a	0,37a
	PA/R	1,13a	1,11a	1,19a	1,26a	0,98a	1,11a	0,96a	0,93a	0,71a	1,42a	1,41a
	PE	2,62ab	3,46bc	3,53b	2,33ab	2,21ac	2,69ab	2,17ac	2,02a	2,16ab	2,37ab	2,37ab
TE	PA	0,69a	0,66a	0,62a	0,64a	0,68a	0,64a	0,66a	0,67a	0,62a	0,69a	0,67a
	R	0,83b	0,82ab	0,83b	0,78ab	0,78ab	0,77ab	0,78ab	0,78ab	0,72a	0,84b	0,82ab
	PE	0,74a	0,70a	0,70a	0,69a	0,70a	0,69a	0,70a	0,71a	0,68a	0,71a	0,69a
SRL (cm.g ⁻¹)					6779,	4977,	6176,	3604,	6825,	5545,		
Long. R (cm)					43a	12a	71a	67a	90a	00a		
					2180,	2594,	3284,	1971,	1901,	2496,		
					36a	41a	71a	53a	68a	58a		
[(NH ₄) ₂ SO ₄] NO ₃ /NH ₄ ⁺		1	2	5	10	25	75	100	250	500	1000	3500
MS (g)	PA	0,48a	0,61a	0,55a	0,56a	0,54a	0,42a	0,64a	0,62a	0,52a	0,79a	0,60a
	R	0,54a	0,60a	0,66a	0,68a	0,57a	0,52a	0,62a	0,47a	0,57a	0,77a	0,43a
	PA/R	0,90a	1,02a	0,89a	0,97a	1,10a	1,10a	1,11a	1,54a	1,12a	1,02a	1,86a
	PE	2,64a	2,75a	2,63a	2,89a	2,64a	2,47a	2,73a	2,60a	2,25a	3,44a	2,47a
TE	PA	0,65a	0,64a	0,66a	0,66a	0,64a	0,63a	0,63a	0,63a	0,60a	0,64a	0,63a
	R	0,80ab	0,78ab	0,80ab	0,78ab	0,79ab	0,72ab	0,71ab	0,79ab	0,72a	0,82b	0,77ab
	PE	0,72a	0,71a	0,76a	0,71a	0,71a	0,68a	0,68a	0,70a	0,65a	0,73a	0,67a
SRL (cm.g ⁻¹)					4724,		5171,	6474,	6041,			
					29a		65a	65a	98a			
Long. R (cm)					1836,		2239,	1407,	1844,			
					40a		44a	56a	55a			

Enfin, l'exploration du sol est aussi optimisée chez le chêne en raison d'une réduction significative du diamètre racinaire d'un facteur 1,74. Lorsque l'azote devient limitant, il semblerait qu'il y ait une modification de l'allocation du carbone à l'échelle de la racine. La croissance en épaisseur diminue au profit de la croissance en longueur, favorisant le nombre de racines fines. L'augmentation de la surface racinaire accroît également le potentiel d'absorption. La masse étant quasiment inchangé, la SRL va être plus importante. Le chêne en situation de carence azotée va accentuer le phénomène de prolifération racinaire afin de prospecter une quantité de sol plus importante. Chez la molinie en revanche, il n'y a pas de différence significative au niveau de la morphologie racinaire entre un traitement azoté et un traitement sans apport d'azote.

En conclusion, cette expérience de culture interspécifique révèle que la molinie est plus tolérante aux conditions azotées limitantes. *A contrario*, le chêne, fortement concurrencé, modifie sa croissance racinaire de sorte à augmenter sa capacité de prospection du sol, les racines sont plus longues, plus fines, et la SRL plus importante corrobore avec une prolifération racinaire supérieure en situation de carence en azote.

2. Expérimentation en chambre de culture : cinétique d'absorption racinaire du nitrate et de l'ammonium

L'objectif de ces expérimentations est de mesurer la réponse de l'influx de NO_3^- et de NH_4^+ à des concentrations croissantes de ces deux ions dans la solution nutritive. A l'œil nu (**Annexe 5**), il est d'ores-et-déjà possible d'observer que les systèmes racinaires de molinie sont plus petits, mais révèlent aussi une croissance journalière supérieure.

2.1. Caractérisation du matériel végétal utilisé : biomasse sèche et teneur en eau

Pour les *jeunes plants de chênes* utilisés, l'acclimatation à différentes concentrations de NO_3^- pendant 48h n'a eu aucun effet sur les biomasses sèches des racines, ni sur le ratio PA/R et ni sur les teneurs en eau des PA et de la PE (**Tableau 4**). Des variations de la biomasse sèche des PA (min : 0,33 g et max : 0,67 g), des PE (min : 2,02 g et max : 3,53 g) ainsi que de la TE des racines (min : 0,72 et max : 0,84) ont pu être observées. Dans le cas des MS des PA, cette hétérogénéité pourrait résulter (i) de la différence de croissance initiale constatée après la germination dans la serre et/ou (ii) de la taille des réserves initialement présentes dans le gland et sur lesquelles la jeune plante va s'appuyer pour mettre en place ses PA. Cette hétérogénéité n'est par ailleurs pas observée chez les plantes utilisées pour mesurer les influx de NH_4^+ . Ces dernières ayant bénéficiées d'une durée d'acclimatation plus longue (elles ont été prélevées une semaine après) pourrait s'être homogénéisées. Concernant les TE des racines, un effet « manipulation » lors des premières expérimentations pourrait expliquer cette variation, d'autant plus qu'à l'échelle de la plante entière, cette teneur en eau ne varie pas, ce qui suppose que s'il y a une variation, elle reste globalement

Tableau 5 : Masse sèche (MS) des parties aériennes (PA), des racines (R), du rapport parties aériennes par racines (PA/R) et de la plante entière (PE), et teneur en eau ($TE = \frac{PF-PS}{PF}$) des parties aériennes, des racines et de la plante entière, en fonction de la concentration en nitrate ($[KNO_3^-]$) ou en ammonium ($[(NH_4)_2SO_4^+]$), chez la molinie.

		[KNO₃⁻]	10	25	75	100	250	500	750	1000	3500	7500
		NO₃⁻/NH₄⁺	0,056	0,139	0,417	0,556	1,389	2,778	4,167	5,556	19,44	41,67
MS (g)	PA		0,14 ^{ab}	0,15 ^b	0,12 ^{ab}	0,11 ^{ab}	0,10 ^{ab}	0,09 ^{ab}	0,11 ^{ab}	0,10 ^{ab}	0,08 ^a	0,10 ^{ab}
	R		0,10 ^a	0,13 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,11 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a	0,09 ^a
	PA/R		1,63 ^a	1,17 ^a	1,44 ^a	1,20 ^a	1,26 ^a	1,02 ^a	1,38 ^a	1,20 ^a	1,38 ^a	1,45 ^a
	PE		0,23 ^{ab}	0,28 ^b	0,22 ^{ab}	0,20 ^{ab}	0,19 ^{ab}	0,20 ^{ab}	0,20 ^{ab}	0,19 ^{ab}	0,17 ^{ab}	0,17 ^a
TE	PA		0,70 ^a	0,71 ^a	0,73 ^a	0,69 ^a	0,74 ^a	0,73 ^a	0,69 ^a	0,74 ^a	0,67 ^a	0,69 ^a
	R		0,81 ^a	0,78 ^a	0,82 ^a	0,79 ^a	0,81 ^a	0,82 ^a	0,79 ^a	0,81 ^a	0,78 ^a	0,80 ^a
	PE		0,76 ^a	0,75 ^a	0,78 ^a	0,75 ^a	0,78 ^a	0,73 ^a	0,75 ^a	0,74 ^a	0,75 ^a	0,73 ^a
		[(NH₄)₂SO₄⁺]	10	25	75	100	250	500	750	1000	3500	7500
		NO₃⁻/NH₄⁺	50	20	6,667	5	2	1	0,667	0,5	0,143	0,067
MS (g)	PA		0,13 ^a	0,12 ^a	0,11 ^a	0,10 ^a	0,11 ^a	0,13 ^a	0,10 ^a	0,11 ^a	0,10 ^a	0,13 ^a
	R		0,12 ^a	0,15 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	0,08 ^a	0,12 ^a	0,07 ^a	0,11 ^a	0,13 ^a	0,12 ^a
	PA/R		1,18 ^a	0,93 ^a	0,99 ^a	0,94 ^a	1,71 ^a	1,28 ^a	1,78 ^a	1,29 ^a	0,93 ^a	1,43 ^a
	PE		0,25 ^a	0,27 ^a	0,23 ^a	0,22 ^a	0,19 ^a	0,24 ^a	0,17 ^a	0,22 ^a	0,22 ^a	0,25 ^a
TE	PA		0,71 ^a	0,70 ^a	0,70 ^a	0,70 ^a	0,72 ^a	0,68 ^a	0,70 ^a	0,67 ^a	0,65 ^a	0,70 ^a
	R		0,80 ^a	0,76 ^a	0,80 ^a	0,80 ^a	0,81 ^a	0,80 ^a	0,79 ^a	0,73 ^a	0,78 ^a	0,81 ^a
	PE		0,76 ^a	0,74 ^a	0,76 ^a	0,76 ^a	0,76 ^a	0,75 ^a	0,74 ^a	0,70 ^a	0,73 ^a	0,76 ^a

négligeable. De même, pour deux manipulations (nitrate et ammonium), la longueur et la SRL n'ont pas variées avec la concentration pendant l'expérience. Plusieurs hypothèses peuvent être émises ; les chênes n'ont peut-être pas perçu la modification de teneur en azote (durée insuffisante dans les expériences, il est possible qu'ils aient utilisés leurs réserves et il se peut également que la croissance racinaire diffère entre une solution hydroponique et un sol compacte. De plus, dans les pots, les chênes étaient en concurrence avec la molinie, ceci peut contribuer à accélérer le processus de prolifération racinaire. A l'échelle de la plante entière, cette teneur en eau ne varie pas, ce qui suppose que s'il y a une variation, elle reste globalement négligeable.

Pour la *molinie* (**Tableau 5**), seules des différences de masse sèche des parties aériennes et de la plante entière sont observées dans le cas où la concentration en nitrate varie. Là non plus, il n'y a pas de lien qui peuvent être établi entre la teneur en nitrate et la masse sèche des plantes. Les autres mesures de masse et la totalité des teneurs en eau sont constantes quand la concentration augmente. Pour l'ammonium, cette uniformité des classes statistiques est observée pour toutes les analyses.

En conclusion, une concentration donnée de nitrate ou d'ammonium durant 48 heures n'impacte ni la biomasse ni la teneur en eau de la plante. Dans certains cas, les variations constatées sont hétérogènes, les classes statistiques ne montrent pas de liens particuliers avec une augmentation de la concentration. Il semblerait que ce soit des différences qui étaient présentes au départ et qui ont persisté durant les expériences. Cette hypothèse est partiellement confirmée par les résultats obtenus avec les expériences sur l'ammonium, chez le chêne et chez la molinie. Les plantes utilisées avaient passé plus de temps en solution hydroponique. Il est possible que cette acclimatation au système de culture en chambre climatique ait contribué à homogénéiser le matériel végétal.

2.2. Cinétiques de l'absorption racinaires du nitrate et de l'ammonium

2.2.1. Courbes de réponse de l'influx de NO_3^-

Pour le chêne et la molinie, l'absorption du nitrate suit une cinétique inattendue et différente selon l'espèce (**Figure 8 : A et B**, au dos). Pour des concentrations inférieures à 100 μM , les valeurs d'influx mesurées sont nulles (les valeurs négatives observées s'expliquent par la valeur de l'abondance isotopique naturelle choisie). A partir de 100 μM , l'influx de nitrate augmente chez le chêne pour atteindre la valeur de 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (MSr) tandis que l'influx mesuré chez la molinie reste nul. A partir des données disponibles pour le chêne, une équation de cinétique de type Michaelis-Menten a été ajustée afin de définir une cinétique théorique dont les valeurs de I_{max} et de K_m sont rapportés dans le **tableau 6**. La comparaison entre la cinétique modélisée et celle mesurée met en évidence une réduction de l'influx de NO_3^- chez le chêne pour de faibles concentrations de l'ion dans la solution nutritive.

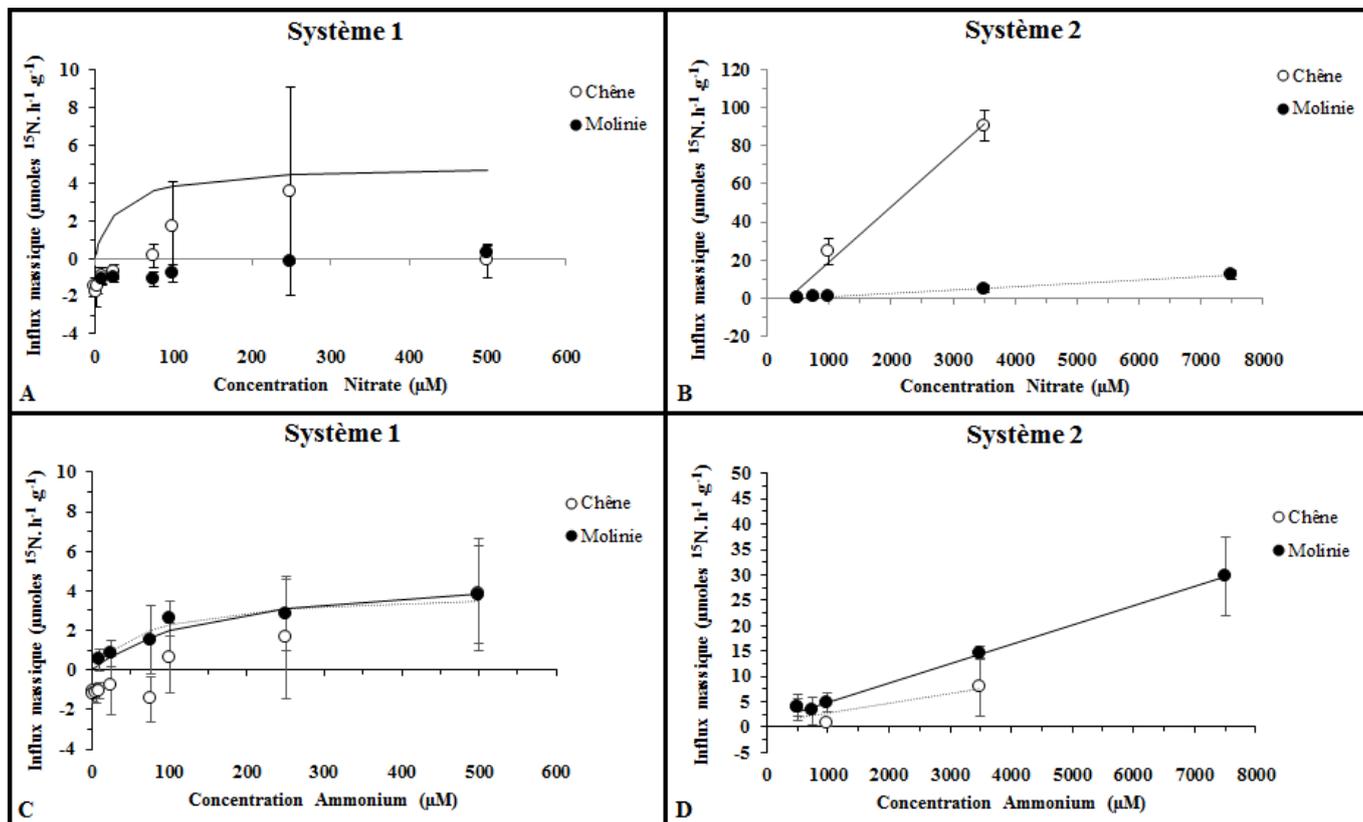


Figure 8 : Influx massique et de $K^{15}NO_3^-$ (A et B) et de $^{15}(NH_4)_2SO_4^+$ (C et D) dans les racines de chêne et de molinie. Les concentrations analysées sont comprises entre 1 et 500 (Système 1 : A et C) puis entre 500 et 7500 (Système 2 : B et D). Les courbes des systèmes 1 sont définies d'après l'équation cinétique de Michaelis-Menten. Les courbes des systèmes sont linéaires. Les traits pleins représente la cinétique du chêne et les traits pointillés celle de la molinie (n=5). Les points représente la moyenne \pm l'écart-type.

Tableau 6 : I_{max} et K_m définie selon l'équation de Michaelis-Menten pour le système HATS (concentration < 500 μM) et coefficient a et b des droites représentant les cinétiques du système LATS (concentration > 500 μM). R^2 est le coefficient de régression (plus R^2 est proche de 1, plus la probabilité que l'équation fournie reflète correctement la relation entre les données est bonne). Dans les expérimentations « nitrate » avec la molinie, les résultats n'ont pas permis d'obtenir une courbe type MM.

	Nitrate		Ammonium	
	Chêne	Molinie	Chêne	Molinie
I_{max}	5	-	5	4
K_m	30	-	150	75
R^2	0,79	-	0,95	0,97
a	0,029	0,0017	0,0018	0,0038
b	-10,037	-0,7301	1,0372	1,0562
R^2	0,98	0,99	0,67	0,99

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette réduction : (1) au cours de l'expérimentation, la concentration en ammonium est restée inchangée. Par conséquent le ratio $[\text{NO}_3^-]/[\text{NH}_4^+]$ a été d'autant plus faible pour les gammes de concentrations comprises entre 0 et 100 μM . L'ammonium a pu exercer une action d'inhibition sur l'activité des systèmes de transport (au niveau des activités intrinsèque). Ce processus a été clairement démontré chez plusieurs espèces (*Pseudotsuga menziesii*, Kamminga-Van Wijk et Prins, 1993 ; *Hordeum vulgare*, Kronzucker *et al.*, 1999 ; *Pinus sylvestris*, Gruffman *et al.*, 2013). (2) La seconde hypothèse est qu'au-delà de 100 μM , l'influx maximal atteint correspond à ceux déjà mesurés par d'autres méthodes et dans d'autres situations (Mata *et al.*, 1999), ce qui renforce l'hypothèse d'une inhibition par l'ammonium. Enfin, il ne faut pas exclure une erreur de manipulation.

En conclusion, dans la mesure où les deux espèces ont été maintenues dans des conditions équivalentes (lumière, température, concentration), il ressort aussi que la capacité d'absorption du nitrate chez le chêne serait supérieure à celle de la molinie (**Tableau 6**) (coefficient de 0,029 et de 0,0017, pour le chêne et la molinie, respectivement). Cette tendance est confirmée par les valeurs d'influx mesurées à de fortes concentrations de NO_3^- : l'influx suit une augmentation linéaire mais celle-ci est deux fois supérieure chez le chêne.

2.2.2. Courbes de réponse de l'influx de NH_4^+

Une démarche équivalente à celle exposée pour le NO_3^- a été réalisée. Dans le cas du NH_4^+ , les cinétiques d'absorption racinaire chez le chêne et la molinie sont différentes (**Figure 8 : C et D**). En effet, la courbe de réponse de l'influx de NH_4^+ suit une cinétique de Michaelis-Menten chez la molinie pour atteindre une valeur maximale de 4 $\mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}(\text{MSr})$. En ce qui concerne le chêne, les valeurs d'influx d'ammonium sont nulles jusqu'à 100 μM avant d'augmenter et d'atteindre une valeur équivalente à celle de la molinie (4 et 3,8 pour le chêne et la molinie, respectivement). L'ajustement d'une équation cinétique de type Michaelis-Menten aux valeurs expérimentales d'influx de NH_4^+ met en exergue deux points. Tout d'abord, les cinétiques sont proches, ce qui suggère des capacités équivalentes d'absorption de l'ammonium chez ces deux espèces dans ces conditions expérimentales. Ensuite, la comparaison entre la courbe de réponse mesurée et la cinétique modélisée met en évidence une réduction de l'influx pour de faibles valeurs de $[\text{NH}_4^+]$. Encore, le ratio $[\text{NO}_3^-]/[\text{NH}_4^+]$ au profit du nitrate pourrait expliquer une absorption préférentielle du nitrate et une inhibition par les produits d'assimilation liée à cette absorption de NO_3^- de l'activité des systèmes de transports du NH_4^+ . Par ailleurs, une carence en azote augmente fortement le prélèvement de NH_4^+ alors qu'une fourniture d'azote induit une diminution de ce prélèvement.

En conclusion, la vitesse d'absorption n'est généralement pas corrélée avec la teneur de l'ion dans les tissus. Ceci n'est pas en faveur d'un contrôle de l'entrée de NH_4^+ par l'ammonium intracellulaire mais suggère plutôt l'implication d'un produit de son assimilation, acide aminé par exemple (Wang *et al.*, 1993). Cette observation est corroborée par le fait qu'une augmentation de NH_4^+ entrainerait une augmentation de l'influx cet ion quand le ratio est tel que $[\text{NH}_4^+]/[\text{NO}_3^-] > 0,2$. Pour de fortes concentrations en NH_4^+ , l'absorption suit une relation linéaire et elle est supérieure chez la molinie (**Tableau 6**) (coefficient de $0,0038 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{MSr})$ et $0,0018 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{MSr})$, pour la molinie et le chêne, respectivement). De manière générale, les graminées ont une très forte préférence pour l'ammonium (Grassein *et al.*, 2015), même lorsqu'il est présent en beaucoup plus faible quantité que le nitrate.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était d'identifier les caractères fonctionnels et/ou structuraux pouvant rendre compte d'une meilleure acquisition de l'azote minéral du sol par la molinie en compétition avec le chêne.

D'un point de vue *structural*, les résultats obtenus ont clairement mis en évidence un avantage compétitif de la morphologie du système racinaire chez la molinie, par rapport au chêne. Ceci s'explique par (i) une allocation plus importante du carbone dans les parties racinaire (biomasse, longueur, surface), (ii) d'un investissement efficient du carbone dans la prospection racinaire (SRL molinie > SRL chêne) et (iii) d'une capacité accrue à explorer le volume poral de taille hétérogène (diamètre molinie < diamètre du chêne). Il ressort également que la réduction de l'offre en azote améliore les paramètres du système racinaire chez le chêne, même si ces derniers restent en-deçà de ceux de la molinie.

D'un point de vue *fonctionnel*, nos résultats montrent que les racines de chênes ont une capacité intrinsèque d'absorption du nitrate supérieure à celle de la molinie. A l'inverse, ce sont les racines de molinie qui présentent les capacités supérieures d'absorption de l'ammonium. Les deux tendances sont nettes pour de fortes concentrations en NO_3^- et en NH_4^+ , dans la gamme de concentrations de fonctionnement du LATS. En revanche, pour de faibles concentrations, il ressort que les ratio $[\text{NO}_3^-]/[\text{NH}_4^+]$ ou $[\text{NH}_4^+]/[\text{NO}_3^-]$, pour les influx respectifs de NO_3^- et de NH_4^+ , sont aussi un élément important à prendre en compte. En effet, en-deçà d'une certaine valeur (oscillant entre 0,2 et 0,5 dans ces expérimentations), les influx de NO_3^- ou de NH_4^+ étaient fortement réduits. Enfin, la variabilité à cette inhibition est plus élevée chez la molinie pour l'absorption du nitrate et chez le chêne pour l'absorption de l'ammonium. En fonction de la nature du sol, du pH, de l'humidité, l'équilibre $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ peut aussi piloter l'absorption de l'azote minéral pour chaque espèce.

En termes de perspectives, plusieurs pistes peuvent être proposées :

- Prise en compte **d'autres formes azotées disponibles** dans le sol : seuls les influx de nitrate et d'ammonium en tant que forme azotée ont été mesurés. Or, dans l'écosystème sol, d'autres éléments azotés pouvant être absorbés par la plante sont à prendre en compte, tels que les acides aminés (glycine par exemple, Warren et Adams, 2007).
- Prise en compte de la **mycorhization** : des formes d'azote organique peuvent être assimilées grâce aux symbioses mycorhiziennes (Hodge et Storer, 2015) et ainsi être plus compétitifs face à un autre élément du sol : les microorganismes (Kuzyakov et Xu, 2013).
- Prise en compte de la **disponibilité en eau du sol sur l'absorption de l'azote du sol** : des analyses d'évapotranspiration foliaire pourrait conduire à déterminer des cinétiques différentes de l'absorption de l'eau du sol, et donc des éléments minéraux

Réflexions personnelles

Cette première expérience en immersion dans un laboratoire de recherche m'a confirmé que la démarche de réaliser un projet, depuis la réflexion bibliographique jusqu'à l'analyse et l'interprétation des résultats en passant par les manipulations, me correspondait. En effet, l'opportunité de m'investir dans un sujet qui me tient à cœur, à savoir l'impact des activités anthropiques et climatologiques sur la physiologie de l'arbre forestier, n'ont fait que me conforter dans l'idée de poursuivre dans ce domaine. Le fait d'être actrice de mon travail pousse d'autant plus à développer de la rigueur et de l'autonomie. Le métier de la recherche impose d'être polyvalent et attise particulièrement la curiosité, tant pour les techniques que pour la compréhension du fonctionnement de la plante, consolidant et/ou apportant ainsi plus de connaissances.

Le travail d'équipe et les interactions avec les différents membres permettent aussi de progresser sur le plan professionnel mais aussi personnel. La confiance qui m'a été accordée m'a incitée à être organisée et à être réellement immergée dans la démarche de recherche. Ce sont ces investissements à la fois intellectuels et physiques (je n'ai pas seulement développée de la rigueur et de l'autonomie, mes biceps aussi ont bien travaillé...) qui font qu'aujourd'hui j'ai hâte de revivre cette expérience.

Références bibliographiques

- Aibara, I. and Miwa, K.** (2014). Strategies for optimization of mineral nutrient transport in plants: multilevel regulation of nutrient-dependent dynamics of root architecture and transporter activity. *Plant & Cell Physiology* **55**: 2027-2036.
- Agren, G.I. and Ingestad, T.** (1987). Root :shoot ratio as a balance between nitrogen productivity and photosynthesis. *Plant, Cell Environment* **10**: 579-586.
- Barber, S. A.** (1962). A diffusion and mass-flow concept of soil nutrient availability. *Soil Science* **93**: 39-49.
- BassiriRad, H.** (2000). Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change. *New Phytologist* **147**: 155-169.
- BassiriRad, H., Lussenhop, J. F., Sehtiya, H. L. and Borden, K. K.** (2015). Nitrogen deposition potentially contributes to oak regeneration failure in the Midwestern temperate forests of the USA. *Oecologia* **177**: 53-63.
- Becker M.** (1984a) Propriétés allélopathiques de *Molinia caerulea* (L) Moench et de *Carex brizoides* L; influence sur la germination et sur la croissance de *Lepidium sativum* L. Communication au 7e Colloque International sur l'Ecologie, la Biologie et la Systématique des mauvaises herbes, Paris, France.
- Becker M.** (1984b) Importance de la lumière dans l'expression des relations allélopathiques en forêt. *CR Acad Agric Fr* **70**: 1545- 1552
- Becker, M. and Levy** (1983) Installation et dynamique d'une population de semis de chênes en milieu hydromorphe sous l'influence de divers facteurs (lumière, régime hydrique, compétition herbacée) *Acta Oecol Plant* **18**: 299-317
- Berger, T. W. and Glatzel, G.** (1994). Deposition of atmospheric constituents and its impact on nutrient budgets of oaks forests (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) in Lower Austria. *Forest Ecology and Management* **149**: 1-14.
- Coll, L., Balandier, P., Picon-Cochard, C., Prevosto, B. and Curt, T.** (2003). Competition for water between beech seedlings and surrounding vegetation in different light and vegetation composition conditions. *Annals of Forest Science* **60**: 593-600.
- Coll, L., Balandier, P. and Picon-Cochard, C.** (2004). Morphological and physiological responses of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings to grass-induced belowground competition. *Tree Physiology* **24**: 45-54.
- Davies, D.A.** (1987). Long-term effects of improvement methods on *Molinia caerulea* dominant rough grazing on wet hill land. 2. Mineral composition of herbage and soil physical, chemical and biological characteristics. *The Journal of Agricultural Science* **109**: 243-255.
- Davis, M. A., Wrage, K. J., Reich, P. B., Tjoelker, M. G., Schaeffer, T. and Muermann, C.** (1999). Survival, growth, and photosynthesis of tree seedlings competing with herbaceous vegetation along a water-light-nitrogen gradient. *Plant Ecology* **145**: 341-350.
- De Boer, W. and Kowalchuk, G. A.** (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 853-866.
- Doddema, H. and Telkmp, G. P.** (1979). Uptake of Nitrate by Mutants of *Arabidopsis thaliana*, Disturbed in Uptake or Reduction of Nitrate. II. Kinetics. *Physiologia Plantarum* **45**: 332-338.
- Eissenstat, D. M.** (1991). On the relationship between specific root length and the rate of root proliferation: a field study using citrus rootstocks. *New Phytologist* **118**: 63-68.

- Faure-Rabasse, S., Le Deunff, E., Lainé, P., Macduff, J. H. and Ourry, A.** (2002). Effects of nitrate pulses on BnNRT1 and BnNRT2 genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1711 – 1721.
- Frochot, H., Levy, G., Wehrle, L., Lefevre, Y. and Lorsin, G.** (1986). Effectiveness of a mulching with newspapers on juvenile growth of wild cherry-tree (*Prunus-avium* L). *Annales Des Sciences Forestieres* **43**, 263-268.
- Gemmel, P., Nilsson, U. and Welander, T.** (1996). Development of oak and beech seedlings planted under varying shelterwood densities and with different site preparation methods in southern Sweden. *New Forests* **12**: 141-161.
- Glass, A. D. M. and Siddiqi, M. Y.** (1995). Nitrogen absorption by plants roots. *Nitrogen Nutrition in Higher Plants*. Associated Publishing Co., New Delhi, pp. 21-56.
- Gruffman, L., Jämtgård, S. and Näsholm, T.** (2014). Plant nitrogen status and co-occurrence of organic and inorganic nitrogen sources influence root uptake by Scots pine seedlings. *Tree Physiology* **34**: 205-213.
- Harley, J. L. and Smith, S. E.** (1983). Mycorrhizal symbiosis. London. (UK) : Academic Press.
- Hodge, H. and Storer, K.** (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen : implications for individual plants through to ecosystems. *Plant Soil* **386**: 1-19.
- Kamminga-van Wijk, C. and Prins, H. B. A.** (1993). The kinetics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by Douglas fir from single N-solutions and from solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- .
- Kozłowski, T. T. and Davies, W. J.** (1975). Control of water balance in transplanted trees. *Journal of Arboriculture* **1**: 1-10.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y. and Glass, A.D.M.** (1995a). Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta* **196**: 674-682.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y. and Glass, A.D.M.** (1995b). Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta* **196**: 691-698.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y. and Glass, A.D.M.** (1995c). Kinetics of NO_3^- Influx in Spruce. *Planta* **109**: 319-326.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y. and Glass, A.D.M.** (1996). Kinetics of NO_4^+ Influx in Spruce. *Planta* **110**: 773-779.
- Kronzucker, H.J., Glass, A. D. M. and Siddiqi, M. Y.** (1999). Inhibition of nitrate uptake by ammonium in Barley. Analysis of component fluxes. *Plant Physiology* **120**: 283-291.
- Kuster, T. M., Schleppe, P., Hu, B., Schulin, R. and Günthardt-Goerg, M. S.** (2013) Nitrogen dynamics in oak model ecosystems subjected to air warming and drought on two different soils. *Plant Biology* **15**: 220-229.
- Kuzyakov, Y. and Xu, X.** (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* **198** : 656-669.
- Lajtha, K.** (1994). Nutrient uptake in eastern deciduous tree seedlings. *Plant and Soil* **160**: 193-199.
- Leuschner, C., Hertel, D., Coners, H. and Büttner, V.** (2001). Root competition between beech and oak: a hypothesis. *Oecologia* **126**: 276-284.

Löf, M. (2000). Establishment and growth in seedlings of *Fagus sylvatica* and *Quercus robur*: influence of interference from herbaceous vegetation. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **30**: 855-864.

Löf, M. and Welander, N. T. (2004). Influence of herbaceous competitors on early growth in direct seeded *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. *Annals of Forest Science* **61**: 781-788.

Mäck, G. and Tischner, R. (1994). Constitutive and inducible net NH₄⁺ uptake of barley seedlings. *Plant Physiology* **144** : 351-357.

Mata, C., van Vemde, N., Clarkson, D. T., Martins-Loução, M. A. and Lambers, H. (1999). Influx, efflux and net uptake of nitrate on *Quercus suber* seedlings. *Plant and Soil* **221**: 25-32.

Nacry, P., Bouguyon, E. and Gojon, A. (2013). Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil* **370**: 1-29.

Rennenberg, H., Dannenmann, M., Gessler, A., Kreuzwieser, J., Simon, J. and Papen, H. (2009). Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. *Plant Biology* **11**: 4-23.

Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, T. W. (1990). Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. *Plant Physiology* **93**: 1426–1432.

Son, Y. and Lee, I. K. (1997). Soil nitrogen mineralization in adjacent stands of larch, pine and oak in central Korea. *Annales Des Sciences Forestieres* **54**: 1-8.

Timbal, J., Gelpe, J., Garbaye, J. and Courrier, G (1990). Etude préliminaire sur l'effet dépressif de la molinie (*Molinia caerulea*) sur la croissance et l'état mycorhizien de semis de chêne rouge (*Quercus rubra*). *Annales des sciences forestières* **47**: 643-649.

Wang, M. Y., Siddiqi, M. Y., Ruth, J.J. and Glass, A.D.M. (1993). Ammonium uptake by rice roots. *Plant Physiology* **103**: 1259-1267.

Warren, C. R. and Adams, P. R. (2007). Uptake of nitrate, ammonium and glycine by plants of Tasmanian wet eucalypt forests. *Tree Physiology* **27**: 413-419.

Zerihun, A. and BarririRad, H. (2001). Interspecies variation in nitrogen uptake kinetic responses of temperate forest species to elevated CO₂: potential causes and consequences. *Global Change Biology* **7**: 211-222.

Sites internet :

Observatoire Forêt Bois France [en ligne] < <http://observatoire.franceboisforet.com> > (consultation le 28/05/2015).

EUFROGEN [en ligne] <<http://www.euforgen.org/distribution-maps>> (consultation le 04/08/2015)

Organisme France Bois Forêt, Les chiffres clés de la forêt privée édition 2015 [en ligne] <<http://www.foretpriveefrancaise.com/les-chiffres-cles-de-la-foret-privee-163139.html>> (consultation le 04/08/2015)

Annexes

Annexe 1 : Photographie du dispositif en serre. Les filets disposés sur certaines zones de plantations servent d'ombrières. Dans les expérimentations de ce rapport, seules les plantes placées sous lumière normale ont été utilisées. UMR INRA PIAF Clermont-Ferrand – Site de Crouël.



Annexe 2 : Photographies du dispositif en chambre de culture. La cuve (au-dessus) contient des molinies acclimatées à la solution hydroponique (maintenues par une plaque de polystyrène). Les béciers (en-dessous) contiennent les chênes acclimatés 6 par 6 à différentes concentrations de nitrate ou d'ammonium. Il y a 4 bulleurs pour oxygéner la cuve et 1 bulleur par bécier. UMR UBP PIAF Clermont-Ferrand.



Annexe 3 : Localisation de Paray-le-Fresil (latitude : 46.6556 et longitude : 3.61083) en France (Allier). La molinie bleue (*Molinia caerulea* (L.) Moench) a été prélevée dans un des domaine forestier privé de cette zone géographique.



Annexe 4 : Principe de l'analyse de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ par couplage analyseur élémentaire, analyseur de gaz et spectromètre de masse à ratio isotopique (EA/GA-IRMS - Carlo Erba, Elementar, Finnigan, Isoprime). UMR INRA EEF (Ecologie et Ecophysiologie Forestière) Nancy Champenoux.

Les échantillons, sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des capsules en étain de 4 mm de diamètre et de 6 mm de hauteur de façon à injecter 80 à 100 μg d'azote dans le spectromètre de masse. La masse précise de l'échantillon est alors notée à $\pm 1 \mu\text{g}$. Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans un injecteur en tête de la colonne de combustion. Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu en tête de colonne d'oxydation (Cr_2O_3 et oxyde de cuivre à une température de 1000°C). Une élévation de température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme de N_2 , CO_2 , H_2O et d'oxydes d'azote. La réduction de ces derniers en N_2 est alors assurée par un passage sur une colonne de cuivre métallique à 600°C (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du CO_2 est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du "carbosorb"(PDZ Europa).

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

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

Annexe 5 : Photographie du système racinaire de la molinie (en haut) et du chêne (en bas) placés en vermiculite. La photographie a été prise le 9 juillet. Le chêne a été mis à germer le 19 mars, tandis que la molinie provenant du domaine forestier de Paray-le-Fresil a été transférée le 12 juin. Ses racines mesuraient alors 1 cm.

