Analysis and modeling of the use of nitrate in connection with its availability and growth. Case of study in tomato (Solanum lycopersicium)

Ruth Huanosto-Magaña

▶ **To cite this version:**

Ruth Huanosto-Magaña. Analysis and modeling of the use of nitrate in connection with its availability and growth. Case of study in tomato (Solanum lycopersicium). Sciences of the Universe [physics]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0055 . pastel-00004242

HAL Id: pastel-00004242
https://pastel.hal.science/pastel-00004242

Submitted on 27 Mar 2009

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.

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)

SPÉCIALITÉ : Agronomie

présentée et soutenue publiquement par

Ruth HUANOSTO MAGAÑA

Le 6 Octobre 2008

Analyse et modélisation de l'utilisation du nitrate en lien avec sa disponibilité et la croissance. Étude de cas chez la tomate (*Solanum Lycopersicum* L.)

Directeur de thèse : M. Stéphane ADAMOWICZ
Co-Directeur de thèse : M. Loïc PAGES
Travail réalisé : INRA d'Avignon, N°codique 1115 Laboratoire Plantes et Systèmes Horticoles, F-84000,Avignon

Devant le jury :

M.	Raùl CARDENAS NAVARRO	Professeur, IIAF-UMSNH, Morelia, Mexique	Rapporteur
M.	Gilles LEMAIRE	Directeur de Recherche, INRA-UEPF, Lusignan	Rapporteur
M.	Bertrand NEY	Professeur, Agro Paris Tech, Paris	Examinateur
M.	Paul ROBIN	Directeur de Recherche, LER-UL2, Lyon	Examinateur
M.	Stéphane ADAMOWICZ	Chargé de recherches, INRA-PSH, Avignon	Directeur de thèse
M.	Loïc PAGES	Directeur de recherches, INRA-PSH, Avignon	Co-Directeur de thèse

Unité Plantes et Systèmes de culture Horticoles (PSH)

Dedicatoria

A Mi Madre y a Mi Padre con amor.

Aqui esta una parte de su obra...

Remerciements

Este trabajo que se concreta hoy con una memoria de tesis, ha sido el resultado de una gran aventura llena de altos y bajos, en la cual innumerables actores han influenciado su trayectoria. A esas personas que de manera anónima y discreta (o no tanto) han trabajado atrás de los telones, quiero agradecerles enormemente.

En primer lugar agradezco al gobierno Mexicano el financiamiento otorgado a través de CONACYT. A la unidad de « Ecophisologie et Horticulture » que me acogió en el seno del equipo de « Systèmes de Culture Hors Sol », del Institut National de Recherche Agronomique de Avignon, y que me brindo durante todo lo largo de mi investigación un segundo techo y una segunda familia. Gracias a Stéphane Adamowicz y Loïc Pages que aceptaron la dirección y co-dirección de esta tesis, así como a los respetables miembros de jurado que aceptaron la responsabilidad de la evaluación de este trabajo : M. Raúl CARDENAS NAVARRO y M. Gilles LEMAIRE (Rapporteurs), M. Bertrand NEY y M. Paul ROBIN (Examinateurs).

Mención especial a los instigadores de esta aventura, que tuvieron fe en mi, Dr. Raúl Cardenas Navarro, y Dra. Ercelia Angel Palomares.

Agradezco infinitamente mis amigos y compañeros de trabajo con los cuales compartimos a lo largo de las experiencias de campo y cosechas, momentos inolvidables que me enseñaron la importancia de un trabajo en equipo y sobretodo la importancia de la amistad, así Stéphane Adamowicz, Jaques Le Bot, José Fabre, Valerie Serra, Josiane Hostalerie, mil gracias por los momentos de buen humor, los pasteles (en especial el de chocolate de José y los preparados por Valerie, deliciosos !), las pizzas, las charlas de sobremesa, etc.

Así mismo al equipo de laboratorio, que junto con el buen humor y el rigor del trabajo, desembocaron a las bases solidas de esta ardua experiencia. Gracias Doriane Bancel, Vicky Diakou, Laurent Gomez, y especialmente a Emilie Rubio por trasmitirme tu alegría de vivir y por el apoyo inmenso que me proporcionaste. A Ghislain Sevenier por su cooperación generosa a través de los análisis de cloruros y sulfatos de mis muestras.

A los sabios consejos en estadística y en « R » dados por Claude Bruchou, Loïc Pages, Gilles Vercambre, Magali Willaume, Caroline Gibert.

A aquellos con los cuales compartí aparte del trabajo la « pause cafétte », el deporte, la danza, el arte, llenaron de riquezas mi espíritu, y me mostraron que había una vida aparte del INRA, Carolina, Claire, Magalie, Fred, Nicolas, Delphine, Jean Philipe, Patricia, Cristine, Dao, Pedro, Emilo, David.

Quiero agradecer de manera especial a toda la unidad que lejos de ser indiferentes

a mi pena, fueron solidarios y me ayudaron a salir adelante con sus continuas motivaciones y palabras de aliento en momentos difíciles.

Quiero expresar mi gratitud en especial a mi familia, ami Papa, mi Mama (en donde estés) y mi Hermano quienes nunca me han dejado sola y han sido actores constantes en esta aventura. A mi tío Juan que con sus continuas llamadas llena mi vida de aromas lejanos, a mis abuelas Ruth y Susa que siempre están al pendiente de mis aventuras. En fin, la familia es grande y a todos les agradezco todo el apoyo y el interés que han puesto en mi, haciéndome llegar su amor a través de los diferentes emisarios.

A Sylvain LEGER que se a convertido en el motor incondicional que alimenta mi moral a cada paso que doy, quien me apoya y ayuda en el día a día.

UN GRAND MERCI a Paty y Juan Manuel, quienes lejos de una simple amistad se han convertido en parte de mi familia, gracias por toda su ayuda fundamental a la causa. Que habría hecho yo sin sus cursos de latex ?, de cocina ?, de informática ?, de burocracia francesa ? ! ! !, sin las agradables charlas de sobre mesa ?... Todo este tiempo compartido ha enriquecido mi alma, gracias por apoyarme en todo, que el hogar que le han proporcionado a esta isla flotante no tiene precio !.

Y por ultimo, pero no menos importante, quiero agradecer especialmente a Carolina Gibert y Claire Amiraux quienes no han dejado de sostenerme, muchas gracias por su amistad.

Table des matières

1 Introduction **9**
- 1.1 Gestion des ressources dans le nycthémère . . . 10
- 1.2 Assimilation du nitrate . . . 14
  - 1.2.1 Ressource carbonée . . . 15
  - 1.2.2 Ressource Nitrique . . . 15
  - 1.2.3 Activités enzymatiques et flux d'assimilation . . . 19
- 1.3 Utilisation de l'azote aminé pour la croissance . . . 22
- 1.4 Méthodes de mesure de la réduction du Nitrate . . . 23
- 1.5 Objectif . . . 24

2 N nutrition effects on short-term growth and on C and N status **27**
- 2.1 Introduction . . . 27
- 2.2 Materials and methods . . . 28
  - 2.2.1 Plant material and growth conditions . . . 28
  - 2.2.2 Experiments . . . 29
  - 2.2.3 Plant analyses . . . 29
  - 2.2.4 Gas exchange measurements . . . 30
  - 2.2.5 Data processing . . . 31
- 2.3 Results . . . 31
  - 2.3.1 Dry biomass accumulation . . . 31
  - 2.3.2 Resources . . . 35
- 2.4 Discussion . . . 44

3 Growth model **47**
- 3.1 Introduction . . . 47
- 3.2 Materials and methods . . . 48
  - 3.2.1 Plant material and growth conditions . . . 48
  - 3.2.2 Experiments . . . 49
  - 3.2.3 Plant analyses . . . 49
  - 3.2.4 Data processing . . . 50
- 3.3 The model . . . 51
- 3.4 Results and discussion . . . 53
  - 3.4.1 Correlation between resources . . . 53
  - 3.4.2 Accumulation of structural nitrogen . . . 53
  - 3.4.3 Parameter optimization and simulations . . . 56
- 3.5 Conclusion . . . 59

4 Modélisation de la réduction du nitrate **65**
- 4.1 Introduction . . . 65

4.2 Matériel et méthodes . . . 67
4.2.1 Mesure de l'absorption du nitrate . . . 68
4.2.2 Mesure de la vitesse de réduction du nitrate . . . 69
4.2.3 Mesure de la transpiration . . . 69
4.2.4 Calculs . . . 70
4.3 Les modèles . . . 70
4.3.1 Réduction du nitrate . . . 70
4.3.2 Transfert du nitrate entre compartiments . . . 71
4.3.3 Changements d'état . . . 73
4.3.4 Valeurs de départ des paramètres . . . 75
4.4 Résultats et discussion . . . 76
4.4.1 Absorption et réduction du nitrate . . . 76
4.4.2 Modèle à compartimentation conceptuelle . . . 79
4.4.3 Modèle à compartimentation en classes d'organes . . . 84
4.5 Conclusions . . . 89

5 Discussion générale et perspectives **93**
5.1 Données expérimentales . . . 93
5.2 Modélisation . . . 96

6 Annexes **99**
6.1 Activité respiratoire et teneur en Carbone . . . 99
6.2 Dispositif de culture . . . 99
6.3 Automate de régulation des solutions nutritives . . . 100
6.4 Échantillonnage et hétérogénéité du rayonnement . . . 102
6.5 Mesures de photosynthèse . . . 105

Liste des illustrations **107**

Liste des tableaux **109**

Bibliographie **111**

Chapitre 1

Introduction

La fertilisation des cultures hors-sol est assurée par l'incorporation des sels minéraux dans l'eau d'irrigation. Dans les unités de production, la fréquence des fertirrigations est automatiquement modulée selon un modèle mathématique de calcul de l'évapotranspiration qui prend en compte en particulier le rayonnement solaire. La fertilisation dépend donc de la fréquence des irrigations et de la concentration des minéraux en solution. Cette liaison entre les apports d'eau et de minéraux est une contrainte technique. Il a paru naturel de baser la politique de fertirrigation sur les besoins en eau des cultures plutôt que sur leurs besoins en minéraux pour diverses raisons :

1. Un défaut d'irrigation se traduit très rapidement par le flétrissement de la culture, alors que les conséquences d'un manque de minéraux n'apparaissent que lentement ;
2. On dispose de modèles d'évapotranspiration simples et opérationnels à diverses échelles de temps, ce qui n'est pas le cas pour la fertilisation minérale.

De plus, en raison de la croissance des cultures, on observe, de semaines en semaines, une augmentation progressive des besoins en eau et, conjointement, en minéraux. Ceci se traduit par une bonne corrélation de l'utilisation de ces 2 ressources (Brun and Blanc, 1987; Franko *et al.*, 1995; Novak and Vidovic, 2003; Pardossi *et al.*, 2004), et a conforté cette stratégie de fertirrigation. Néanmoins, en raison du faible volume offert aux racines (inférieur à 5 litres par plant de tomate, par exemple) dans ces systèmes de culture, les irrigations peuvent nécessiter une fréquence horaire en période de jour, mais être inutiles pendant la nuit en raison de l'évapotranspiration réduite à l'obscurité. Ces fluctuations d'irrigation dans le nycthémère reflètent assez bien celles de l'évapotranspiration réelle, mais pas celles de l'absorption minérale (Triboi-Blondel, 1979) qui sont nettement moins accentuées, ce qui montre que les raisonnements élaborés à une certaine échelle ne sont pas aisément intrapolables à une autre. Conscients du caractère approximatif de cette gestion des apports de minéraux, les producteurs ont adopté de manière empirique une politique d'excès de fertirrigation (de l'ordre de 30% en volume) et forcent parfois une fertirrigation nocturne. Cette pratique assure que les minéraux ne limitent jamais la croissance de la culture, et limite les dérives de concentration de la solution au contact des racines. La sécurité qu'apporte au producteur cette politique de pléthore a une contrepartie : un coût majoré en fertilisants, et, surtout une évacuation des minéraux en excès vers le milieu, impliquée dans la pollution des nappes phréatiques par le NO_3^-, composant majoritaire des solutions nutritives. Pour améliorer cette situation, deux possibilités sont envisageables : La première concerne le développe-

ment de capteurs en ligne permettant l'analyse du nitrate en continu dans les effluents des cultures. Ils permettraient de commander *a posteriori* la concentration des minéraux dans la solution apportée afin d'éviter les manques ou les excès. Cette approche technologique de la régulation présente l'avantage de ne nécessiter que peu de connaissances sur le fonctionnement des cultures, mais se heurte cependant à la difficulté de conception d'un capteur adapté aux conditions de la production ; la seconde repose sur le développement d'un modèle écophysiologique de la nutrition des plantes qui permette de prévoir *a priori* leur consommation en fonction des conditions d'environnement et de réguler les apports d'azote, à l'instar de ce qui fait déjà pour les apports d'eau. Il apparaît donc nécessaire d'élaborer un modèle de nutrition azotée adapté à l'échelle de temps d'intervention des productions hors-sol, en cohérence avec les irrigations. L'objectif étant d'apporter les connaissances qui permettront de réduire les apports d'azote en culture intensive, une telle étude doit prendre en compte les interactions avec l'intensité de la nutrition. Dans cette section, nous récapitulerons les bases générales nécessaires à la construction d'un tel modèle.

1.1 Gestion des ressources dans le nycthémère

Pour assurer leur croissance et leur développement, les plantes puisent des ressources primaires (lumière, minéraux, eau) dans leur environnement immédiat. La disponibilité de ces ressources peut s'avérer extrêmement variable au cours du temps, ce qui impose de fortes contraintes. Ainsi, les végétaux ont dû s'adapter grâce a divers mécanismes pour préserver leur survie et, si possible, leur croissance. On distingue deux adaptations permettant de faire face aux périodes de disette. La première consiste à limiter au mieux l'usage de la ressource qui se fait rare. Par exemple, en réaction au stress hydrique, la fermeture des stomates permet d'économiser l'eau de façon immédiate. Cette stratégie est efficace, mais a pour effet secondaire de limiter l'acquisition d'autres ressources, comme le carbone atmosphérique ainsi que les minéraux du sol dont les mouvements en direction des racines et les transferts au sein de la plante sont favorisés par les flux d'eau. La seconde adaptation repose sur l'utilisation de ressources accumulées antérieurement pendant les périodes plus favorables. A l'extrême, ceci peut consister en un recyclage des ressources libérées par la dégradation de tissus, ce qui conduit à leur sénescence mais permet la croissance de parties jeunes de la plante. Cependant, cet évènement est généralement précédé par l'utilisation des ressources endogènes acquises en excès lorsqu'elles étaient abondantes dans l'environnement et encore disponibles dans les tissus. Ces réserves procurent au végétal une autonomie qui lui permet de croître avec une relative insensibilité aux fluctuations transitoires des ressources de l'environnement. Pour l'eau, par exemple, l'offre du milieu reste soumise aux caprices d'un climat variable. La lumière est cependant une ressource qui tient une place à part. Sous nos latitudes, bien que son intensité et sa durée dépendent du climat et de la saison, le rayonnement solaire est néanmoins délivré quotidiennement à la végétation. En revanche, à une échelle de temps plus fine, au sein du nycthémère, la ressource lumineuse n'est assurée que de façon intermittente par la succession du jour et de la nuit, cette dernière pouvant être considérée comme une période transitoire de carence totale. Les adaptations décrites à cette échelle de temps sont nombreuses (mouvement et réorientation des feuilles, régulation stomatique, variations d'activités enzymatiques, etc.) et semblent placées soit sous le contrôle direct de la lumière, soit sous celui d'une horloge biologique (Triboi-Blondel, 1979; Webb, 2003; McClung,

2006). L'intérêt du nycthémère comme échelle de temps est particulièrement évident pour l'acquisition du carbone, qui ne se produit que pendant la phase de jour chez les plantes à métabolisme C3 ou C4. En conséquence, l'augmentation de biomasse sèche au cours du temps, souvent utilisée comme estimateur de la croissance, prend une allure distincte selon qu'elle est observée à long ou à court terme. Dans le premier cas, c'est une fonction continue et monotone alors que dans le second, elle présente une allure en marche d'escaliers, avec une augmentation diurne proportionnelle au rayonnement intercepté, suivie d'un palier nocturne (en toute rigueur, la biomasse sèche diminue légèrement de nuit en raison des pertes respiratoires de carbone). En revanche, considérée comme une augmentation des structures végétales, la croissance paraît continue et monotone au cours du nycthémère, avec des variations bien moindres que ne le laisserait présumer les changements d'intensité de la photosynthèse. Ainsi en témoignent la respiration de croissance (McCree and Silsbury, 1978) et les augmentations des dimensions des feuilles (Walter *et al.*, 2005; Matsubara *et al.*, 2006; Wiese *et al.*, 2007), des tiges (Torre and Moe, 1998) et des racines (Iijima *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2002). En termes de modélisation, la cohérence des observations à long et court termes a été assurée en séparant les fonctions d'acquisition et d'utilisation de ressources (Thornley, 1977). La première fonction (voir figure 1.1) remplit un réservoir endogène de ressource (par exemple : la photosynthèse permet l'accumulation de sucres non-structuraux tels que l'amidon), la seconde puise dans ce réservoir pour satisfaire aux besoins des structures en cours de croissance.

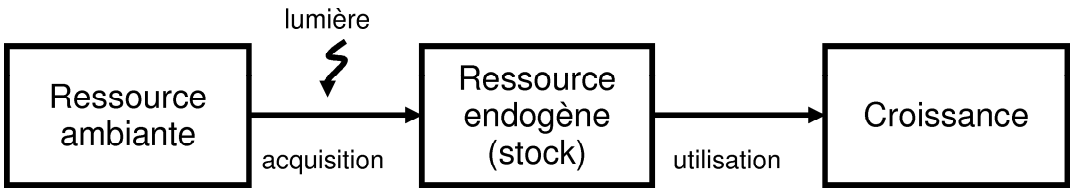


FIG. *1.1:* *Gestion des ressources : modèle carbone*

Dans cette représentation du système, le réservoir permet de désynchroniser et de découpler les fonctions d'acquisition et d'utilisation, ce qui a trois implications pour le modélisateur :

1) L'indépendance de ces deux fonctions : la première est directement déterminée par la disponibilité des ressources ambiantes (par exemple, CO_2 et lumière pour le carbone) et répond instantanément à leurs fluctuations, alors que la seconde ne varie qu'avec la disponibilité endogène des ressources (on applique généralement une relation saturable du type Michaelis-Menten) ;
2) L'identification d'un réservoir de ressources, autrement dit d'une molécule (ou catégorie de molécules) qui n'appartienne pas aux structures et dont la teneur soit suffisamment variable pour expliquer le découplage des fonctions déjà évoquées ;
3) La distinction entre la biomasse totale et la biomasse des structures (en pratique, cette dernière est estimée par la différence entre la biomasse totale et la masse des réserves).

L'acquisition du NO_3^- étant une fonction radiculaire, la pertinence du nycthémère comme échelle d'étude de la gestion de l'azote pourrait paraître injustifiée. Néanmoins, la

littérature abonde pour montrer que la vitesse d'absorption du NO_3^- fluctue fortement pendant le nycthémère (Triboi-Blondel, 1979; Abrol *et al.*, 1983; Delhon *et al.*, 1995; Goutouly and Habib, 1996; Cardenas-Navarro *et al.*, 1998; Lejay *et al.*, 1999), et se stabilise en conditions d'éclairement (Goutouly and Habib, 1996; Delhon *et al.*, 1995) ou d'obscurité continues (Peuke and Jeschke, 1998; Cardenas-Navarro *et al.*, 1998). Par ailleurs, chez de nombreuses espèces végétales, l'azote nitrique endogène représente une proportion importante de l'azote total (jusqu'à 40%), suffisante pour assurer au moins l'équivalent d'une journée de croissance. Enfin, on constate que la teneur en NO_3^- endogène fluctue aussi fortement dans le nycthémère. Le stock de nitrate de ces plantes découple donc indéniablement son absorption de son utilisation, et il est tentant de modéliser séparément ces deux flux. Une adaptation du schéma montré dans la figure 1.1 est cependant nécessaire en raison d'une différence importante entre les voies du carbone et de l'azote : le flux qui dépend de l'énergie lumineuse est celui d'acquisition pour le carbone (figure 1.1), alors que c'est celui d'utilisation pour le nitrate (figure 1.2).

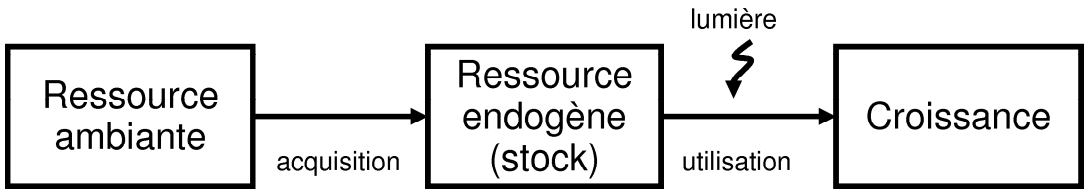


FIG. 1.2: *Gestion des ressources : modèle azote*

En effet, l'étude des voies métaboliques a montré que, dans les feuilles, plusieurs étapes d'utilisation du nitrate (réduction du nitrite et synthèse de plusieurs acides aminés) sont chloroplastiques et utilisent directement l'énergie et le pouvoir réducteur produits par les photosystèmes. Ainsi, la représentation de la figure 1.2 est sous-jacente à certains modèles d'absorption du NO_3^- qui formalisent ce flux uniquement en fonction de son stock endogène (Scaife, 1989; Cardenas-Navarro *et al.*, 1998) et de la concentration de l'ion dans l'environnement radiculaire (Cardenas-Navarro *et al.*, 1998). Moyennant une hypothèse simple sur le flux d'utilisation du nitrate endogène, i.e. purement photosynthétique (donc nul la nuit), les simulations générées par ces modèles sont conformes à deux propriétés des oscillations nycthémérales de l'absorption du nitrate en solution nutritive (Scaife, 1989; Adamowicz and Le Bot, 1999) :

1) Les fluctuations de l'absorption du NO_3^- sont atténuées par rapport à celles du rayonnement, comme l'attestent les données de la littérature (Clement *et al.*, 1978; Triboi-Blondel, 1979) qui montrent qu'en effet l'absorption nocturne ne chute que de 30 à 60% alors que le rayonnement est devenu nul ;

2) En conditions d'éclairement naturel, la vitesse maximale d'absorption présente un retard sur le pic de rayonnement, qui peut atteindre plusieurs heures(Scaife, 1989; Macduff *et al.*, 1997).

La représentation de la figure 1.2 apporte donc une réponse relativement satisfaisante aux relations entre l'absorption d'azote et l'environnement lumineux, mais s'avère, en revanche, incompatible avec les modèles de croissance à base de carbone, fondés sur la figure 1.1. Ces derniers ont, en effet, été développés pour rendre la croissance relativement insensible aux fluctuations immédiates de l'intensité du rayonnement, alors que la représentation de la figure 1.2 implique le contraire en générant une vitesse de

croissance nulle en période nocturne. Pour résoudre ce dilemme, deux solutions, non exclusives, s'offrent à nous : l'une porte sur une modification de la structure du modèle, l'autre sur l'abandon de l'hypothèse d'une utilisation purement photosynthétique du nitrate (voir section 1.2.3).

Un modèle de gestion de l'azote peut en effet être proposé pour conserver les qualités respectives des figures 1.1 et 1.2, en introduisant un compartiment supplémentaire de ressources endogènes d'azote (voir figure 1.3). Dans cette représentation, l'énergie lumineuse n'est nécessaire qu'à la transformation d'une ressource endogène à l'état brut en une forme plus élaborée. Grâce à cela, les fonctions d'acquisition, d'une part, et d'utilisation pour la croissance d'autre part, ne sont plus sous le contrôle direct des fonctions photosynthétiques. Autrement dit, l'absorption et la croissance ne doivent répondre que lentement aux variations instantanées de rayonnement.

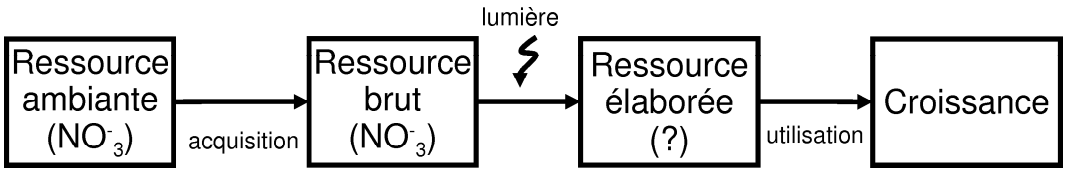


FIG. 1.3: *Gestion des ressources : modèle azote avec un compartiment supplémentaire de ressources endogènes d'azote*

Sur le plan des mécanismes, la proposition évoquée ne semble pas infondée. En effet, l'assimilation du NO_3^- se décompose en plusieurs étapes (voir figure 1.4) qui produisent une série de composés azotés non structuraux : réductions successives du NO_3^- en NO_2^- et du NO_2^- en NH_4^+ ; incorporation de NH_4^+ dans des acides carboxyliques pour former les acides aminés libres à la source d'une large gamme de composés structuraux (protéines, acides nucléiques, etc.).

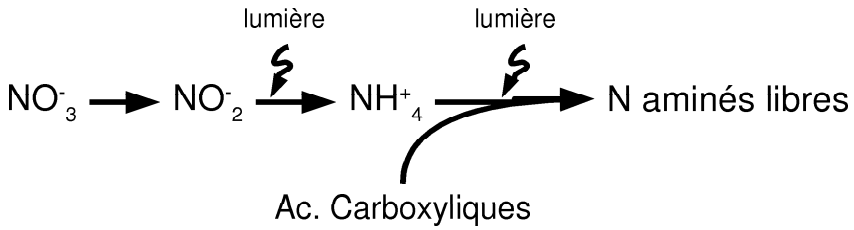


FIG. 1.4: *Métabolisme du NO_3^-*

Le NO_2^-, toxique pour la plante, ne s'observe qu'à des teneurs très faibles chez la plante saine (Kaiser and Huber, 2001) et ne saurait être considéré comme un réservoir d'azote significatif. Sa synthèse, localisée dans le cytoplasme, ne fait pas intervenir directement l'énergie lumineuse. Par conséquent, on pourrait tout au plus réunir le NO_2^- et le NO_3^- dans un même compartiment, celui des ressources brutes. En revanche, dans les feuilles, les synthèses chloroplastiques de NH_4^+, de la glutamine et divers autres acides aminés impliquent directement l'utilisation de l'ATP et du pouvoir réducteur fournis par les photosystèmes. Peu de données publiées permettent de quantifier la réserve d'azote que représentent ces composés en comparaison du nitrate, surtout à l'échelle de la plante entière, mais celles qui sont disponibles indiquent que, individuellement, aucun d'eux n'apporte d'azote à des niveaux comparables à celui du NO_3^-.

Néanmoins, dans les feuilles, il semble que le NH_4^+ et les acides aminés libres considérés collectivement représentent un *pool* d'azote du même ordre de grandeur que le nitrate (Stitt and Schulze, 1994). De plus, dans cet organe, des fluctuations nycthémérales prononcées sont observées pour le NH_4^+ et plusieurs acides aminés, avec un enrichissement diurne et un appauvrissement nocturne comparables aux observations effectuées pour les hydrates de carbone non structuraux. Nous pouvons donc proposer un modèle de gestion de l'azote avec deux compartiments de ressources azotées, le premier contenant le nitrate (et, anecdotiquement, le nitrite), et le second contenant l'ensemble des acides aminés libres et NH_4^+. Une observation sur du ray-grass cultivé en système hydroponique sous serre (Macduff *et al.*, 1997) pourrait venir à l'appui de cette décomposition en deux *pools* azotés. Ces auteurs ont en effet constaté que les flux d'absorption de NO_3^- et NH_4^+ en solution nutritive présentent chacun un pic en retard sur celui du rayonnement, de 5.1 et 2.9 heures, respectivement. Dans notre représentation du système, ceci implique que :

1) Le NO_3^- et le NH_4^+ n'appartiennent pas au même *pool* de ressources et que
2) La quantité de réserves azotées interposées entre l'absorption et la croissance est nettement plus grande pour NO_3^- que pour NH_4^+.

L'ampleur du décalage observé pour l'absorption du NO_3^- confirme l'importance de cet ion en tant que réserve d'azote. De plus, bien que le retard soit plus faible pour le NH_4^+, sa valeur d'environ 3 heures reste notable et révèle bien l'existence d'un second réservoir d'azote, en aval du nitrate, et tout à fait significatif.

Le modèle proposé dans la figure 1.3 a le potentiel de rendre cohérentes les relations entre rayonnement, croissance et acquisition d'azote à plusieurs échelles de temps, tout en restant compatible avec les modèles de carbone (figure 1.1). Néanmoins, il présente une complexité supérieure en nécessitant la formalisation de 3 flux : ceux d'absorption du NO_3^-, de sa réduction et enfin, d'utilisation d'azote pour la croissance.

Le premier, l'absorption du NO_3^-, a déjà fait l'objet de modélisations compatibles avec notre représentation (figure 1.3), c'est à dire indépendantes de la réduction du NO_3^-, mais dépendantes de la concentration du NO_3^- dans le milieu racinaire d'une part(Cardenas-Navarro *et al.*, 1998), et dans la plante (Scaife, 1989; Cardenas-Navarro *et al.*, 1998), d'autre part. Nous ne reviendrons pas dessus. En revanche, ni la réduction du NO_3^- endogène en ressources élaborées, d'une part, ni la croissance en fonction de l'azote aminé libre endogène, d'autre part, n'ont, à notre connaissance, été étudiés à l'échelle de la plante et à court pas de temps dans une optique de modélisation.

1.2 Assimilation du nitrate

Le processus d'assimilation se décompose en une série d'étapes qui dépendent de la disponibilité de diverses ressources sur les sites enzymatiques et des activités enzymatiques elles-mêmes (figure 1.5). Globalement, l'assimilation d'un ion NO_3^- est essentiellement une oxydo-réduction qui nécessite la fourniture de 10 électrons, d'une molécule d'ATP, d'un radical à 5 atomes de carbone (le 2-oxoglutarate), et bien sûr, du nitrate lui-même. Nous examinerons ici les relations entre l'assimilation et ces ressources en mettant l'accent sur les questions que posent leurs répartitions respectives.

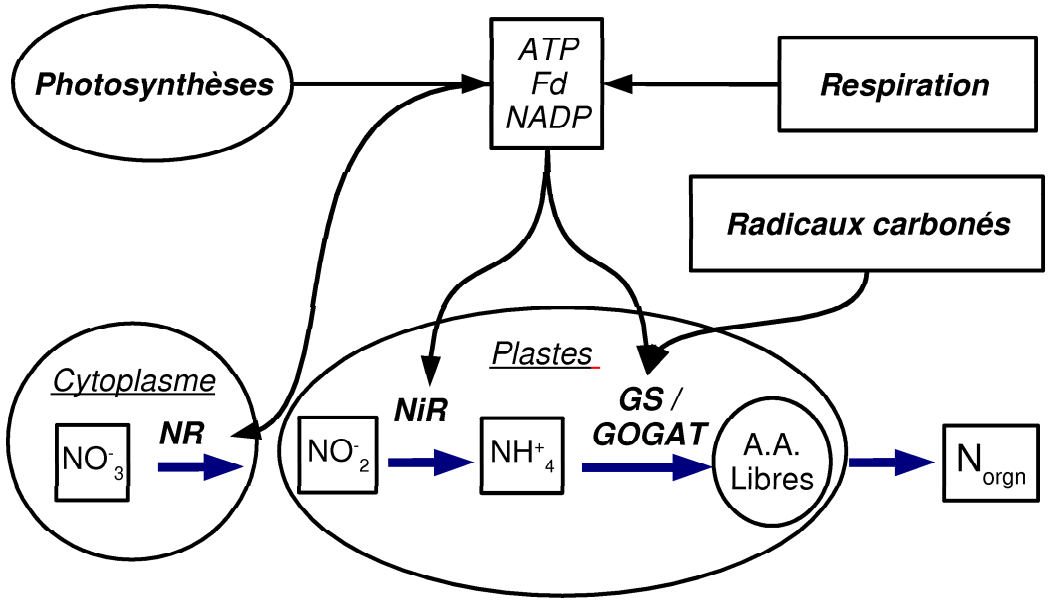


FIG. 1.5: *Métabolisme du NO_3^- à l'échelle cellulaire*

1.2.1 Ressource carbonée

L'oxoglutarate semble omniprésent dans la cellule, on le trouve dans le cytoplasme, la mitochondrie où il est produit par le cycle des acides tricarboxyliques, le péroxysome qui le produit aussi, et le chloroplaste. La question se pose de figurer explicitement cet acide au côté du nitrate, comme substrats dont dépend le flux d'assimilation. La teneur de l'oxoglutarate étant très faible dans les tissus végétaux, de l'ordre du μmolaire (Schneidereit *et al.*, 2006), cet acide représente un réservoir de carbone négligeable. A notre échelle de modélisation, nous lui préfèrerons donc ceux de ses précurseurs dans la chaîne métabolique qui sont susceptibles d'accumulations importantes et variables à l'échelle de temps considérée. En amont de l'oxoglutarate, on note deux acides carboxyliques dont les concentrations sont de l'ordre du millimolaire, le citrate et le malate. Plus amont encore dans la glycolyse, les sucres solubles non structuraux, glucose, fructose et saccharose sont dans la même gamme. Enfin, de tous les précurseurs, l'amidon contient les plus fortes réserves de carbone, du moins dans les feuilles. Par ailleurs, tous ces composés présentent de nettes variations nycthémérales (Müller *et al.*, 2001; Matt *et al.*, 2001b,a; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002) et des relations entre leurs teneurs et la nutrition azotée ont été établies (Kirkby and Mengel, 1967; Touraine *et al.*, 1988; Urbanczyk-Wochniak and Fernie, 2005). Pour les nécessités de la modélisation, la question reste donc posée de décider du choix de l'un de ces composés, ou, au contraire, d'en globaliser plusieurs en tant qu'entrées de carbone dans le système, ce qui ne pourra se faire que sur la base de données expérimentales.

1.2.2 Ressource Nitrique

Le nitrate est sans doute omniprésent dans la cellule, mais la question de sa disponibilité pour la nitrate réductase (NR) a été posée à la suite d'expériences sur des cultures cellulaires (Ferrari *et al.*, 1973) puis sur des feuilles (Adamowicz, 1980) qui in-

diquaient que seule une faible fraction du nitrate cellulaire était facilement réduite par la NR, alors que la plus grande partie n'était que lentement assimilable. Le premier compartiment, dit « métabolique », représenterait la fraction du nitrate présente sur le site même de la NR, le cytoplasme. Le second, dit « de stockage », représenterait le contenu de la vacuole. Il importe de déterminer si la concentration du compartiment métabolique est régulée par un flux venant du stock (Robin *et al.*, 1983) mais les nombreuses techniques expérimentales mises en œuvre pour répondre à cette question (pour revue, Siddiqi and Glass (2002)) ont produit des résultats contradictoires et font l'objet de débats (Britto and Kronzucker, 2003). Cette notion de stockage cellulaire impliquerait que le nitrate exogène (*i.e.* venant de la sève xylémienne) est plus accessible aux systèmes d'assimilation que le nitrate vacuolaire. Des mesures d'activité NR *in vitro* (Shaner and Boyer, 1976) ou *in situ* sur des feuilles excisées dont les pétioles trempent dans des solutions plus ou moins concentrées en nitrate semblent en effet aller dans ce sens. Néanmoins, des expériences similaires utilisant le ^{15}N pour quantifier séparément les flux de réduction d'ion exogène et endogène, indiquent au contraire que les systèmes d'assimilation ne « distinguent » pas l'origine du nitrate (Gojon *et al.*, 1991b).

Au niveau macroscopique aussi, le nitrate se trouve compartimenté dans la plante. Ainsi, Cardenas-Navarro *et al.* (1998, 1999b) notent que la tige de tomate contient 60% du NO_3^- de la plante, avec une concentration 5 et 1,5 fois plus forte que dans les limbes et les racines, respectivement. Cette plus grande richesse de la tige (et des pétioles) revêt un caractère de généralité parmi les espèces végétales (Maynard *et al.*, 1976; Ostrem and Collins, 1983). Comme à l'échelle cellulaire, la compartimentation pose la question de la distribution relative du nitrate et des systèmes d'assimilation dans la plante entière (voir section activités enzymatiques). Si l'on admettait que le nitrate n'était assimilé que dans les limbes et les racines, le nitrate de ces organes pourrait, à l'instar de l'échelle cellulaire, être qualifié de métabolique, alors que celui des tiges serait qualifié de stockage. La question du caractère limitant ou non (vis-à-vis de l'assimilation) du transport entre compartiments se pose donc aussi. Il est clair que tout le nitrate parvient dans les limbes par la sève, et que *in fine* l'assimilation dépend nécessairement du flux xylémien. Diverses données obtenues en manipulant le flux xylémien de feuilles excisées en ont donné une illustration expérimentale (Shaner and Boyer, 1976; Robin *et al.*, 1983; Gojon *et al.*, 1991b) mais n'apportent pas de réponse à la question de l'existence d'une limitation de la réduction par les flux de transfert entre organes chez la plante intègre.

Les mécanismes et régulations des fonctions d'import-export, *i.e.* la charge et/ou la décharge de la sève xylémienne, sont mal connus et font l'objet de débats (Clarkson, 1993; Miller and Smith, 1996). Il semble admis qu'ils dépendent de transporteurs membranaires, mais le caractère actif ou passif du transport et les aspects cinétiques restent de l'ordre de la spéculation. En revanche, la direction des flux entre organes semble acquise, et il est admis que le nitrate est transporté exclusivement dans le xylème de façon ascendante (Peuke and Jeschke, 1993), des racines aux limbes en passant par les tiges et les pétioles. Ce manque d'information sur les déterminants de la translocation du nitrate est sans doute imputable aux difficultés de mesure à petit pas de temps. L'accumulation de ^{15}N dans les parties aériennes après exposition des racines à du nitrate marqué, permet tout au plus d'estimer la translocation nette (xylémienne - phloémienne) de l'azote total (nitrique et organique). On a ainsi mis en évidence des cycles nycthéméraux de la translocation d'azote, plus intense de jour que de nuit (Pearson *et al.*, 1981; Ourry *et al.*, 1996), sans doute explicables par les cycles concomitants de la vitesse

d'absorption. Gojon *et al.* (1986) ont mis au point un protocole expérimental avec marquage ^{15}N qui permet de quantifier séparément les flux xylémiens et phloémiens, ainsi que les flux de nitrate et d'azote réduit. Cette méthodologie a, entre autres, permis de confirmer que la translocation xylémienne du nitrate est nettement plus intense pendant l'héméropériode (Delhon *et al.*, 1995). Cependant, l'utilisation obligatoire d'une nutrition ammoniaco-nitrique, de durées de marquage relativement longues, et l'incapacité à distinguer les feuilles des tiges limitent la portée de ce protocole. En général, la translocation du nitrate (et d'autres ions) n'est pas mesurée, mais calculée comme étant le produit du flux d'eau transpiratoire par la concentration du nitrate dans la sève (Shaner and Boyer, 1976; Lorenz, 1976; Peuke *et al.*, 2001; Macduff and Bakken, 2003). Le flux d'eau est mesuré directement à partir des échanges gazeux au niveau des feuilles ou de la perte de masse de la solution nutritive (Brewitz *et al.*, 1996; Ourry *et al.*, 1996; Pedersen and Sand-Jensen, 1997; Herdel *et al.*, 2001), ou encore calculé à partir de la vitesse de déplacement d'eau dans le xylème telle que mesurée par des capteurs de flux de sève (Guérin *et al.*, 2007) ou par RMN (Résonnance magnétique nucléaire) (Peuke *et al.*, 2001). On peut ainsi aborder des pas de temps fins (de quelques secondes à quelques heures). En revanche, la détermination de la composition de la sève est beaucoup plus problématique. La plupart des études se reposent sur l'analyse des exsudats xylémiens de plants décapités (Shaner and Boyer, 1976; Peuke and Jeschke, 1993; Peuke *et al.*, 2001; Guérin *et al.*, 2007). On a ainsi constaté que leur teneur en nitrate augmente avec la concentration de l'ion en solution nutritive (Oscarson and Larsson, 1986; Sivasankar *et al.*, 1997) et diminue lorsque l'intensité transpiratoire augmente (Shaner and Boyer, 1976), ce qui se traduit par des cycles nycthéméraux de la concentration de la sève (Keltjens and Nijenstein, 1987; Peuke *et al.*, 2001; Thornton and Macduff, 2002; Macduff and Bakken, 2003). Néanmoins, la représentativité des exsudats repose sur l'hypothèse forte que la décapitation ne modifie pas la composition de la sève. En effet, les premières gouttes d'exsudats sont généralement éliminées parce qu'elle sont contaminées par les tissus blessés et, considérant le volume infime des vaisseaux conducteurs, la sève finalement collectée a été nécessairement synthétisée postérieurement à la décapitation. Hors, cette dernière a deux conséquences dont il est légitime de penser qu'elles modifient la composition de la sève : d'une part, la vitesse d'absorption du nitrate chute rapidement (Wild *et al.*, 1987; Thornton and Macduff, 2002) ; d'autre part, l'absorption d'eau par les racines s'effondre instantanément (Chapin III *et al.*, 1998). Pour ces raisons, d'autres techniques aux effets supposés moins drastiques ont été proposées pour caractériser la composition de la sève xylémienne de plants intacts. Ainsi, l'utilisation d'insectes piqueurs est d'un usage déjà ancien, surtout pour extraire de la sève phloémienne, mais peut s'appliquer aussi au xylème en choisissant l'insecte au régime alimentaire convenable. A cet effet, Malone and Herron (2002) utilisent une cicadelle (*Philaenus spumarius*) dont ils affirment que les déjections ont la même composition et concentration en minéraux que la sève xylémienne. Herdel *et al.* (2001) prélèvent la sève xylémienne par une incision faite sur un pétiole ou une veine foliaire. A ce niveau de la plante, la sève est en dépression et n'exsude que si on applique une surpression dans l'environnement racinaire. A cette fin, les auteurs ont adapté une chambre à pression, dans laquelle les racines résident en permanence avec du sol ou de la solution nutritive pendant la croissance des plantes. Ceci leur permet de collecter ponctuellement de la sève au niveau de l'incision en appliquant une surpression temporaire aux racines. Ces deux dernières techniques diffèrent de la décapitation par trois aspects : elles ne sont pas destructives et se prêtent au suivi continu sur une même plante, elles ne prélèvent que de très faibles volumes de sève (environ 10 microlitres) dont on peut conjecturer qu'ils perturbent peu

les flux normaux, et, enfin, elles extraient de la sève à proximité des limbes au lieu de la base de la tige. Ces deux articles ont, cependant, produit des résultats contradictoires sur le caractère cyclique de la concentration du nitrate dans la sève, et on manque de recul pour en imputer la responsabilité à la méthodologie de collecte de sève même, ou aux conditions d'environnement des plantes, particulières à ces expérimentations.

En termes de modélisation, une variété de formalismes simples qui sous-entendent un transport passif ont été proposés. Ainsi Bijlsma et collaborateurs (Bijlsma and Lambers, 2000) modélisent le transport du nitrate comme simplement proportionnel à sa concentration racinaire, autrement dit indépendant de la demande des parties aériennes. En revanche, Thornley (Thornley, 1972, 1976; Thornley and Johnson, 1976) introduit une formulation, simplement proportionnelle au gradient de concentration entre racines et parties aériennes, qui fait donc apparaître à la fois l'offre (la concentration dans les racines) et un reflet de la demande (la concentration dans les parties aériennes). Dans le même esprit, le modèle de Lim *et al.* (1990) formalise la translocation comme proportionnelle à la concentration racinaire et à la demande aérienne, cette dernière étant calculée comme le produit de la vitesse de croissance par la teneur en azote total. Le transport xylémien des solutés étant porté par le flux massique d'eau (Mengel and Kirkby, 1987), la question se pose de faire figurer explicitement la transpiration dans les modèles de translocation. Deux points de vue s'opposent : le flux transpiratoire est nécessaire pour évacuer les ions des racines vers les parties aériennes, ou, au contraire, même en l'absence de transpiration, il existe un flux d'eau xylémien égal au flux phloémien, suffisant pour assurer le transfert des ions à longue distance. Sur le plan mécaniste, cette question est loin d'être tranchée, et on a essayé d'y répondre indirectement au travers d'expériences à long terme. Tanner and Beevers (1990) n'ont pas trouvé de différence dans la croissance de maïs cultivés à humidité moyenne (50-60%) ou forte (> 95%), et ont conclu à l'insensibilité du transport des ions au flux transpiratoire. Cependant, l'intensité de la transpiration était loin de la nullité dans la condition humide et n'avait diminué que d'un facteur 3 en comparaison de l'humidité témoin. Pour parer à ces critiques, Pedersen and Sand-Jensen (1997) ont comparé la croissance de plants amphibies (*Mentha aquatica*) cultivés en condition aérienne (humidité 60-70 %) ou submergée, et sous forte concentration en dioxyde de carbone afin que les performances de la photosynthèse ne biaisent pas l'expérience. Les flux d'eau acropètes furent environ dix fois plus faibles (mais non nuls) chez les plants submergés, sans incidence sur leur vitesse relative de croissance. Cette expérience confirmerait donc les résultats précédents, mais n'est pas non plus exempte de critiques : les vitesses relatives de croissance particulièrement faibles (RGR < 0.1 J^{-1}) pour les conditions expérimentales (600 ppm CO_2 ; 16 h de jour ; 300 μ mol PAR ; 18 °C) incitent à soupçonner l'existence d'un facteur limitant autre que le flux acropète d'eau. Kroon *et al.* (1998) comparent des laîches (*Carex flacca*) appariées par un stolon, mais enracinées dans des pots individuels qui peuvent être traités différemment. Ainsi, ils montrent que lorsque l'un des « siamois » se trouve dans un sol sec et riche en N, et l'autre dans un sol irrigué mais pauvre en N, le premier reçoit des flux d'eau (marquée au Deuterium) importants du second, mais ne lui transfert que des quantités d'azote (marqué ^{15}N) négligeables. Au contraire, un plant mis en présence d'un sol humide et riche en N transmets des quantités importantes d'eau et d'azote à son siamois cultivé sur un sol sec et pauvre en N. Les auteurs en tirent les conclusions que les flux d'azote vont nécessairement dans la même direction que les flux d'eau, et sont stimulés par ceux-ci.

En résumé, le NO_3^- est fortement compartimenté à diverses échelles mais l'inté-

rêt de cette observation pour un modèle d'assimilation repose sur une question non tranchée : les flux de transport permettent-ils de maintenir la concentration du nitrate métabolique, *ie*, limitent-t'ils ou non la réduction du nitrate ?

1.2.3 Activités enzymatiques et flux d'assimilation

L'ATP et les électrons indispensables à l'assimilation du nitrate peuvent provenir de diverses origines, en particulier photosynthétique et respiratoire (cycle des acides tricarboxyliques et voie des pentoses-phosphate). Mais, hormis la réduction cytoplasmique du NO_3^- en NO_2^-, toutes les autres étapes de l'assimilation sont localisées dans des plastes, des chloroplastes en ce qui concerne la feuille (figure 1.5). Cette dernière localisation et le constat, chez les herbacées bien alimentées en azote, que les feuilles sont les organes à plus forte activité NR (Gojon *et al.*, 1994; Cramer *et al.*, 1995; Scheible *et al.*, 1997a; Lexa and Cheeseman, 1997; Black *et al.*, 2002; Ivashikina and Sokolov, 2004), mais qu'elle décroît très rapidement à l'obscurité, sont des arguments utilisés pour décrire l'assimilation du nitrate comme un processus de nature essentiellement photosynthétique (Gojon *et al.*, 1994; Ferrario-Méry *et al.*, 1997; Kaiser *et al.*, 2000; Debouba *et al.*, 2006). Ceci explique qu'une majorité d'études se focalise sur les feuilles et les relations avec l'éclairement, en particulier au cours du nycthémère. De prime abord, ces relations reposent sur l'aptitude des photosystèmes à produire directement l'ATP et les électrons indispensables à l'assimilation. Cependant, dans la chaîne d'assimilation, la NR est la seule enzyme à localisation cytoplasmique et son activité ne peut dépendre directement de l'ATP et du NADH photosynthétiques. La faiblesse des teneurs en NO_2^- chez les plantes saines a été interprétée comme une preuve que la réduction du nitrate en nitrite est l'étape limitante, et non celle du nitrite en ammonium (Campbell, 1999), ce que confirme la comparaison des $Vmax$ de la NR et de la NiR (nitrite réductase) [1]. Elle pourrait aussi être interprétée comme la conséquence d'une disponibilité plus élevée en ATP et en réducteurs dans le chloroplaste (lieu de la NiR) que dans le cytoplasme (lieu de la NR). En période de jour, ces raisonnements sont cohérents, mais ils ne permettent pas de comprendre pourquoi le nitrite ne s'accumule pas pendant la nuit, lorsque les systèmes photosynthétiques sont inaptes à alimenter la NiR en ATP et réducteurs. Ce paradoxe a été partiellement résolu par la mise en évidence d'une régulation nycthémérale de l'activité NR selon un processus complexe (figure 1.6) impliquant, d'une part, le *turnover* de l'enzyme, dont la synthèse est accélérée à la lumière et ralentie à l'obscurité, et d'autre part, une modulation de l'efficacité de l'enzyme existante (Kaiser and Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2006; Debouba *et al.*, 2006). En effet, la NR se présente sous 2 formes réversibles (figure 1.6) : 1) phosphorylée (NR-P) et inactive sur le plan catalytique, et 2) non phosphorylée (NR) et catalytiquement efficace (Delhon *et al.*, 1995; MacKintosh and Meek, 2001; Lillo *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2006; Debouba *et al.*, 2006). Le degré d'activation de la NR, (*i.e.* le rapport NR/(NR + NR-P)) varie très rapidement lors d'un changement de régime lumineux (quelques minutes à dizaines de minutes). On lui attribue la responsabilité principale des variations nycthémérales rapides de l'activité effective de la NR dans les feuilles. En effet, avec une demi-vie de 6 à 21 heures (Kaiser *et al.*, 1999), le *turnover* de la NR ne peut rendre compte que de variations d'activités beaucoup plus progressives. Les effets de la lumière sur les changements de degré d'activation sont sans doute indirects, puisqu'une exposition des feuilles à une atmosphère dépourvue de CO_2 a les mêmes effets que l'obscurité (Lillo *et al.*, 2004).

[1] Chez la tomate, l'activité NR représente 25% de celle de la NiR selon Chaffei *et al.* (2003).

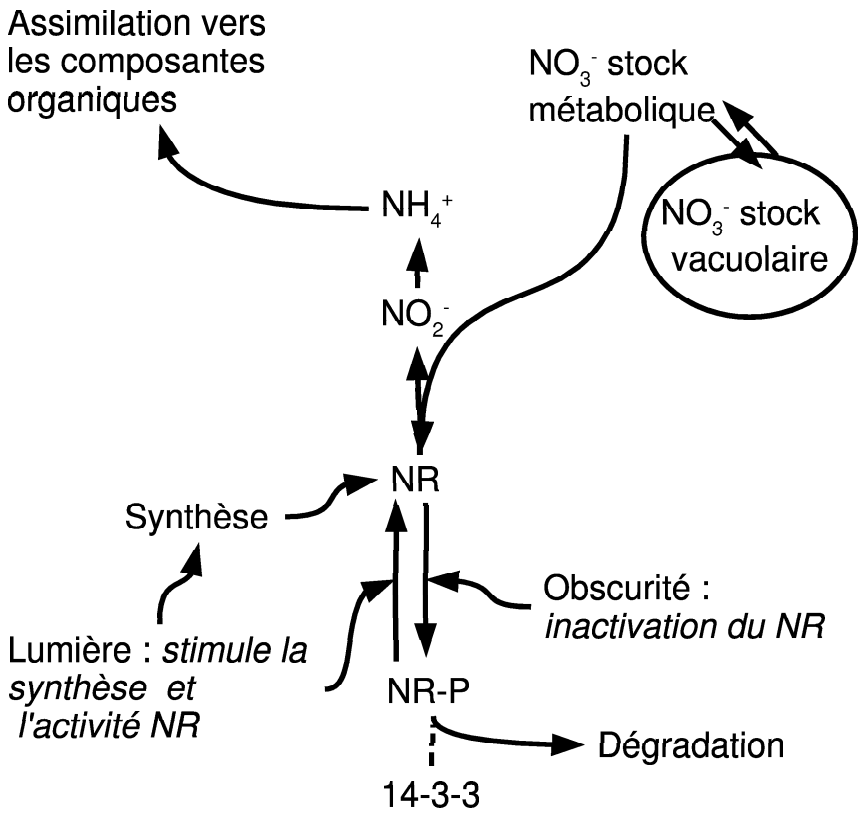


FIG. *1.6:* *Régulation de la Nitrate Réductase*

La nature exacte du signal qui module l'activation de la NR reste inconnue, mais on admet que c'est un métabolite issu de l'acquisition photosynthétique du carbone, ce qui semble corroboré par l'effet activateur des apports expérimentaux de saccharose (Morcuende *et al.*, 1998) ou de glucose (Kaiser *et al.*, 1999; Kaiser and Huber, 2001) à des feuilles détachées. Un modèle de simulation des variations de l'activité NR foliaire a d'ailleurs été proposé sur cette base (Zongjian and Midmore, 2005).

La photosynthèse intervient donc plus ou moins directement sur l'assimilation du nitrate à plusieurs niveaux, par la fourniture d'énergie et de réducteurs, par l'apport de radicaux carbonés, et en modulant l'activité NR. Cette forte implication a justifié l'élaboration de modèles simplifiés où l'assimilation se résume à une fonction purement photosynthétique (Scaife, 1989; Cardenas-Navarro *et al.*, 1999a). Cependant, cette extrême simplification est discutable pour deux raisons :

1) Le degré d'activation nocturne de la NR ne chute pas à une valeur nulle, mais reste dans une gamme de 20 à 50% (De Cires *et al.*, 1993; Botrel and Kaiser, 1997; Scheible *et al.*, 1997a; De la Haba *et al.*, 2001; Debouba *et al.*, 2006). Il a été vérifié par des méthodes de bilan que les feuilles d'orge assimilent effectivement des quantités notables de nitrate en l'absence de lumière (Aslam and Huffaker, 1982). Dans ces conditions, l'absence d'accumulation nocturne de nitrite dans les feuilles reste énigmatique. Des expériences avec du nitrite marqué ^{15}N (Reed *et al.*, 1983) ont établi qu'il est effectivement assimilé à l'obscurité dans les limbes de plusieurs espèces végétales, mais moins intensément qu'à la lumière. Elles montrent aussi que l'anoxie déprime fortement l'utilisation du nitrite. Tout indique donc

que l'assimilation du nitrate est réduite sans être nulle pendant la nuit, et qu'elle fait usage d'ATP et d'électrons issus de la glycolyse et de la respiration.

2) La présence de NR dans les tiges et les racines (Andrews *et al.*, 1984; Debouba *et al.*, 2006) pose la question de leur participation au métabolisme de l'azote dans la plante entière. Ainsi, chez la tomate, l'activité NR foliaire par gramme de poids frais est d'environ 2 et 6 fois plus élevée que celle des tiges et des racines, respectivement (Cramer *et al.*, 1995). Compte tenu de leurs biomasses, les limbes, les tiges et les racines contiennent 75%, 20% et 5% de l'activité de la plante (Andrews *et al.*, 1984; Debouba *et al.*, 2006). Malgré leur activité NR et leurs stocks importants de NO_3^- (cf 1.2.2), peu de travaux ont porté sur la participation des tiges au métabolisme N et ils se limitent généralement à la simple détection d'une activité NR. Les tiges des plants jeunes utilisés en expérimentation étant souvent chlorophylliennes, la possibilité d'une intervention de la photosynthèse ne peut pas être rejetée mais la littérature est silencieuse sur le sujet. En revanche, il ne fait pas de doute que, dans les racines, l'assimilation est strictement dépendante de la respiration (Abrol *et al.*, 1983; Morot-Gaudry, 1997; Chaffei *et al.*, 2003). Les données montrent néanmoins des similitudes avec les systèmes d'assimilation des limbes : la NR se présente sous les deux formes NR et NR-P (Botrel and Kaiser, 1997) ; son degré d'activation, normalement faible, de l'ordre de 20-50% (Botrel and Kaiser, 1997; Geiger *et al.*, 1998; De la Haba *et al.*, 2001), augmente après une application de glucose (Botrel and Kaiser, 1997). Aussi, l'opinion a été exprimée qu'en conditions normales, les racines étant alimentées en carbone par les feuilles, elles ne répondent que lentement aux variations de l'environnement aérien (Kaiser and Huber, 2001). De fait, on ne trouve pas de cycles nycthéméraux nets pour le degré d'activation de la NR racinaire (Geiger *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 1997c; De la Haba *et al.*, 2001) .

La participation relative des divers organes à l'assimilation du NO_3^- est généralement fondée sur deux indicateurs : la comparaison de leurs activités NR ; le rapport de concentration du NO_3^- à l'azote réduit dans les exsudats xylémiques. Sur cette base, on a estimé que les arbres (Andrews, 1986; Gojon *et al.*, 1991a) et les végétaux d'origine tempérée (Andrews *et al.*, 1984) réduisent la majorité du NO_3^- dans leurs racines. Néanmoins, des résultats récents montrent que chez le peuplier au contraire, l'activité NR des feuilles est 10 fois supérieure à celle des tiges et des racines (Black *et al.*, 2002). Chez les plantes herbacées, on estime que la majorité de la réduction est effectuée par les feuilles lorsque l'alimentation en NO_3^- est pléthorique, et qu'elle devient prédominante dans les racines lorsque la nutrition est fortement limitante, car le métabolisme racinaire permettrait d'intercepter quasiment tout le NO_3^- au fur et à mesure de son absorption (Andrews, 1986). Néanmoins, ces valeurs ne sont que des indicateurs comparatifs qui ne permettent pas de quantifier réellement les flux d'assimilation. En effet, la comparaison de l'activité NR à l'accumulation effective d'azote réduit dans les plantes indique que l'enzyme est très largement sur-exprimée (Brunetti and Hageman, 1976), ce qu'a confirmé la comparaison de croissance de plants génétiquement manipulés pour leur activité NR (Dorbe *et al.*, 1992). Récemment, une méthode reposant sur l'analyse de la discrimination isotopique (^{15}N *vs* ^{14}N) a été proposée pour quantifier la proportion du NO_3^- métabolisé dans les feuilles (Robinson, 1988; Evans *et al.*, 1996). Les résultats confirment qu'elle diminue pour les nutritions les plus faibles, jusqu'à 50% chez la tomate cultivée sur 50 μM NO_3^-.

On retiendra cependant que tous les organes, de la feuille à la racine, ont en com-

mun de répondre au statut carboné, à la fois comme source du carbone nécessaire à la synthèse d'acides aminés, mais aussi comme déterminant du degré d'activation de la NR, et éventuellement comme source d'énergie par l'entremise de la respiration. On notera aussi que l'activation de la NR semble insensible au statut nitrique (Ferrario *et al.*, 1996) contrairement à la transcription des gènes de NR qui se révèlent sensibles à de très faibles niveaux de nitrate (Oaks *et al.*, 1988; Tischner, 2000). Les mécanismes d'induction de la NR sont encore incompris (Zongjian and Midmore, 2005) et surtout, nous manquons de courbes de réponse entre la concentration des tissus en nitrate et leur contenu en protéine NR. A l'inverse, l'induction semble inhibée par les produits finaux de l'assimilation, N et acides aminés libres, surtout glutamine et asparagine (Tischner, 2000).

1.3 Utilisation de l'azote aminé pour la croissance

La figure 1.3 implique la modélisation du contenu en acides aminés et de la vitesse de croissance qui en résulte. Le nombre des acides aminés libres (une vingtaine) rencontrés dans les tissus végétaux peut être perçu comme une difficulté, d'autant plus que les données de la littérature montrent que leur composition est variable en fonction de l'environnement. Néanmoins, ils constituent tous une source d'azote plus ou moins directe pour l'élaboration des composés structuraux azotés, en particulier les protéines et les nucléotides. L'un d'entre-eux, la glutamine, formé par amination du 2-oxoglutarate (2-OG), représente la première forme organique de l'azote, et on peut considérer que tous les corps azotés (structuraux et non-structuraux) ont tiré leur azote plus ou moins directement de cet acide aminé. Aussi dans une optique de modélisation de la croissance, on pourrait considérer l'ensemble des acides aminés libres comme formant une seule ressource, évaluée en « équivalents glutamine » ou plus simplement en équivalents N.

Outre l'assimilation locale du nitrate évoquée plus haut, les acides aminés libres peuvent provenir de deux sources, les sèves xylémienne et phloémienne depuis d'autres organes, et le « turnover » de structures azotées (protéines, nucléotides ...). Contrairement au nitrate qui n'est présent que dans le xylème, les acides aminés sont transportés de façon ascendante et descendante, les amides glutamine et asparagine étant les principales formes rencontrées dans le phloème (Peuke and Jeschke, 1993; Brouquisse *et al.*, 1992) et dans le xylème (Lorenz, 1976). La mesure et la modélisation des flux d'azote aminé parvenant par les sèves sont soumis aux mêmes interrogations que celles concernant les flux de nitrate (1.2.2). Par ailleurs, les protéines ont une durée de vie limitée, variable selon leur nature et les conditions d'environnement. Globalement à l'échelle d'un organe, la demi-vie des protéines est de l'ordre de quelques jours (Zerihun *et al.*, 1998). Leur dégradation est source d'acides aminés aminés libres qui deviennent ainsi à nouveau disponibles pour la synthèse de substances azotées. D'autres composés azotés, comme les ARNm (Penning De Vries *et al.*, 1974) sont aussi sans doute concernés, et il est finalement difficile d'évaluer les flux imputables au *turnover* de l'azote. A notre connaissance, la croissance nycthémérale n'a pas encore été modélisée en fonction des ressources aminées, comme cela a pu être fait en fonction des ressources carbonées (Gary, 1988a). *A priori*, les mêmes principes devraient pouvoir s'appliquer aux deux ressources, mais la question de leur indépendance se pose. En effet, à l'échelle du nycthémère, les variations de concentration en hydrates de carbone non structuraux (Matt *et al.*, 1998, 2001a; Walter *et al.*, 2005) et en acides aminés libres (Delhon *et al.*, 1995;

Matt *et al.*, 2001b,a; Lea *et al.*, 2006; Fritz *et al.*, 2006a) présentent de grandes similitudes. Ceci peut constituer un obstacle à la quantification des effets propres à l'azote, d'autant plus que les teneurs en C (environ 40%) sont beaucoup plus élevées que celles en N (environ 5%). Il est donc nécessaire d'imposer des conditions susceptibles de modifier cette corrélation entre les contenus en ressources C et N. A ce titre, la limitation / privation d'azote représente une possibilité expérimentale intéressante. En effet, il a été montré que les privations d'azote induisent d'importantes accumulations d'amidon dans les feuilles (Rufty *et al.*, 1988; Geiger *et al.*, 1999; De Groot *et al.*, 2003; Grechi *et al.*, 2007), inversant ainsi le sens de la corrélation entre les statuts N et C. On estime que la privation d'azote, en ralentissant la croissance, diminue la vitesse d'utilisation des ressources carbonées qui s'accumulent donc à un rythme accéléré tant que la photosynthèse n'est pas altérée. Cependant, il a aussi été observé que la limitation azotée diminue les teneurs en acides carboxyliques dans les feuilles (Kirkby and Knight, 1977; Urbanczyk-Wochniak and Fernie, 2005). Ce serait une conséquence de la régulation du pH cellulaire. En effet, la réduction d'un ion nitrate produit non seulement un ion ammonium, mais aussi un ion hydroxyle qui serait neutralisé par la synthèse d'acide malique (Ben Zioni *et al.*, 1971; Kirkby and Knight, 1977; Touraine *et al.*, 1988). Cet effet inverse de la nutrition azotée sur les hydrates de carbone et les carboxylates est problématique, puisque ces deux familles de composés sont des ressources endogènes de C, bien que seules les premières aient été prises en considération par les modélisateurs. D'autre part, les références existantes ne permettent pas d'en comparer l'importance quantitative, en particulier en relation avec la nutrition azotée. Il apparaît donc important lors d'une tentative de modélisation de croissance en fonction du statut azoté, de prendre aussi en considération ces divers aspects du statut carboné.

1.4 Méthodes de mesure de la réduction du Nitrate

Contrairement à l'assimilation du carbone pour laquelle on dispose d'une palette de méthodes de mesure directes à divers pas de temps, de la minute à la journée, la vitesse instantanée de réduction du NO_3^- reste difficile à quantifier. Depuis longtemps, on a cherché à utiliser la mesure aisée de l'activité NO_3^- réductase (*in vivo, in situ, in vitro*) comme base de quantification (Brunetti and Hageman, 1976; Breteler and Nissen, 1982; Passama *et al.*, 1987; Aslam *et al.*, 2001). Néanmoins, en raison de la sur-expression de l'enzyme déjà évoquée, de l'incapacité de rendre compte de l'effet d'une limitation par le NO_3^- ou de l'effet positif du rayonnement, les mesures d'activité enzymatique doivent surtout être considérées comme une évaluation de la potentialité des tissus à assimiler cet ion. L'utilisation d'isotopes de l'azote permet une mesure directe de l'assimilation du NO_3^-. De par sa demi-vie extrêmement courte (10,03 min), le ^{13}N radioactif est réservé aux études d'absorption (Gojon *et al.*, 1996) et n'a pas été utilisé pour caractériser son assimilation. En revanche, l'isotope stable ^{15}N est d'utilisation courante, mais fait appel à des procédures complexes pour l'évaluation de la vitesse d'assimilation (Mackown, 1987). En effet, il est nécessaire de distinguer le NO_3^- et l'azote réduit de la plante. On peut :

1) soit analyser l'enrichissement isotopique de l'azote total et celui du NO_3^- endogène après sa séparation pour en déduire l'enrichissement de l'azote réduit (Rufty *et al.*, 1984),
2) soit séparer préalablement le NO_3^- de l'azote réduit puis procéder à l'analyse de l'enrichissement de chacune des fractions (Gojon *et al.*, 1986; Mackown, 1987).

Le contenu endogène initial du NO_3^- est une source de biais dans le calcul de la vitesse d'assimilation. En effet, il fait intervenir l'enrichissement isotopique de l'azote réduit et celui de la source d'azote. Or cette dernière est double, comprenant à la fois le NO_3^- de la solution nutritive dont on a fixé expérimentalement l'enrichissement, et le NO_3^- endogène dont l'enrichissement évolue en cours d'expérience. Sur de longues durées, par exemple 12 à 48 heures (Gojon *et al.*, 1986), le biais peut être négligeable, l'enrichissement du NO_3^- endogène finissant par s'homogénéiser avec celui de la solution. De même, le biais est faible dans les expériences où les plantes ont été préalablement appauvries en NO_3^- (Mackown, 1987). En revanche, l'évaluation de la vitesse de réduction à court pas de temps (quelques heures) sur des végétaux initialement riches en NO_3^- non marqué conduit à sa sous-estimation si l'on se base sur le seul enrichissement isotopique de la solution. La prise en compte du NO_3^- endogène dans le calcul semble problématique, certaines études (Rufty *et al.*, 1984) indiquant que l'affinité apparente des systèmes de réduction foliaire n'est pas la même pour le NO_3^- récemment absorbé (i.e. parvenant par le xylème) et pour le NO_3^- « ancien » que l'on présume être essentiellement vacuolaire. Aussi, les études se focalisent souvent sur l'assimilation, non pas du NO_3^-, mais sur celle du $^{15}NO_3^-$ récemment absorbé (Pearson *et al.*, 1981; Mackown, 1987; Delhon *et al.*, 1995; Brewitz *et al.*, 1996; Gojon *et al.*, 1998).

L'assimilation du NO_3^- peut aussi se mesurer par de simples méthodes de bilan azoté. Ainsi, à partir de l'évolution des biomasses et des teneurs en azote réduit, on peut calculer la vitesse de réduction par plant. Néanmoins, la faible sensibilité de la méthode la réserve généralement au pas de temps journalier (Brunetti and Hageman, 1976). A pas de temps horaire, on préfère procéder à un bilan nitrique. Il s'agit de mesurer en continu la vitesse d'absorption du NO_3^-, dont on retranche la quantité accumulée dans le végétal et dosée par ailleurs sur des échantillons prélevés au cours du temps (Aslam and Huffaker, 1982; Gojon *et al.*, 1991a). Une variante consiste à supprimer l'alimentation en NO_3^-, la vitesse de réduction se déduisant simplement alors de sa disparition dans le végétal ou le plus souvent dans l'organe excisé (Mackown, 1987; Soussana *et al.*, 1989; Gojon *et al.*, 1991b; Delhon *et al.*, 1996; van der Leij *et al.*, 1998). Les méthodes de bilan sont sans doute moins sensibles que celles faisant appel au marquage isotopique, mais présentent l'avantage de ne pas faire d'hypothèses sur l'origine du nitrate utilisé, et donc d'éviter les biais associés. En revanche, les différentes méthodes partagent la même limitation lorsqu'elles sont appliquées à la plante entière : l'impossibilité de quantifier les parts respectives des divers organes à l'assimilation du nitrate.

1.5 Objectif

Cette thèse a pour ambition d'étudier et de modéliser l'utilisation par la plante du nitrate que ses tissus contiennent. Le modèle expérimental est la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) déjà utilisée au laboratoire pour caractériser l'absorption du nitrate (Andriolo, 1995; Cardenas-Navarro *et al.*, 1998). Les facteurs d'environnement pris en compte sont le rayonnement lumineux (au travers de la position dans le nycthémère) et l'intensité de la nutrition azotée afin de faire varier les statuts carbonés et azotés. Compte tenu des incertitudes évoquées plus haut sur les mécanismes intimes et les facteurs limitant la réduction du nitrate, la modélisation proposée ne prétendra pas refléter la physiologie de la plante dans ses détails, mais, au contraire, restera à un niveau as-

sez général. Néanmoins, ces mêmes incertitudes nous amèneront à comparer diverses hypothèses :

1) concernant la disposition des compartiments de nitrate (figure 1.7), soit en série, à l'image des différentes catégories d'organes, soit en parallèle, à l'image des *pools* cellulaires. Néanmoins, on remarquera que les 2 représentations font intervenir les mêmes flux : Absorption, Stockage et Assimilation.
2) concernant la pertinence de la prise en compte des ressources carbonées pour l'assimilation du nitrate (figure 1.5) et pour la croissance à partir des acides aminés libres.

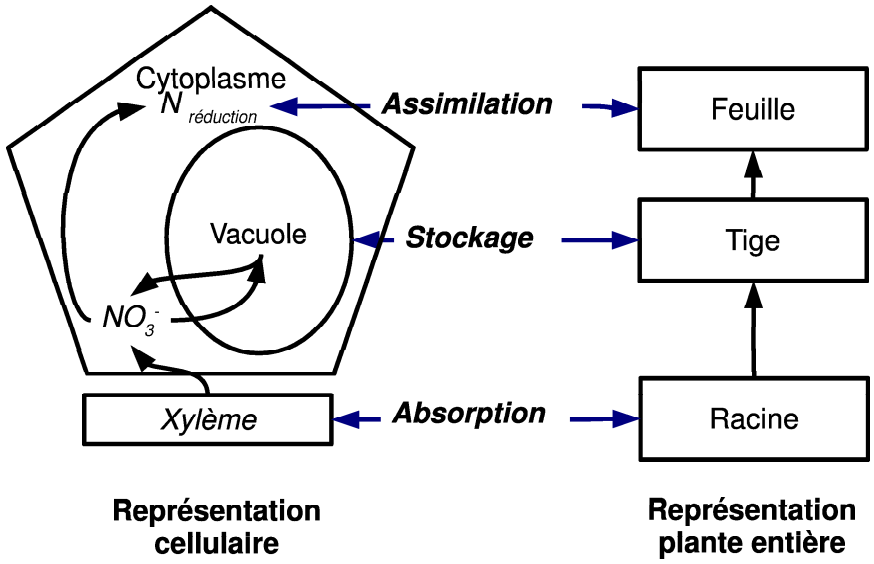


FIG. 1.7: *Deux représentations de la compartimentation du métabolisme du nitrate*

Sur le plan méthodologique, les expérimentations portent sur du matériel végétal jeune, en croissance exponentielle, situation la plus favorable à l'évaluation des flux par des méthodes de bilan, dont nous avons souligné la qualité principale, l'absence de biais, et le défaut, la faible sensibilité.

Chapitre 2

N nutrition effects on short-term growth and on C and N status

2.1 Introduction

Long-term plant growth is frequently described as a smooth monotonous curve of dry biomass accumulation over weeks or months (Cardenas-Navarro *et al.*, 1998; Bertin and Gary, 1993). Meanwhile, short-term growth (day) is generally thought to be phasic. Indeed, in the day-night cycle, it depends on the exclusive C acquisition from light-dependent photosynthesis (Walter *et al.*, 2005), and enhanced nitrate uptake during the light periods (Triboi-Blondel, 1979). Thus, dry biomass follows sequences of marked accumulation during the day periods and null gains during the night periods (in fact, slightly negative due to respiration). This behaviour involves the net accumulation of endogenous reserves at light, whose utilization ensures maintenance and growth over short periods of darkness. Consequently, it may be insightful to relate short-term plant growth to their internal resources availability.

In a short-term growth model vision, one of the most important issue is resource utilization. The internal resources represent plant stores continuously available for structural biomass build-up. In the short-term it has been proposed in C balance models to define growth as the accumulation of structural biomass (Thornley, 1976; Gary, 1988b). This assumes that the carbon store of soluble sugars and starch (*i.e.* non-structural resources), is responsible for growth, via the role of a buffer between photosynthesis and use for growth and respiration (Gary, 1988b).

Balancing the important role of carbohydrates in growth, nitrate is an important N-growth resource. Its absorption by roots fluctuates over the day and night cycle, being stronger during the day period (Le Bot and Kirkby, 1992; Peuke and Jeschke, 1998; Lejay *et al.*, 1999; Matt *et al.*, 2001b; Zongjian and Midmore, 2005). Similarly it has been reported that its internal concentration follows diurnal variations (Cardenas-Navarro *et al.*, 1998) associated to changing nitrate reduction activities. Indeed the activity of the enzyme nitrate reductase (NRa) is more important in day than in night periods, leading to important diurnal changes in the internal nitrate store, which plays the role of buffer between N absorption and use for growth.

In order to develop a short-term growth model sensitive to both C and N resources

availabilities, it is necessary to take into account the rapid changes of the endogenous status of both these resources. From an analytical viewpoint, this is far from trivial, as a wider spectrum of molecules is liable to influence growth when N nutrition is involved. Indeed, while current models lay only on the non-structural carbohydrate content as C resource, the large influence of NO_3^- nutrition on plant malate content (Kirkby and Knight, 1977; Scheible *et al.*, 1997b) addresses the question of the importance of non-structural carboxylates as C resources for growth (Bijlsma *et al.*, 2000). Plant nitrate is an obvious N store, sometimes able to fill the needs of several days of growth (Cardenas-Navarro *et al.*, 1999b), but only amino acids show net accumulation during the day period, followed by a decrease during the night (Lea *et al.*, 2006; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2002; Matt *et al.*, 2001a) highlighting their role as a N source at darkness. However, the importance of nitrate and amino acids as N stores remains to be compared. Furthermore, most published materials focus on plant leaves, and a comprehensive view of all vegetative organs is lacking.

This study aims at characterizing diel growth, in terms of structural dry biomass (WS), along with non-structural biomass (WNS) changes of young tomato plants submitted to contrasted N nutrition. Carbon and N endogenous stores are evaluated in three organ classes : leaves, stems and petioles, roots.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Plant material and growth conditions

Tomato seeds (*Solanum Lycopersicum* L., cv. Rondello, De Ruiter-Seeds, Bleiswijk-Holland) were sown directly in a NFT (Nutrient Film Technique) setup inside a growth room, as described in Cardenas-Navarro (1998). Ten days after sowing (das) thinning was carried out to leave only 1 seedling out of 3. Plantlets were selected according to visible homogeneity criteria based on the length of the first true leaf. In order to avoid any mechanical stress, plants were never manipulated until their harvest.

The system was set in a growth room maintained under continuous darkness for 3 days. After that, a 12h photoperiod was applied. Photosynthetic photon flux density (PPFD) was progressively increased by switching on an increasing proportion of the fluorescent lamps : 1/4 from day 4, 1/2 from day 5, 3/4 from day 7, and full light from day 8 until the end of the culture. Average PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density, sensor LI-190, LICOR, Lincoln, USA) at plant level was 320 μmol m^{-2} s^{-1} (standard deviation = 22), humidity and air temperature were set to 85 % and 25°C from days 1 to 8, then to 75 % and 20°C, respectively. Nutrient solutions were regulated at air temperature.

The nutrient solution (3.000 mol m^{-3} NO_3^-) used to raise the plants from sowing until the experimental period (18-19 *das*), was made-up with deionized water and the following pure salts, in mol m^{-3} : KH_2PO_4, 1.00 ; K_2SO_4, 1.00 ; $Ca(NO_3)_2$, 1.50 ; $CaSO_4$, 2.00 ; $MgSO_4$, 1.50 ; EDTA-Fe, 43x10^{-3}. Other trace elements following Kanieltra formula 6-Fe (Hydro Azote, France), were added at 0.1 x 10^{-3} m^3 m^{-3}. During the experimental periods, the solutions with lower NO_3^- concentrations (0.000-0.020 mol NO_3^- m^{-3}) were obtained by replacing $Ca(NO_3)_2$ by equivalent amounts of $CaSO_4$, thus leaving phosphate and cation concentrations unchanged. Solution changes were perfor-

med without any plant manipulation. The NFT system was disconnected from the raising solution tank and rinsed with 0.020 m^3 of a nitrate-free solution (regulated at 20 °C), which was discarded. Thereafter, the NFT system was connected to a second tank containing the new nutrient solution regulated at 20 °C. The whole process lasted for about 10 minutes and solution flow interruption to roots never lasted for more than 2 minutes.

Solution [NO_3^-] was monitored using a UV method (Vercambre and Adamowicz, 1996), at 30-180 minutes intervals during the growth period, and 5-30 minutes intervals during experiments. Automatic injections of NO_3^- salts (containing 58 % K, 29 % Ca and 13 % Mg, in moles) by precision syringes maintained solutions within 5% of set concentration. Solution volume (0.06 m^3) and pH (5.0) were also automatically maintained at the same intervals by deionized water and sulfuric acid injections, respectively. Electro-conductivity was 1.20 mS.

2.2.2 Experiments

Three experiments were carried out. The first was used to establish long-term growth parameters, and the following to monitor short-term growth in the day-night cycle under varied N regimes.

Experiment I : Two independent crops were grown successively to monitor their long-term growth with adequate N nutrition (3.000 mol NO_3^- m^{-3}). Harvests of 8 (first crop : 12, 15, 16, 17, 18 and 19 das) or 12 (second crop : 17, 19, 20, and 21 das) randomly sampled plants were performed during the last half hour of the dark period. As axillary buds and floral pieces appeared at 21 das, the experimental stage for the following experiments was set at 18-19 das. At this stage, organ biomass was sufficient to carry out chemical analyses.

Experiment II : Two independent crops were grown successively to monitor their short-term (over a day and night cycle, 18 das) growth and composition changes with adequate N nutrition (3.000 mol NO_3^- m^{-3}). On day 18, from the beginning of the light period (time zero for the experiment) onwards, seven harvests were done at times 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h. Harvests consisted of 6-8 randomly sampled plants.

Experiment III : Two independent crops were grown successively to monitor their short-term (over 2 day-night cycles, 18-19 das) growth and composition changes with restricted N nutrition (*i.e.* < 0.3 mol NO_3^- m^{-3} which restricts long-term growth, unpublished). For both crops, 18 das, the adequate solution used during growth was changed during the last 10 minuts preceding the day period (Time zero of the experiment). The new solution contained 0.020 (first crop) and 0.000 (second crop) mol NO_3^- m^{-3}. Random samples of 6 plants were taken at times 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 h, thus extending over 2 full day-night cycles.

2.2.3 Plant analyses

At harvest, each plant was separated into 3 parts : roots, stems with petioles, and leaf laminae. Roots were rinsed with deionised water and spun-dry (2 min at 2800 g). Plant parts were weighed on an analytical balance, frozen with liquid N_2, kept at -80°C until they were freeze-dried (GENESIS 25ES, Virtis Company, Gardiner, USA). Dry material

was weighed, ground to a fine powder (model MM301, Retsch, Haan, Germany) under liquid N_2 and stored at -20 °C until analyses.

Total C and N contents were measured on dry powders according to the Dumas method (Elemental analyser, ANA 1500, Carlo Erba, Milano, Italy). Nitrate was determined on water extracts of the dried material, in an auto-analyzer (AQUATEC 5500, Tecator, Höganäs, Sweeden) by colorimetry of nitrite (Griess reaction) after nitrate reduction by cadmium. Free NH_4 was extracted in a 2% solution of 5-sulfosalicylic acid and determined by the phenol hyperchlorite colorimetric method (Berthelot reaction). Free amino acids were analyzed by reverse-phase High Performance Liquid Chromatography after derivatisation with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and detected by fluorimetry (WATERS, Milford, MA, USA). Peak areas (Millenium software, WATERS) were compared to standards from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Sugars and organic acids were determined after extraction by a water / methanol / chloroform mixture as described by Gomez *et al.* (2002). Soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) and starch were measured by a micro enzymatic assay (microplate reader ELx800UV, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) following the method of Gomez *et al.* (2007). Organic acids, malate and citrate, were measured on microplates enzymatically at pH 7,8 and 10 (glycylglycine buffer / L-glutamate-1, ref. 139 068, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively. Citrate was determined in 2 steps. First, initial oxaloacetate and pyruvate were transformed into L-malate and L-lactate in the presence of malate-dehydrogenase (MDH, ref 127 914, Roche Diagnostics), lactate-dehydrogenase (ref 127 876, Roche Diagnostics) and reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide (NADH, ref 128 015, Roche Diagnostics). After 10 min, NADH absorbance was measured at 340 nm. Second, citrate-lyase (ref 132 076, Roche Diagnostics) was added to transform malate into oxaloacetate and finally malate. After 2 hrs, initial citrate concentration was inferred from the changes in the absorbance measured at 340 nm. Malate was also determined in 2 steps. First, initial oxaloacetate was transformed into L-aspartate and cetoglutarate in the presence of glutamate-oxaloacetate-transaminase (ref 105 554, Roche Diagnostics) and NAD (ref 100 319, MP Biomedicals, Irvine, CA USA), whose absorbance at 340 nm was measured after 5 min. Then, MDH is added to the mixture, and changes in the absorbance are measured at 340 nm, 90 minutes later.

Free $SO_4^=$ was determined at a companion laboratory (INRA - EMMAH, domaine St-Paul, site agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France) on water extracts by capillary electrophoresis, using an electrolyte made of chromate (4.6 mM), OFM-OH (0.5 mM) and boric acid to obtain a pH value of 8.

2.2.4 Gas exchange measurements

Net photosynthesis and transpiration were measured on intact leaves using a portable system (CIRAS-1 version 2.7, differential CO_2 /H_2O Infra-Red Gas Analyzer, PP Systems, Hitchin, Hertfordshire, U.K.) equipped with a 2.5 cm^2 leaf cuvette and light unit. Conditions were set to ambient conditions in the growth room : PPFD and temperature in the cell, 377 μmol m^{-2} s^{-1} and 20 °C, respectively ; [CO_2] and water pressure at the outlet, 370 ppm and 14 mbar, respectively.

2.2.5 Data processing

In this paper, total dry weight (W in g plant^{-1}) has 2 components, structural (WS in g plant^{-1}) and non-structural (WNS in g plant^{-1}) dry weights, such that :

$$W = WS + WNS \tag{2.1}$$

The non-structural biomass was calculated as the sum of the weights of organic and mineral non-structural molecules. Organic molecules that were analysed were non-structural carbohydrates (starch, glucose, fructose and sucrose), non-structural carboxylates (malate, citrate) and 20 free amino acids. Analyzed minerals were free NH_4^+, NO_3^- and $SO_4^=$. Cations are problematic, because they compensate for the negative charges of both structural (pectates, for instance) and non-structural (nitrate, for instance) biomass. We considered as nonstructural K^+, the equivalent amount necessary to compensate for the negative charges of non-structural anions. We checked on a few samples from all plant parts, that the calculated non-structural K^+ was less than the actual K^+ (as analysed by emission spectrophotometry).

In a similar way, total C and N (C, N, in μmol g^{-1} dw) may be described with 2 components, structural (C_S, N_S, in μmol g^{-1} dw) and non-structural (C_{NS}, N_{NS}, in μmol g^{-1} dw), such that :

$$C = C_S + C_{NS} \quad N = N_S + N_{NS} \tag{2.2}$$

To compute C_{NS}, we summed the C contained by non-structural organic molecules (carbohydrates, carboxylates and free amino acids). To compute N_{NS}, we summed the N contained by NO_3^-, NH_4^+ and each free amino acid.

In order to interpret dry biomass over day-night cycles, the data were fitted using piecewise linear regression with breakpoints when the light regime changed. For example, the typical formula to describe the diel changes of W over time t, starting from W_0 at time zero, and light/darkness transition at time t_t is :

$$W = W_0 + (t \leqslant t_t) \times a_0 \times t + (t > t_t) \times (a_1 \times t + t_t \times (a_0 - a_1)) \tag{2.3}$$

with a_0 and a_1, the slopes of W over time before and after t_t, respectively. Statistical significance of these slopes was computed, and when they were not significantly different, a unique linear regression was computed over the whole period.

Statistical analyses and graphics were performed using the R software (The R Project for Statistical Computing, http ://www.R-project.org).

2.3 Results

2.3.1 Dry biomass accumulation

Adequate N nutrition

Two independent cultures were grown in order to characterize the long-term tomato growth with adequate N nutrition (3.000 mol NO_3^- m^{-3}) during the vegetative

phase. Figure 2.1 shows the accumulation of dry biomass (W) of whole plants. These replicate crops showed a high level of reproducibility, inferring that the cultural system is suitable to study and compare plants from successive experiments. In our cultural conditions, biomass accumulation can be described as a smooth exponential curve with a relative growth rate almost equal to 0.30 d^{-1}.

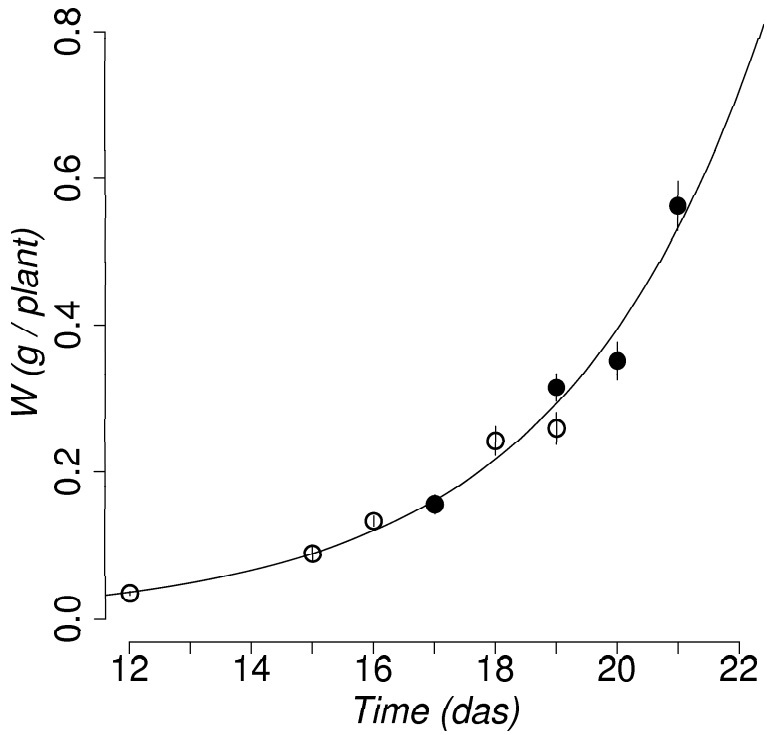


FIG. 2.1: *Dry biomass (W, g $plant^{-1}$) accumulation along growth. Growth of 2 independent crops (open and closed symbols) was monitored in a growth room with the same environmental conditions : 12/12 h photoperiod, 20 °C air and solution temperature, 320 µmol m^{-2} s^{-1} PPFD, 3.000 mol m^{-3} NO_3^-. Symbols and vertical bars indicate average and SE of 8 (open symbols) and 12 (closed symbols) randomly sampled plants. Solid line is the common exponential best fit : $W = 0.00100 \times e^{0.299 \times das}$.*

At short-term, however, figure 2.2 A1 (squares) shows that throughout the day-night cycle, 18 das, W can no longer be treated as a smooth exponential curve. In these replicate experiments, also with adequate N nutrition, W increased by 0.120 g $plant^{-1}$, which represents a 0.33 d^{-1} relative growth rate, close to the value computed from the long-term experiment. However, dry biomass increase was significant only during the light period (fig. 2.2 A1) and W was stable during darkness. In fact, the best fit of W over time was a piecewise linear regression with breakpoint at the time when the light regime changed. At organ level, this description applies also to leaf laminae (fig. 2.2 A2, squares). Stems and petioles (fig. 2.2 A3, squares), did behave differently during day and night, but W increased significantly during the night, albeit more slowly than during the day. Roots instead (fig. 2.2 A4, squares) seemed to accumulate biomass at a constant rate throughout the whole cycle, as the slopes of W over time were not statistically different during day and night.

In this work, WNS was measured as the biomass of those molecules that can be considered as endogenous stores of C and/or N used for structural growth. Figure 2.2 A1 (circles) shows that, in whole plants, the pattern of WNS along time was also phasic

over the day-night cycle, with a marked increase during the day, and a statistically significant decrease at night. Leaf laminae (fig. 2.2 A2, circles) showed a same pattern, while stems and petioles (fig. 2.2 A3, circles) and roots (fig. 2.2 A4, circles) differed because *WNS* remained constant at night.

Structural dry biomass *WS* was computed as the difference between *W* and *WNS*. Figure 2.2 A1 (triangles) shows that, in whole plants with adequate N nutrition, *WS* increased at the same pace throughout day and night. Indeed, the slopes within these periods were not significantly different. This description applies also to each organ category (fig. 2.2 A2-A4, triangles).

Thus, *W* and *WS* showed different patterns depending on the organs. As a consequence, the root :shoot ratio (RSR, not shown) computed on the basis of *W* showed significant diel patterns (0.171 and 0.146 at the onsets of light and darkness, respectively), while when computed from *WS* data, it revealed constant (0.235) throughout the whole experiment. This difference occurs mostly because the leaf laminae contain most of the plant reserves. Indeed, figure 2.2 A2 shows that, overall, *WNS* equaled *WS* in leaves, while in roots, *WNS* was around a fifth of *WS*.

Restricted N nutrition

Two independent cultures were grown in order to characterize the short-term tomato growth during 48 h with restricted nutrition from day 18, either by applying 0.020 or 0.000 mol NO_3^- m^{-3}. At 0.020 mol m^{-3}, RGR was unchanged (0.31 d^{-1}) during the first 24 h period, but it was reduced (0.15 d^{-1}) during the following day. At 0.000 mol m^{-3}, instead, RGR was strongly reduced (0.17 d^{-1}) since the first day. It should be stressed that our measurements of net photosynthesis at leaf level (not shown) made before and during the experiments, were not significantly different between N regimes, except during the second day at 0.000 mol NO_3^- m^{-3}, where it fell from 11 to 7 μmol CO_2 m^{-2} s^{-1}.

In whole plants (fig. 2.2 B1-C1, squares), *W* showed roughly the same diel phasic patterns that were observed with adequate nutrition. Although residual errors were visibly higher in the 0.020 mol m^{-3} experiment, the same observation that root *W* shows less phasic patterns than leaf *W* (fig. 2.2 B2,B4, squares) can be made at limiting and adequate nutrition. However, the most striking observation concerns root biomass at 0.000 mol m^{-3} (fig. 2.2 C4, squares). Compared to adequate nutrition (A4), their initial growth rate was strongly restricted since the first day. However, *W* increased at a higher rate from one half-photoperiod to the next, with the following consequences : an inverse growth pattern where the rate during darkness was higher than during the preceding light period ; roots gradually recovered and even significantly exceeded the growth rate of roots exposed to 3.000 mol m^{-3}, 18 das.

Applying the limiting 0.020 mol m^{-3} nutrition did not change the diel patterns of *WNS* (fig. 2.2, circles) at plant (B1) or organ level (B2-B4). At 0.000 mol m^{-3} however, the overall *WNS* accumulation rates (fig. 2.2 C1-C4, circles) as well as the amplitude of their phasic patterns were strongly reduced. In percent of *W*, plant *WNS* was strongly reduced at 0.000 mol m^{-3} (fig. 2.2 C, circles) and this holds true also for leaf laminae and stems.

In terms of structural biomass also, growth was restricted by N treatments (fig. 2.2

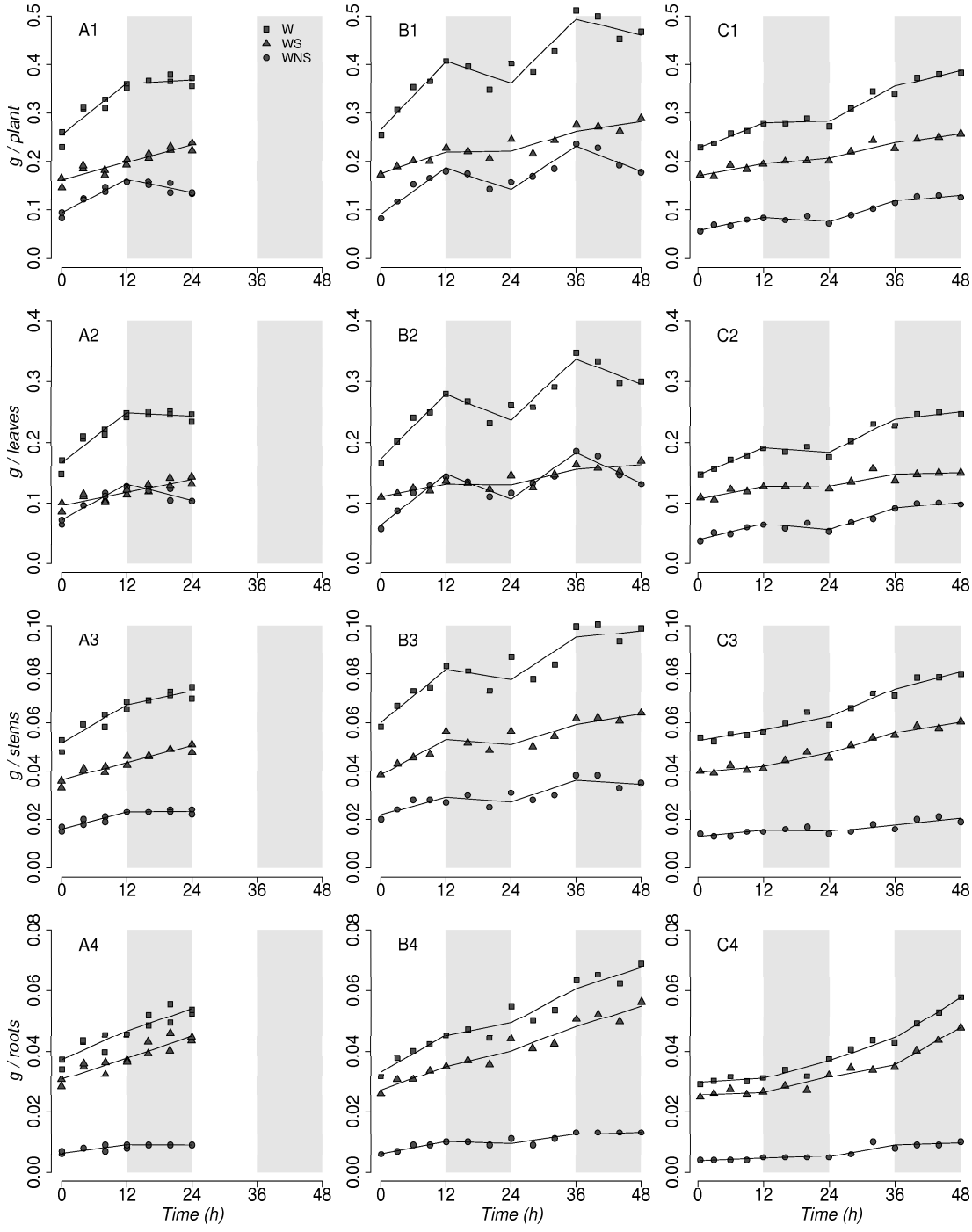


FIG. 2.2: *N nutrition effects on diel dry biomass accumulation in organs and whole tomato plants. Plants were grown (12h photoperiod) with 3.000 mol NO_3^- m^{-3}. Eighteen das (0 h on time axis), they were sampled at 3-4 hrs intervals during 24-48 hrs to monitor their total (W, closed squares), non-structural (WNS, closed circles) and structural ($WS = W - WNS$, closed triangles) dry weights. At time 0, nutrition was either maintained at 3.000 (A1-A4 ; 2 independent experiments), or changed for 0.020 (B1-B4) or 0.000 (C1-C4) mol NO_3^- m^{-3}. From top to bottom : Whole plants (A1-C1), leaf laminae (A2-C2), stems and petioles (A3-C3) and roots (A4-C4). Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants. Lines are piecewise linear regressions as described in the materials and methods section.*

A1-C1, triangles). Indeed, while at 3.000 mol m^{-3}, *WS* increased at a mean rate of 2.92 mg h^{-1} $plant^{-1}$, this value fell to 2.08 and 1.80 at 0.020 and 0.000 mol NO_3^- m^{-3}, respectively, the differences being statistically significant. The same trend was observed for leaves (fig. 2.2 A2-C2, triangles). For stems however (fig. 2.2 A3-C3, triangles), N restriction significantly decreased their structural growth rate, but mean rates at 0.020 and 0.000 mol m^{-3} were not significantly different. Instead, the structural growth rate of roots (fig. 2.2 A4-C4, triangles) did not differ significantly at 3.000 and 0.020 mol m^{-3} (0.58 and 0.57 mg h^{-1} $plant^{-1}$, respectively), but was significantly reduced at 0.000 mol m^{-3} (0.44 mg h^{-1} $plant^{-1}$). However, it should be stressed that for this organ, while the structural growth occurred at a constant pace throughout the experiment at 0.020 mol m^{-3}, it gradually increased in a similar manner to *W* at 0.000 mol m^{-3}.

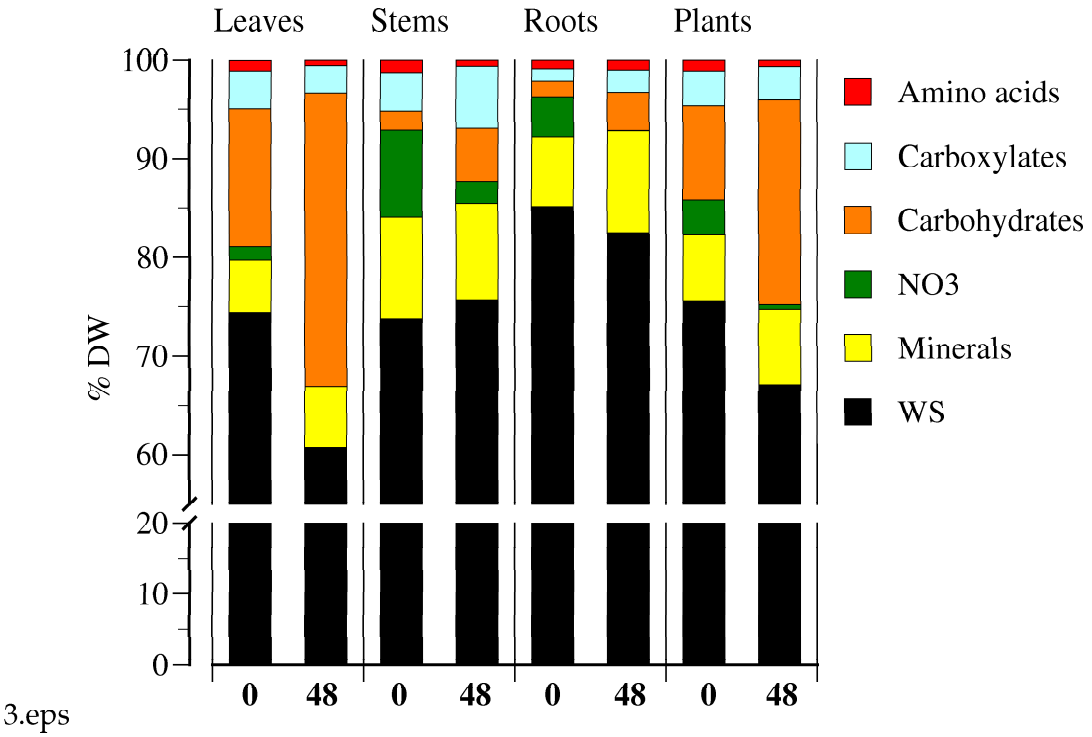
2.3.2 Resources

Figure 2.3 shows biomass components (in %) at the end of the night period, either for plants grown on 3.000 or 0.000 mol NO_3^- m^{-3} for 48 h. It highlights the main effect of N restriction : an overall increase of non-structural biomass at whole plant scale, ascribable to non-structural carbohydrates. This mostly reflects the leaf laminae behaviour, because they are the main carbohydrate reservoir and respond markedly to N nutrition. The carbohydrate content is far less in other organs, but it also responds strongly to N restriction. The % carboxylate content was unchanged at whole plant level, but this was the result of inverse trends depending on the organ : A decrease in leaf laminae, neutralized by an increase in stems and roots. In fact, it appears that stems and petioles differ from leaf laminae in their main C reservoir : carboxylates instead of carbohydrates. The N restriction decreased the % free amino acid and nitrate contents. In plants with adequate nutrition, NO_3^- accounts in any organ for a higher dry weight than amino acids, and in stems for an even higher dry weight than carbohydrates and carboxylates. In fact, stems are the only organ whose NO_3^- content was still noticeable after 48 h N restriction. Other minerals were figured because the replacement of NO_3^- by equivalent amounts of $SO_4^=$ in the nutrient solution to induce N restriction, increased also greatly plant $SO_4^=$. Thus, it appeared that part of the mineral content could interfere in N nutrition experiments. We considered that $SO_4^=$ and its K^+ counter ion together with NO_3^- were non-structural minerals. As can be seen on figure 2.3, non structural minerals cannot be neglected, particularly in stems and roots. As a consequence, the % C, which seemed low in total dry biomass (39.2, 32.4 and 36.5 in leaves, stems and roots), was normal when computed on a structural biomass basis (41.3, 39.7 and 42.1 in leaves, stems and roots).

In the following sections, the non structural biomass will be discussed in terms of endogenous N and C resources.

Nitrogen

Two N pools were considered as endogenous N resources used for plant growth : the nitrate and free amino acid pools (free ammonium being grouped with amino acids). In order to allow comparisons, both were calculated on a common basis of N equivalents (μmoles N g^{-1} dw).



3.eps

FIG. 2.3: *Organ and whole plant dry biomass (W) components. Non structural biomass (WNS) is detailed in free amino acids, carboxylates (malate + citrate), carbohydrates (starch + soluble sugars), NO_3^- and other minerals (K^+, $SO_4^=$). Structural biomass (WS) is calculated as the difference between total and non-structural dry weights ($WS = W - WNS$). Tomato plants in their vegetative growth stage (18-19 das) with adequate nutrition (3.000 mol NO_3^- m^{-3}) are compared to plants submitted to N-free solution during 48h. Data are the average of 6-8 plants, sampled at the end of the dark period.*

Figure 2.4 shows large diurnal changes of endogenous nitrate under adequate nutrition (circles), at plant (A1) or organ level (A2-A4), with a general decrease at light, followed by a roughly equivalent increase at night. The relative amplitude of this pattern was the largest in leaf laminae (A2), and the weakest in roots, but it should be clear that the absolute amplitude was the largest in stems : 370, instead of 170 (leaf laminae) and 110 (root) μmoles g^{-1} dw. In fact, the mean diel [NO_3^-] culminated in stems and petioles with 1100 μmoles g^{-1} dw, compared to 100 in leaves and 800 in roots. Taking their respective biomass into account, leaves, stems and roots contained 17, 54 and 29 % of plant nitrate, thus highlighting the role of stems as nitrate reservoir. When plants were submitted to 0.020 mol NO_3^- m^{-3} in the nutrient solution (triangles), the diel pattern was still phasic in the whole plant (A1) and in any organ (A2-A4). However, the nightly [NO_3^-] increase occurred at a slower rate under nitrate limitation. Thus, the resulting long-term trend was a decrease of plant [NO_3^-]. When plants were submitted to N-free solution (squares), the phasic pattern changed because [NO_3^-] never increased at darkness. Instead, it remained roughly constant in leaf laminae (A2), but decreased in other organs (A3-A4), albeit at a slower pace than in the preceding periods of light. At light, in all organs, [NO_3^-] decreased at a higher rate than in plants with ample nutrition. At the end of the experiment with N-free solution, stems and petioles were the only organs which still contained significant nitrate.

Figure 2.5 shows that, as nitrate, the free amino acid N content followed diurnal changes under adequate nutrition (circles), at plant (B1) or organ level (B2-B4). It differed from nitrate, however, because : 1) it followed an inverse pattern with the increase at light and the decrease at night ; 2) the absolute amplitude of the diel variation was higher in leaf laminae (68 μmoles amino-N g^{-1} dw) than in stems and petioles (51) and roots (7) ; 3) there was far less difference in the mean diel N organ contents (110, 140 and 120 μmol g^{-1} dw in leaves, stems and roots). Taking their respective biomass into account, leaves, stems and roots contained in average 63, 23 and 14 % of plant amino-N, showing that for this pool, leaves were the main reservoir. Although the average plant amino-N concentration (119 μmol g^{-1} dw) was much less than average [NO_3^-] (390 μmol g^{-1} dw), it should be remarked that, instead they were very close in leaves (110 and 97 μmol g^{-1} dw, for amino- and nitrate-N, respectively). When plants were submitted to 0.020 mol NO_3^- m^{-3} in the nutrient solution (triangles), the diel pattern was still phasic for amino-N in the whole plant (B1) and in the leaves (B2), but differed from full nutrition because peak concentrations were observed before the onset of darkness, and minimum concentrations before the onset of light. In other organs (B3-B4) the patterns are unclear. For an unknown reason, the initial (Time zero in figure 2.5) free amino-N was more concentrated in this treatment (triangles) than in adequate nutrition (circles) and the long-term trend seems to maintain this high level. When plants were submitted to N-free solution (squares), the phasic pattern could still be observed at whole plant (B1) and leaf (B2) levels during the first day, but vanished on the second day. The long-term trend was a decrease at plant (B1), leaf laminae (B2) and stem and petiole (B3) levels, but stability in roots (B4). As a result, after 48 h with N-free solution, roots were the organs with the highest amino-N concentration, which represented 93 % of their non structural N. Also, it should be stressed that, contrary to what was observed for nitrate, significant amounts of amino-N remained in all organs.

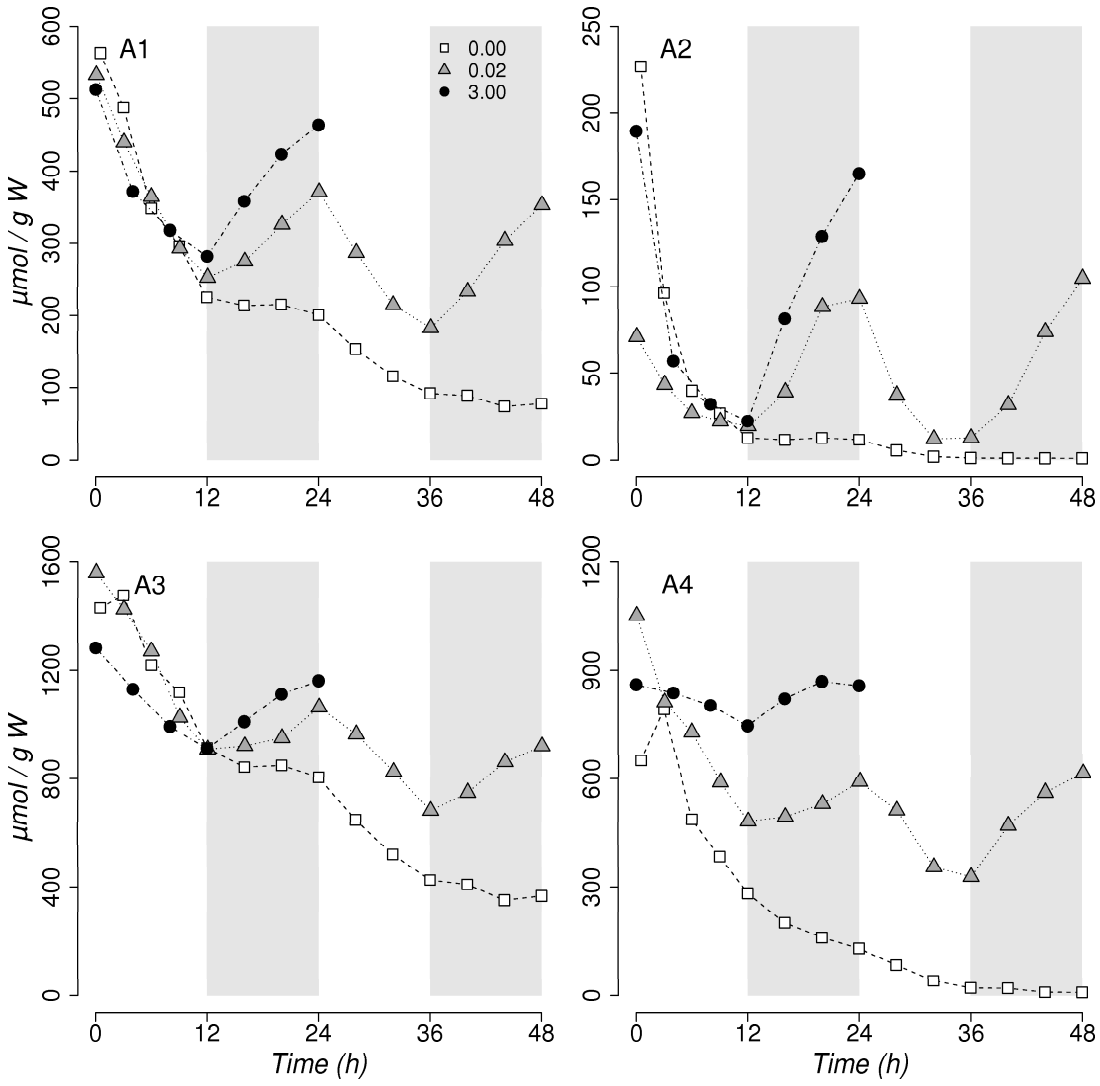


FIG. 2.4: *Diel changes in the NO_3^- content (µmol N g^{-1} dw) of whole tomato plants (A1), leaves (A2), stems and petioles (A3) and roots (A4). Experiments as in figure 2.2. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants.*

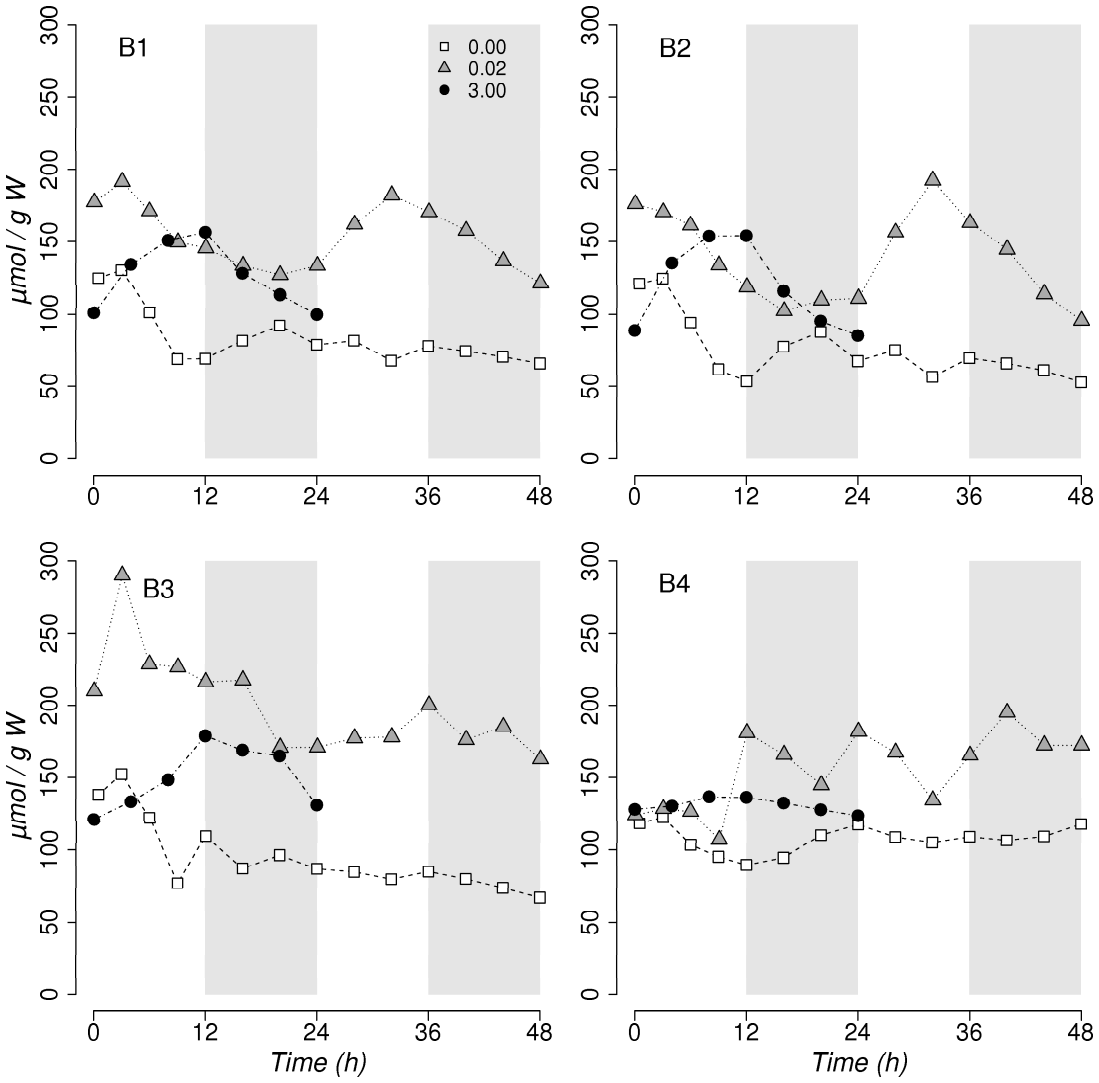


FIG. 2.5: *Diel changes in the free amino acid N content (µmol N g^{-1} dw) of whole tomato plants (B1), leaves (B2), stems and petioles (B3) and roots (B4). Experiments as in figure 2.2. N content was calculated from the free amino acid composition as determined by HPLC. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants. Free ammonium was grouped with the amino acid pool.*

Carbon

Four C pools were considered as endogenous C resources used for plant growth : starch, non-structural soluble sugars, non-structural carboxylates and free amino acid pools. In order to allow comparisons, they were calculated on a common basis of C equivalents (μmoles C g^{-1} dw). The quantitative importance of these molecules differed greatly : in whole plants grown with 3.000 mol NO_3^- m^{-3} they accounted for 70 (starch), 7 (soluble sugars), 18 (carboxylates) and 4 (amino-acids) percent of non-structural carbon. Leaves were the main reservoir for all these compounds, as they accounted for 97, 75, 69 and 62 % of plant starch, soluble sugars, carboxylates and amino acids. In some organs, however, starch did not dominate as C resource : in stems and petioles, carboxylates accounted for 55 % of non-structural C (20 in starch) ; in roots, non-structural C was more evenly distributed between soluble sugars (33 %), carboxylates (34 %) and amino acids (27 %).

Figure 2.6 shows large diurnal patterns for starch C in plants with adequate (circles) or limiting (0.020 mol NO_3^- m^{-3}, triangles) N nutrition. These patterns, an increase during the day, followed by a decrease at night, apply at plant (C1) and organ (C2-C4) levels. It should be remarked that starch content is about 1 order of magnitude higher in leaves than in stems, and in the latter around 1 order of magnitude over the roots. Unfortunately, the initial starch concentration differed in leaves from different experiments, but it seems clear that the long-term trend was an increase in this organ when N limitation was applied (0.020 and 0.000 mol NO_3^- m^{-3}, triangles and squares). Stems and petioles did not respond significantly to nutritional treatments, contrary to roots bathing in N free solution (C4, squares) whose starch content increased greatly during the second day.

Figure 2.7 shows obvious responses of soluble sugars, both to light signals and N nutrition. Indeed, large diurnal patterns can be observed at plant (D1) or organ level (D2-D4) in any nutritional conditions. Furthermore, N limitation (triangles and squares) enhanced soluble sugar concentration in all organs. As already mentionned, soluble sugars contained generally far less C than starch. In roots, however, the absolute amplitude of changes in response to light and nutrition were far greater for soluble sugars than for starch. A distinctive characteristic of the soluble sugar diel pattern appears in leaves (D2) : The peak and valleys seem to anticipate the light regime transitions.

Figure 2.8 shows minute diurnal patterns for carboxylates content in plants with adequate (circles) N nutrition, except in roots (E4) where they accumulated at light and decreased at night, with an absolute amplitude of 290 μmoles C g^{-1} dw to be compared to soluble sugars (390). In other organs (E2-E3) and at whole plant level (E1) the N nutrition effects are unclear due to large initial differences in carboxylate concentration and to opposite effects of reduced *versus* null N nutrition. In leaves (E2), for instance, the carboxylate concentration remained stable during the first day period both at 0.000 (squares) and 3.000 (circles) mol NO_3^- m^{-3}, but it increased quickly to a nearly double concentration with an intermediate nutrition (0.020 mol NO_3^- m^{-3}). Even the long-term trend is puzzling, as the plant carboxylate content (E1) was stable under null N nutrition (squares), opposite to the expected inverse relationship between nitrate nutrition and organic acid content.

The free amino acid C store (fig. 2.9) shows patterns very similar to their N store (fig. 2.5). This is easily explained, as the C :N ratio of the amino acid pool (mean plant C :N =

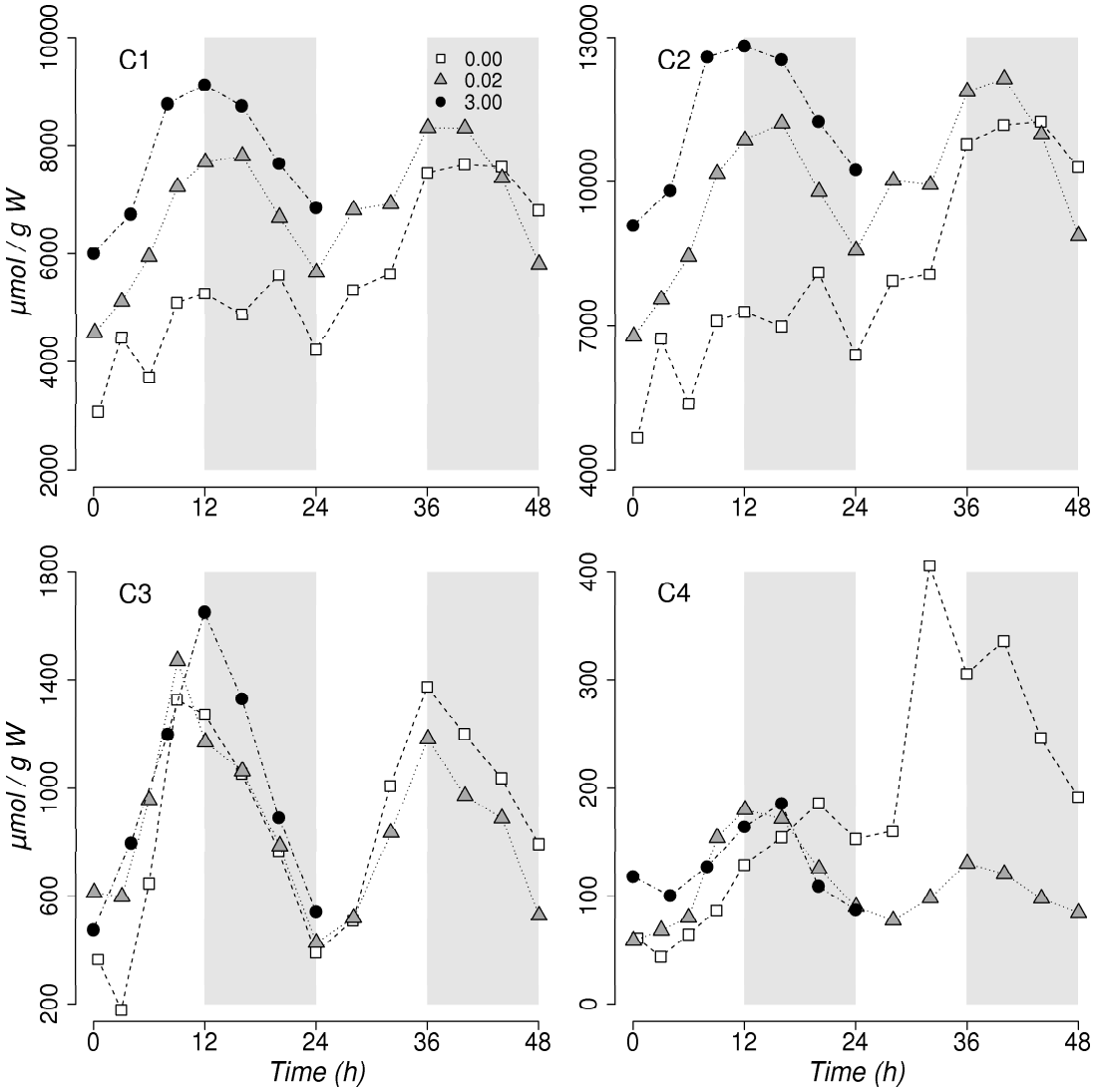


FIG. 2.6: *Diel changes in starch C content (µmol C g^{-1} dw) of whole tomato plants (C1), leaves (C2), stems and petioles (C3) and roots (C4). Experiments as in figure 2.2. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants.*

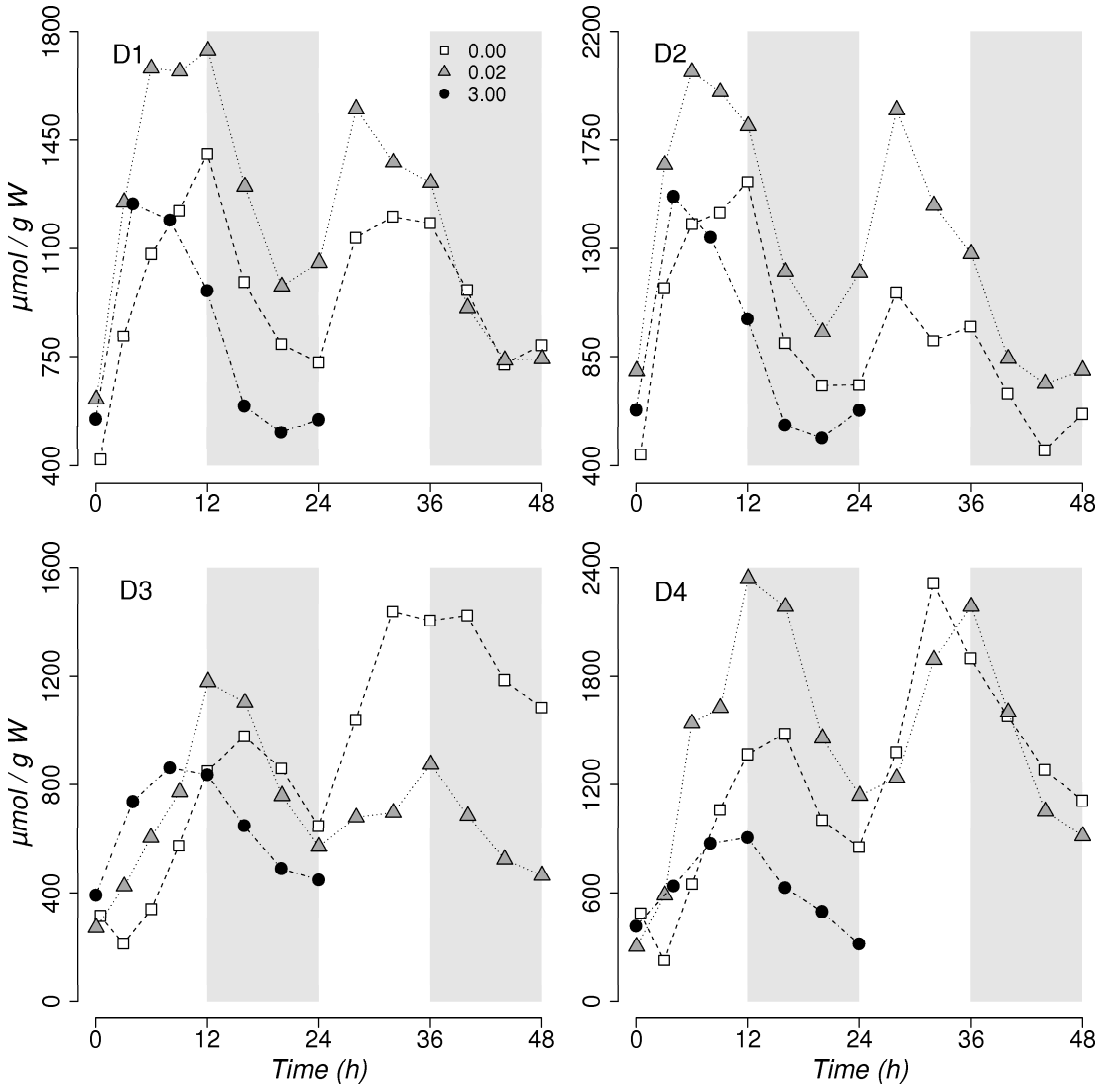


FIG. 2.7: *Diel changes in soluble sugar C content (µmol C g^{-1} dw) of whole tomato plants (D1), leaves (D2), stems and petioles (D3) and roots (D4). Experiments as in figure 2.2. Glucose, fructose and sucrose were analyzed to compute their C content. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants.*

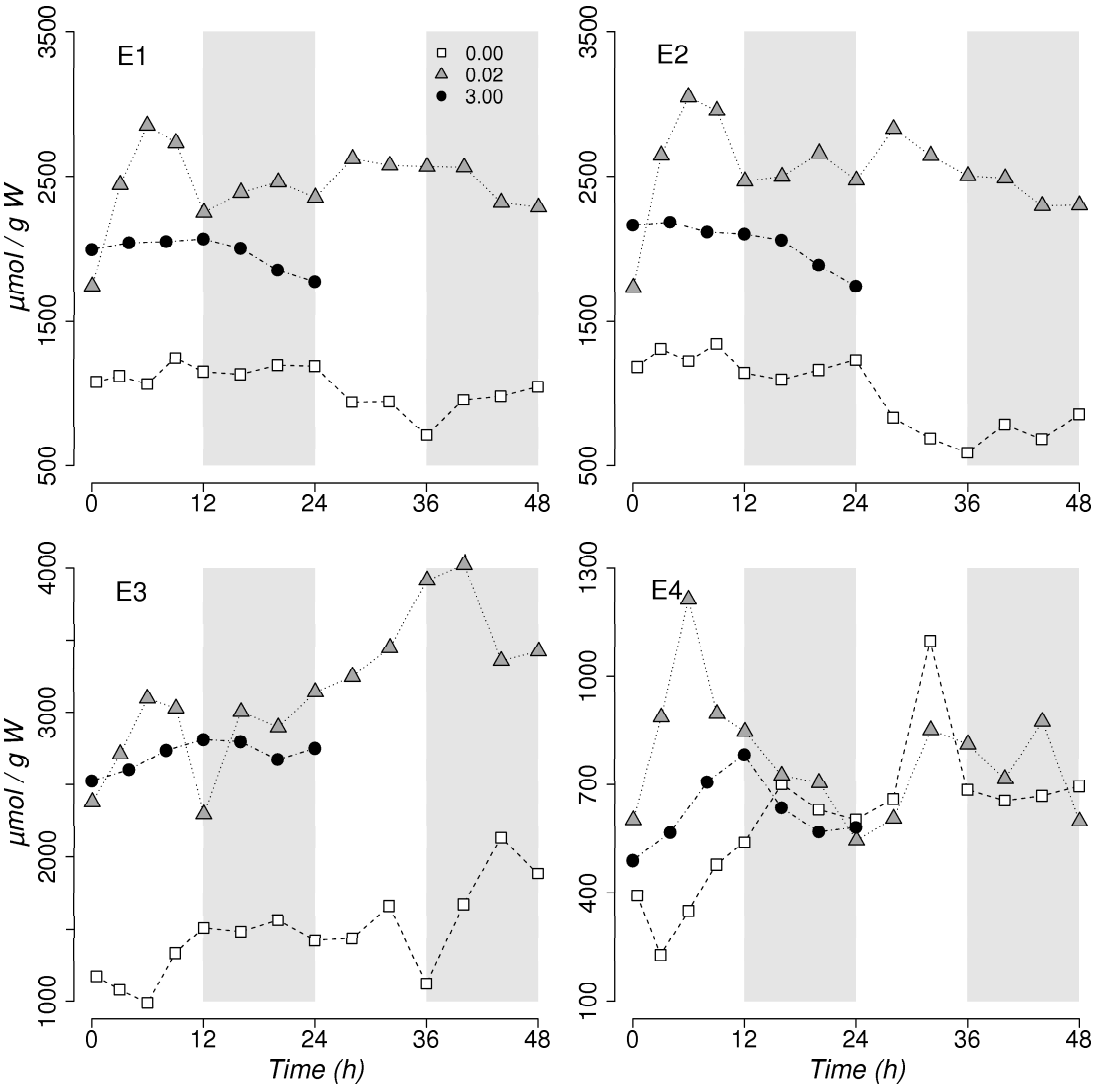


FIG. 2.8: *Diel changes in non-structural carboxylate C content (µmol C g^{-1} dw) of whole tomato plants (E1), leaves (E2), stems and petioles (E3) and roots (E4). Experiments as in figure 2.2. Malate, citrate and oxalate were analyzed to compute their C content. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants.*

3.7 mol mol^{-1} on adequate nutrition) did not change much with light (diel amplitude : 0.4) and nutrition (C :N increase = 0.5 after 48 h at 0.000 mol NO_3^- m^{-3}).

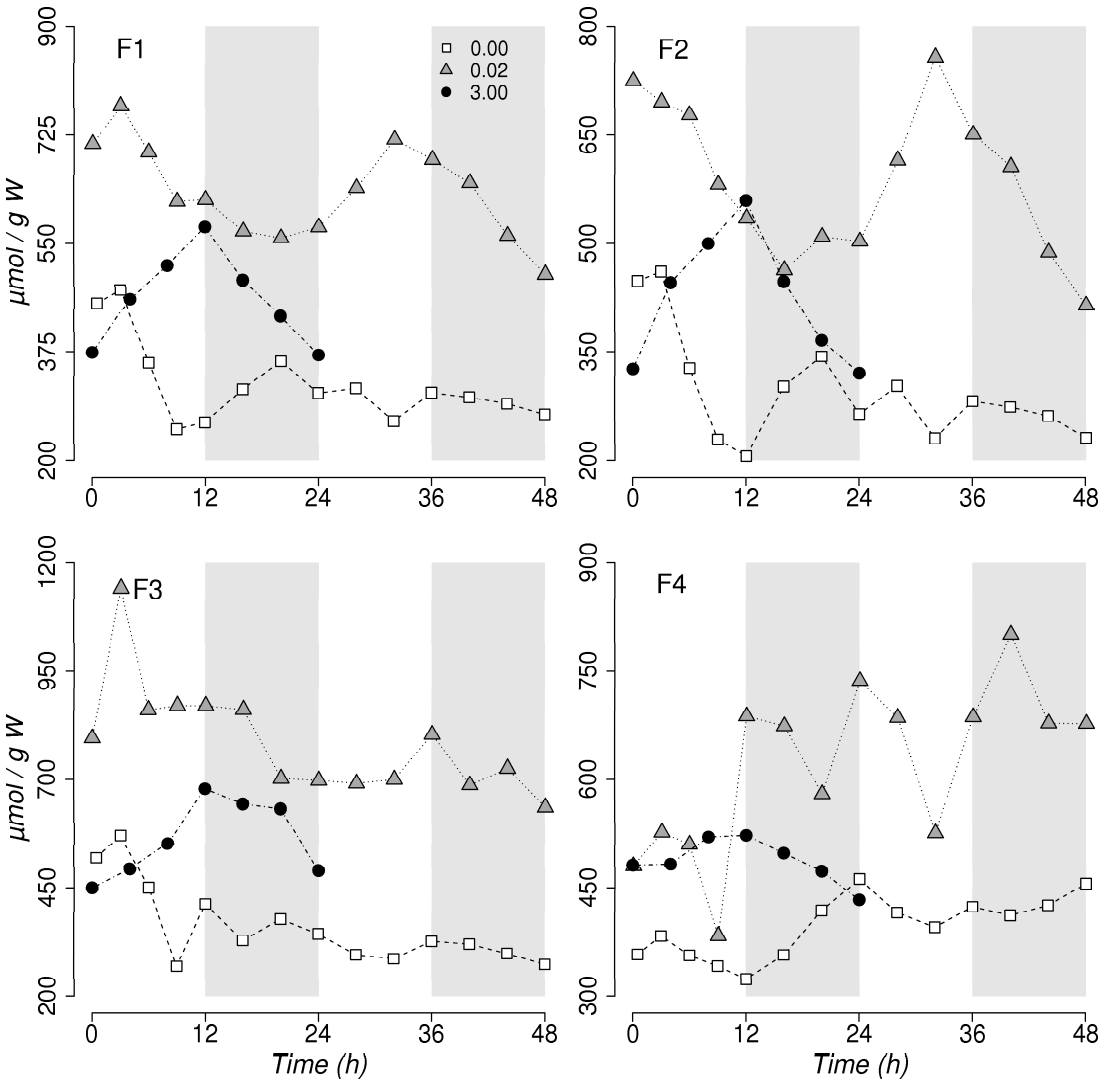


FIG. 2.9: *Diel changes in the free amino acid C content (µmol C g^{-1} dw) of whole tomato plants (F1), leaves (F2), stems and petioles (F3) and roots (F4). Experiments as in figure 2.2. N content was calculated from the free amino acid composition as determined by HPLC. Nutritional treatments in mol NO_3^- m^{-3} : 3.000, closed circles ; 0.020, triangles ; 0.000, squares. Light and dark areas denote the day and night periods, respectively. Symbols are the means of 6-8 plants.*

2.4 Discussion

This work is an attempt to describe the plant short-term growth and C/N status in response to light and N nutrition signals. Growth, as described by the usual dry biomass accumulation over time (fig. 2.2, squares) showed phasic patterns in the day-night cycle, being immediately stopped at night, which was expected. Indeed, C, whose acquisition depends exclusively on photosynthesis, amounts to around 40 % of dry matter. Interestingly, the same pattern was observed at leaf level, which fulfill the photosyn-

thetic needs for the whole plant. In contrast, non photosynthetic organs (stems, roots) are continuously fuelled C from the phloem and do not show so contrasted diurnal patterns.

Dry biomass was not so responsive to N nutrition. Indeed, long-term experiments in similar conditions showed that the critical solution [NO_3^-] limiting growth was around 0.300 mol NO_3^- m^{-3} for young tomatoes (Adamowicz and Lebot, personal communication). In our short-term experiments, however, the effect of a very low nitrate solution (0.020 mol m^{-3}) was null during one day, and slight the next day. In fact, our controls showed that photosynthesis was not affected. Applying a nitrate-free solution was more effective to restrict biomass buildup, without stopping it.

The interpretation of these observations seems straightforward if we consider separately 1) resource acquisition (*e.g.* photosynthesis), whose function is filling an endogenous resource store, 2) resource use for structural growth (Thornley, 1976; Gent and Enoch, 1983). Thus, we described both growth as structural biomass accumulation, and the status of endogenous C and N resources as the content of non-structural metabolites. We assumed that secondary metabolites (polyphenols, alkaloids etc.) which neither belong to structures or resources, did not create a significant bias.

Growth, as described by structural biomass accumulation did not show any significant response to light in plants with adequate nutrition (fig. 2.2, triangles). In this respect, the pattern was the same in all organs, because they all depend on their endogenous stores for growth, not from immediate photosynthesis. This does not mean that the growth rate should be necessarily the same over day and night : Gary (1988a) modeled the young tomato growth rate, or its associated respiration rate, as a saturable function of shoot non-structural carbohydrates (starch + soluble sugars) with a Michaelis constant equal to 6 % shoot dw. This is far below the actual content in our trials with adequate nutrition, which varied from 20 to 30 % shoot dw (dawn to dusk), implying that the C status was always saturating shoot growth needs. Such a high level was due to the irradiance/temperature combination in our experiments (12h photoperiod / 320 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD / 20 °C), as Gent (1986) showed that the tomato carbohydrate content increases with high PPFD :temperature ratios. In his trials with our experimental conditions, carbohydrates amounted to 15-25 % whole plant dw, close to 18-28 % in our experiments. At whole plant level, we calculated, from our carbon exchange rate and average Leaf Area Ratio (19.2 10^{-3} m^2 g^{-1}) measurements, the daily photosynthesis on adequate nutrition : 9100 μmol CO_2 g^{-1} dw. Thus, the C stored at dusk in carbohydrates and carboxylates (figs. 2.6-2.8, circles) amounts to more than a full day photosynthesis. We also calculated, on a C basis (18 das, adequate nutrition) the daily structural growth and the C reserves at dusk : 2.40 10^3 and 12.0 10^3 μmol C $plant^{-1}$, respectively. Thus, assuming a 75% respiration yield for growth (Ruget, 1981), this C store was enough to feed 3.8 days of growth at darkness. Unfortunately, we did not find any relevant respiration/growth data in relation to root C status. Indeed, their carbohydrate content (1.5-3.0 % dw) at adequate nutrition was low compared to the shoot contents and Michaelis constant. This raises the question of root growth limitation by their carbohydrate status.

Structural growth rate was more responsive to N than to light restrictions. Low solution [NO_3^-] raised the plant carbohydrate content to even higher levels (fig. 2.3) in accordance with the literature (Ball *et al.*, 1998; De Groot *et al.*, 2002). Thus, it is unlikely that the C status mediated this effect on growth, at least in leaf laminae. Instead, the

endogenous N store decreased dramatically in all organs (fig. 2.3). However, we measured 2 components of this store, which behaved differently : the raw nitrate and the free amino acid contents.

Nitrate was the most important and most variable component, reaching near null values in leaves and in roots after 48 h in N free solution (fig. 2.4 A2-A4). However, the stem, being by far the most important reservoir, still contained significant NO_3^- (A3), explaining why the whole plant structural growth was kept going at the end of the experiment (fig. 2.2 A1). We also calculated, on a N basis (18 das, adequate nutrition) the daily structural growth and the NO_3^--N reserves at dawn : 299 and 147 μmol N plant^{-1}, respectively. Thus, the nitrate store by itself can sustain only half a day of growth at full rate. Still, the rate of structural growth is more likely to be directly related to the free amino acid content, not to [NO_3^-]. Indeed, figure 2.2 A2 shows that the diel leaf growth at adequate nutrition (triangles) occurred at a constant rate, in spite of the extremely large diel changes in the leaf nitrate content (fig. 2.4 A2, circles). These changes are clearly related to the photosynthetic nature of NO_3^- assimilation in this organ (Pearson *et al.*, 1981; Ourry *et al.*, 1996). Indeed, when plants were fed with N-free solution (squares), the leaf [NO_3^-] fell significantly only at light, while in roots (A4, squares) whose nitrate assimilation is respiration dependent, it decreased also at night. Nitrate assimilation produces the necessary amino acids for structural growth. Contrary to nitrate, the free amino-N pool was significant in all organs during 48 h with N-free solution (fig. 2.5 B2-B4, squares). Thus, it is liable to explain why none of the organs stopped growth. Among them, the root growth was immediately depressed with N-free nutrition, but it accelerated to such a point that roots were growing faster than other organs at the end of the experiment. As a result, the structural root :shoot ratio changed gradually from 0.166 to 0.228. As the amino acid content was not greatly changed in this organ, we may suggest that roots responded to their carbohydrate not to their amino acid status. In all organs, the amino-N concentration proved sensitive both to light and to N nutrition. However, the free amino-acid content is the balance between NO_3^- assimilation, protein decay and synthesis, import from and export to other organs, resulting in intricate patterns which need modeling.

Chapitre 3

Growth model

3.1 Introduction

Growth may be considered as a process accumulating nutrient resources in various structures (genetic material, machinery metabolic molecules support, etc.) at the expense of endogenous stores. On this basis, Thornley (1977) modelled growth as the accumulation of carbon reserves at the expense of carbohydrates, and Gary (1988b) proposed a specific application to the tomato plant. We aim to apply the same principle to the relation linking growth to nitrogen resources in order to describe the short-term (in the nycthemeral cycle) changes in tomato nitrogen nutrition. For reason of simplicity, we propose to model N-dependant growth separately for each organ (*i.e.* roots, stems and leaves). Thereby, we can avoid the complete characterization and modelling of the N resource transport scheme within the plant.

Two major nitrogen stores, nitrate and total free amino acids respectively, seem to have a notable importance in the tomato (chapter 2), because of their abundance and the variability of their concentrations in response to both nitrogen nutrition and time of the day-night cycle. Thus, for the purpose of the model we will define organ growth from the accumulation of structural nitrogen, computed as the quantitative difference between the total nitrogen and N-(nitrate + free amino acids). It must be emphasized, however, that nitrate has to be reduced and assimilated into free amino acids before we may consider that its nitrogen is integrated into the structures. Therefore, we will consider hereafter that growth rate is dependant of a single resource, *i.e.* the store of free amino-N.

Such a study cannot be undertaken without interaction with the carbon resources. Indeed, the concentration of a particular resource does not seem to vary independently of the others. Thus, our observations (chapter 2) show that during the day-night cycle, free amino acids and starch accumulate concomitantly in the leaves during the light period but are depleted during the dark period. This can be a problem since a well-founded model relies on the carbon store, and explicitly on the starch content, to account for the growth of the tomato (Gary, 1988b). However, reports in the literature (Rufty *et al.*, 1988; Scheible *et al.*, 1997b; Paul and Driscoll, 1997) and our observations show that a low nitrogen nutrition can reverse the relationship between starch and free amino acids, leading to an accumulation of the former and a depletion of the latter. Thus, it may be expected that taking measurements during a day-night period in ex-

periments intended to control nitrogen nutrition, is an opportunity to dissociate the precise role of carbon and nitrogen resources.

In addition to effects on carbohydrates like starch, the C and N resources interaction also affects other metabolites. For instance, our observations have confirmed that opposite to starch, the concentration of non-structural organic acids (typically malic and citric) is dramatically decreased under low nitrogen nutrition. As these compounds constitute additional C sources able to sustain growth, the question arises whether the store of organic acids should be included explicitly into the growth model.

In this work, we propose to model the accumulation of structural nitrogen in the different organs of young tomato plants in relation to their nitrogen and carbon status. Following the reasons detailed above, the nitrogen status will be considered as the nitrogen content of the free amino acids, while the carbon status will undergo various hypotheses. Indeed, in the C store we will make a distinction between the carboxylic acids and the non-structural carbohydrates, the latter being separated into starch, insoluble and soluble sugars. The experimental data used to calibrate the proposed models are taken from the previous chapter (chapter 2) describing the changes of C and N staus in tomato organs during the day-night cycle under contrasted conditions of nitrate nutrition.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Plant material and growth conditions

Tomato seeds (*Solanum Lycopersicum* L., cv. Rondello, De Ruiter-Seeds, Bleiswijk-Holland) were sown directly in a NFT (Nutrient Film Technique) setup inside a growthroom, as described by Cardenas-Navarro (1998). Ten days after sowing (*das*) plant thinning was done to maintain plantlets in isolated conditions for light interception. Plantlets were selected according to visible homogeneity criteria based on the length of the first true leaf. In order to avoid any mechanical stress, plants were never manipulated until their harvest.

Average PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density, sensor LI-190, LICOR, Lincoln, USA) at plant level was 320 μmol m^{-2} s^{-1} (standard deviation = 22), during the 12 h photoperiod, and air humidity was set to 85 % (1 to 8 *das*) and to 75 % thereafter. Air and nutrient solution temperature were controled at 25°C (1 to 8 *das*) and 20°C thereafter.

The nutrient solution (3.00 mol m^{-3} NO_3^-) used to raise the plants from sowing until the experimental period (18-19 *das*), was made-up with deionized water and the following pure salts, in mol m^{-3} : KH_2PO_4, 1.00 ; K_2SO_4, 1.00 ; $Ca(NO_3)_2$, 1.50 ; $CaSO_4$, 2.00 ; $MgSO_4$, 1.50 ; EDTA-Fe, 43x10^{-3}. Other trace elements following Kanieltra formula 6-Fe (Hydro Azote, France), were added at 0.1 x 10^{-3} m^3 m^{-3}. During the experimental periods, the solutions with lower NO_3^- concentrations (0-0.02 mol NO_3^- m^{-3}) were obtained by replacing $Ca(NO_3)_2$ by equivalent amounts of $CaSO_4$. Solution changes were performed without any plant manipulation. The NFT system was disconnected from the raising solution tank and rinsed with 0.02 m^3 of a nitrate-free solution (regulated at 20 °C), which was discarded. Thereafter, the NFT system was connected to a second tank containing the new nutrient solution regulated at 20 °C. The whole process lasted

for about 10 minutes and solution flow interruption to roots never lasted for more than 2 minutes.

Solution [NO_3^-] was measured using a UV method (Vercambre and Adamowicz, 1996). It was monitored at 30-180 minutes during the growth period, and 5-30 minutes during experiments. Set concentrations were maintained by automatic injections of NO_3^- salts (containing 58 % K, 29 % Ca and 13 % Mg, in moles). Solution volume (0.06 m^3) and pH (5.0) were also maintained automatically at the same intervals by deionized water and sulfuric acid injections, respectively. Electro-conductivity was 1.20 mS.

3.2.2 Experiments

Six independent crops were grown to monitor plant growth, and N and C status, during 24-48 hrs under different regimes of NO_3^- nutrition. At the start of each trial, the raising nutrient solution was rapidly changed, if necessary, to a new concentration (0.02, 0.01 and 0.00 mM), which was automatically controlled and complemented at 5-10 minute intervals. Random harvests (6-12 plants) were performed at 3-4 hour intervals.

Experiment with ample N nutrition (3.00 mM NO_3^-) : This experiment measured the circadian accumulation of structural N (N_S), under non-limiting N nutrition. Eighteen days after sowing, from the beginning of the light period onwards, 7 harvests (6-8 plants per harvest) were performed avery 4 hours during 24 hours. This experiment was repeated independently.

Experiments with low N nutrition (0.02 and 0.01 mM NO_3^-) : Two independent tomato crops were grown under different low N supplies to characterize the circadian accumulation of N_S over 2 full day-night cycles. In each trial, at 18 *das*, starting from the beginning of the light period onwards, 14 harvests of 6 plants were taken, every 3 (harvests 1-5) or every 4 hours (harvests 6-14).

Experiments with N-free solution (0.00 mM NO_3^-) : These experiments monitored the circadian N_S accumulation under conditions of entire dependency on plants endogenous N stores. Two unrelated crops were raised in order to differentiate their initial N stores. In the first trial, the N-free solution was applied, 18 *das*, at the beginning of the light period when plant nitrate and free amino-acids are expected to be high and low, respectively. By opposition, in the second trial, the N-free solution was applied, 18 *das*, at the end of the light period when plant nitrate and free amino-acids are expected to be low and high, respectively. In both experiments, 14 harvests of plants were taken following the periodicity fixed in the low N nutrition experiments.

3.2.3 Plant analyses

At harvest, each plant was separated into 3 parts : roots, stems with petioles, and leaf laminae. Roots were rinsed with deionised water and spun-dry (2 min at 2800 g). Plant parts were weighed on an analytical balance, frozen with liquid N_2, kept at -80°C until they were freeze-dried (GENESIS 25ES, Virtis Company, Gardiner, USA). Dry material was weighed, ground to a fine powder (model MM301, Retsch, Haan, Germany) under liquid N_2 and stored at -20°C until analyses.

Total nitrogen content was measured on dry powders according to the Dumas method (Elemental analyser, ANA 1500, Carlo Erba, Milano, Italy). Plant NO_3^- was determined on water extracts of the dried material, in an auto-analyzer (AQUATEC 5500, Tecator, Höganäs, Sweeden) by colorimetry of nitrite after nitrate reduction by cadmium.

Free amino acids were analyzed by reverse-phase High Performance Liquid Chromatography after derivatisation with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and detected by fluorimetry (WATERS, Milford, MA, USA). Peak areas (Millenium software, WATERS) were compared to standards from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sugars and organic acids were determined after extraction by a water / methanol / chloroform mixture as described by Gomez *et al.* (2002). Soluble sugars (glucose, fructose and saccharose) and starch were measured by a micro enzymatic assay (microplate reader ELx800UV, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) following the method of Gomez *et al.* (2007).

Organic acids, malate and citrate, were measured enzymatically on microplates at pH 7,8 and 10 (glycylglycine buffer / L-glutamate-1, ref. 139 068, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively. Citrate was determined in 2 steps. At first, initial oxaloacetate and pyruvate were transformed into L-malate and L-lactate in the presence of malate-dehydrogenase (MDH, ref 127 914, Roche Diagnostics), lactate-dehydrogenase (ref 127 876, Roche Diagnostics) and reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide (NADH, ref 128 015, Roche Diagnostics). After 10 min, NADH absorbency was measured at 340 nm. Then, citrate-lyase (ref 132 076, Roche Diagnostics) was added to transform malate into oxaloacetate and finally malate. After 2 hrs, initial citrate concentration was inferred from the changes in the absorbance measured at 340 nm. Malate was also determined in 2 steps. At first, initial oxaloacetate was transformed into L-aspartate and cetoglutarate in the presence of glutamate-oxaloacetate-transaminase (ref 105 554, Roche Diagnostics) and NAD (ref 100 319, MP Biomedicals, Irvine, CA USA), and their absorbance at 340 nm was measured after 5 min. Then, MDH was added to the mixture, and the change in absorbance was measured at 340 nm, 90 minutes later.

3.2.4 Data processing

In this paper, growth is computed as the accumulation of N in structures (N_S in mol per organ) which depends on the concentration of endogenous C (cr in mol m^{-3}) and N resources (nr in mol m^{-3}). N resources are assumed to be mainly composed of free amino-acids (faa), and thus, nr was computed as the sum of each faa concentration multiplied by its own number of N atoms per molecule.

The organ non-structural nitrogen ($N_{nonstruc}$ in mol per organ) is assumed to be mainly contained in faa and nitrate, thus :

$$N_{nonstruc} = (nr + n_{NO_3^-}) * V \tag{3.1}$$

where $n_{NO_3^-}$ is the organ nitrate concentration in mol m^{-3}, and V is the organ water content (*i.e.* the difference between fresh and dry weights, in m^3 per organ).

Structural N (N_S) was computed as the difference between total and non-structural N :

$$N_S = N_{total} - N_{nonstruc} \tag{3.2}$$

where N_{total} is expresed in mol per organ

Various hypotheses were made about the nature of C resources, whether they were soluble sugars, starch or carboxylates. In each case, *cr* was computed as the sum of each molecule concentration multiplied by its number of C atoms per molecule.

Statistical analyses were performed using the R software (The R Project for Statistical Computing, http ://www.R-project.org). The model being based on a differential equation, we solved it by numerical integration using the Extend software (v.4.0, Imagine That, Inc., San Jose, CA USA). Parameters were estimated by optimization, *i.e.* by looking for the unique set of values which minimizes the sum of squared errors (SSE), *i.e.* the sum of squared differences between simulated and actual N_S in all 6 experiments.

3.3 The model

In this model, we will consider two N fluxes (figure 3.1) : a flux for growth (fg) where N from a resource pool is incorporated into growing structures, and a maintenance flux (m_N) corresponding to the recycling of N from degraded structures. We called it maintenance by analogy with carbon based models (Thornley, 1977). Thus, N_S accumulation rate is considered to be proportional to N_S and to the balance of fluxes (for variables and units, see table 3.1) :

$$\frac{dN_S}{dt} = N_S * (fg - m_N) \tag{3.3}$$

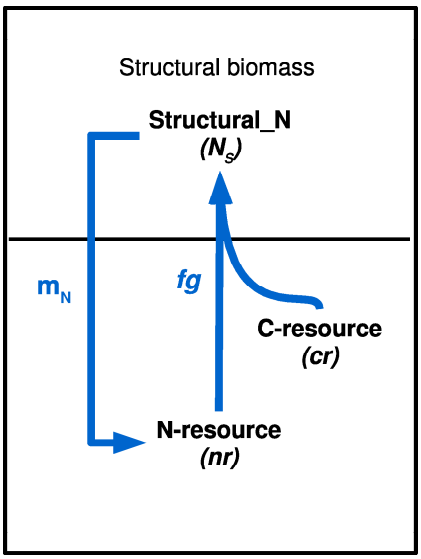


FIG. *3.1: N fluxes for growth*

As the C content of tissues is around 8 fold that of N, growth implies a much higher flux of the former. It is not our purpose to simulate this C flux, but as the concentration of C resources showed very large changes along our experiments, we assumed that they influenced the growth rate and thus fg. For this reason, we modeled fg as a saturable function of both N (nr) and C (cr) resource concentrations :

$$fg = fg_{max} * \frac{cr}{kg_C + cr} * \frac{nr}{kg_N + nr} \tag{3.4}$$

where kg_C and kg_N are Michaelis constants, and fg_{max} is the maximum rate when all resources are plentiful. Various hypotheses were compared concerning the nature of carbon resources implicated in the computation of cr : starch (C_A), soluble sugars (C_{SS}), organic acids (C_{OA}) or any combination of these.

At organ level, the rate of N recycling is assumed to be merely proportional to its structural N content (N_S). Thus, we define m_N as a constant rate in mol of recycled N per mol of structural N per hour.

Numerical integration of equation 3.3 simulates N_S accumulation along experiments, depending on the values of 4 parameters : fg_{max}, kg_C, kg_N and m_N. These were estimated by optimization (see the Materials and Methods section), but, to facilitate this task, it is useful to estimate their orders of magnitude *a priori*.

fg_{max} can be inferred from the base equation of the model. Indeed, dividing all terms by N_S in equation 3.3, we can define the relative rate of N_S accumulation (R_N) as :

$$R_N = \frac{dN_S}{N_S * dt} = fg - m_N \tag{3.5}$$

It is usually considered that in the exponential growth phase, R_N is approximately equal to the relative growth rate (R_W) (Ingestad and Agren, 1992) :

$$R_W = \frac{dW}{W * dt} \tag{3.6}$$

where W is the organ or plant biomass. Thus,

$$fg - m_N = R_N \approx R_W \tag{3.7}$$

It is reasonable to assume that m_N is negligible compared to fg_{max}, and thus that fg_{max} has the same order of magnitude as the maximum R_W. In our experiments with adequate N nutrition, R_W was 0.30 d^{-1}, and reached 0.40 d^{-1} with air CO_2 enrichment (not shown), which, on an hourly basis corresponds to : $fg_{max} > 0{,}017$ mol mol^{-1} h^{-1}.

We have no direct information about m_N. However, although it is certainly not equal to the maintenance coefficient for carbon, we may use the latter as a starting point. According to the literature (Murei, 1976; Ruget, 1981; Lambers *et al.*, 1983; Bijlsma and Lambers, 2000), it is around 1-2 % per day at 20°C. On an hourly basis, this corresponds to 0,0004-0,0008 mol mol^{-1} h^{-1}.

We estimated kg_C for soluble sugars (glucose + fructose + sucrose) from the published results of Gary (1988a) on the dark respiration of tomato seedlings. Assuming a common value for roots and shoots we computed that kg_C was around 80 mol C m^{-3} at 20 °C [1].

[1] For a graphic see Annexes 6.1.

Name	Units	Description
cr	mol m^{-3}	Resource-C concentration
fg	mol mol^{-1} h^{-1}	N flux for growth per unit of structural N
fg_{max}	mol mol^{-1} h^{-1}	Maximum N flux for growth
kg_C	mol m^{-3}	Michaelis constant for resource C
kg_N	mol m^{-3}	Michaelis constant for resource N
m_N	mol mol^{-1} h^{-1}	N turnover per unit of structural N
nr	mol m^{-3}	Resource-N concentration
N_S	mol $organ^{-1}$	Organ structural-N content
R_N	d^{-1}	Relative rate of N accumulation
R_W	d^{-1}	Relative growth rate (in biomass)
W	g $organ^{-1}$	Organ dry biomass
V	m^3 $organ^{-1}$	Organ water content

TAB. *3.1:* *Variables and parameters*

3.4 Results and discussion

3.4.1 Correlation between resources

In our set of experiments, 2 categories of resources were considered, faa being the main source of N, and various non structural compounds (soluble sugars, starch, organic acids) being the main sources of C. All these metabolites showed very large variations in their concentrations with N nutrition and with the time of sampling along the day-night cycle (chapter 2). When all these data are considered together, table 3.2 shows, however, that the concentration of faa (N_{AA}) was weakly linked to the total C status ($C_{SS+OA+A}$) at organ (R = -0.03 in roots to 0.26 in leaves) or at whole plant level (R = 0.26). Among the C resources, starch was generally the least correlated with faa (R = -0.01 to -0.11) except in roots where soluble sugars were very slightly related to faa (R = 0.06). Conversely, non-structural organic acids were generally the most highly correlated with faa (R = 0.58 to 0.75), except in roots (R = -0.15) where starch was better correlated.

3.4.2 Accumulation of structural nitrogen

Structural nitrogen accumulation (*i.e.* total N minus nitrate and faa N) was monitored in 6 independent crops by random sampling of plants along 24-48 hours. Due to the variability between plants among the crops, successive harvests did not result always in increasing N_S contents (open circles in figs 3.2-3.5). However, figure 3.2-E superimposes the results obtained from 2 independent crops, 18 *das* at 3 mol m^{-3} NO_3^- and shows that repeatability was good. Under conditions of low N nutrition (0.01 and 0.02 mol m^{-3} NO_3^- in figs 3.2 C-D, respectively), the initial N_S contents were similar to the experiments at 3 mol m^{-3} NO_3^-, but their increase along time occurred at a slower rate. When N nutrition was suppressed, N_S increase was still significant but its accumulation occurred at a very slow rate, either when the N-free solution was applied at the beginning of the light period (fig. 3.2-A) or at the beginning of the next night period (fig. 3.2 -B). At organ level, leaf laminae (fig. 3.3) and stems and petioles (fig. 3.4) behaved as described for whole plants. Roots, however, showed much less difference in their rates of N_S accumulation in function of N nutrition (fig. 3.5).

Whole plants							
	C_{SS}	C_{OA}	C_A	C_{SS+A}	C_{SS+OA}	$C_{SS+OA+A}$	N_{AA}
C_{SS}	1.000						
C_{OA}	0.339	1.000					
C_A	0.207	0.123	1.000				
C_{SS+A}	0.429	0.194	0.973	1.000			
C_{SS+OA}	0.733	0.889	0.189	0.349	1.000		
$C_{SS+OA+A}$	0.488	0.487	0.905	0.951	0.590	1.000	
N_{AA}	0.154	0.753	-0.011	0.026	0.621	0.260	1.000
Leaf laminae							
	C_{SS}	C_{OA}	C_A	C_{SS+A}	C_{SS+OA}	$C_{SS+OA+A}$	N_{AA}
C_{SS}	1.000						
C_{OA}	0.444	1.000					
C_A	-0.025	0.007	1.000				
C_{SS+A}	0.191	0.102	0.976	1.000			
C_{SS+OA}	0.783	0.904	-0.007	0.162	1.000		
$C_{SS+OA+A}$	0.307	0.387	0.907	0.957	0.414	1.000	
N_{AA}	0.347	0.689	-0.012	0.063	0.643	0.259	1.000
Stems and petioles							
	C_{SS}	C_{OA}	C_A	C_{SS+A}	C_{SS+OA}	$C_{SS+OA+A}$	N_{AA}
C_{SS}	1.000						
C_{OA}	-0.025	1.000					
C_A	0.631	0.098	1.000				
C_{SS+A}	0.900	0.042	0.906	1.000			
C_{SS+OA}	0.427	0.893	0.372	0.442	1.000		
$C_{SS+OA+A}$	0.576	0.752	0.669	0.690	0.939	1.000	
N_{AA}	-0.417	0.587	-0.119	-0.295	0.343	0.230	1.000
Roots							
	C_{SS}	C_{OA}	C_A	C_{SS+A}	C_{SS+OA}	$C_{SS+OA+A}$	N_{AA}
C_{SS}	1.000						
C_{OA}	0.684	1.000					
C_A	0.534	0.432	1.000				
C_{SS+A}	0.996	0.688	0.609	1.000			
C_{SS+OA}	0.964	0.854	0.538	0.962	1.000		
$C_{SS+OA+A}$	0.963	0.850	0.594	0.967	0.996	1.000	
N_{AA}	0.062	-0.156	-0.276	0.028	-0.012	-0.034	1.000

TAB. 3.2: *Correlation between plant metabolite concentrations (% dw) in the whole set of experiments with various NO_3^- nutritions and different sampling times during the day night cycle. Metabolites were grouped in the following categories : C_{SS}, soluble sugars (glucose + fructose + sucrose) ; C_{OA}, organic acids (malate + citrate) ; C_A, starch ; N_{AA}, free amino-acids*

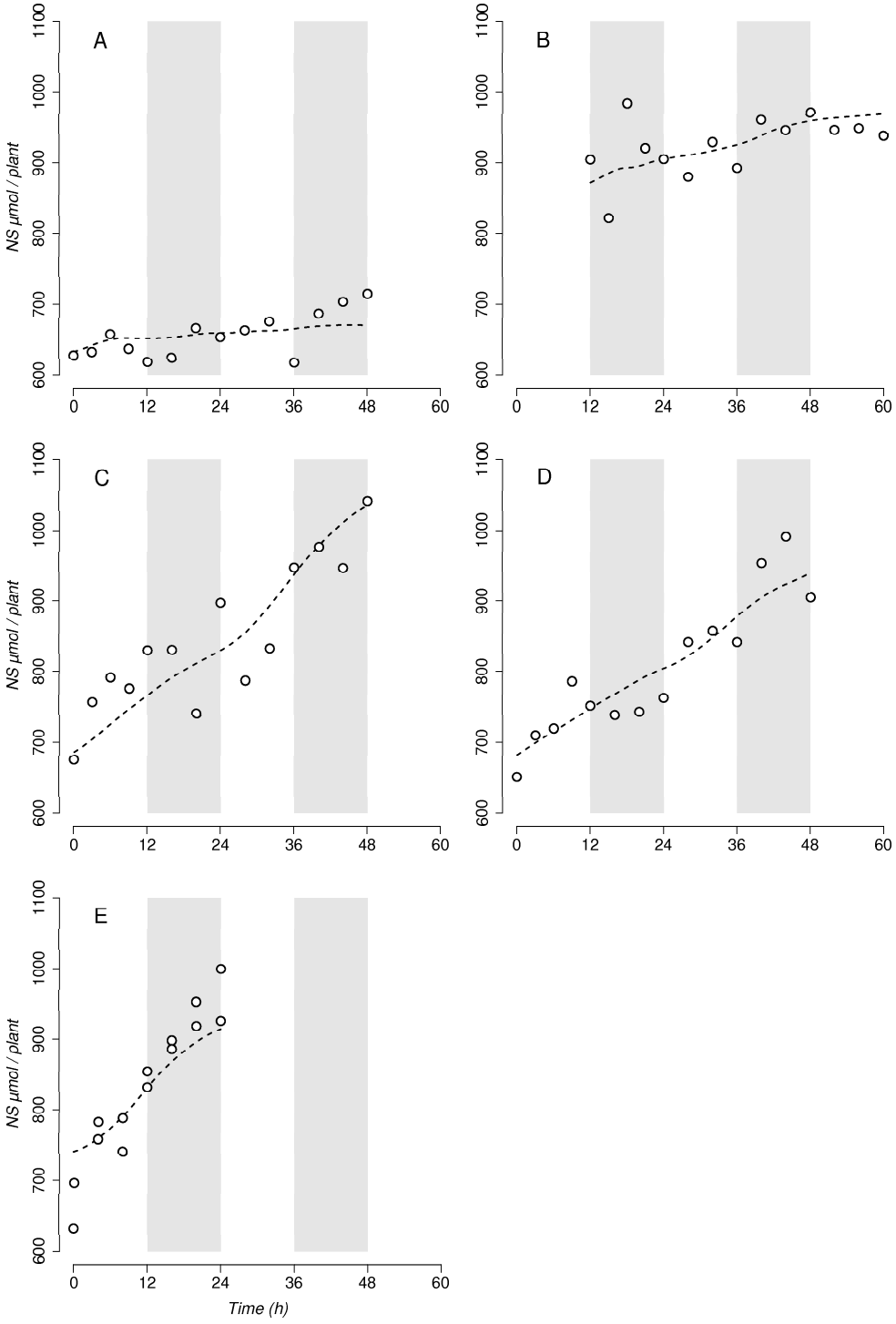


FIG. 3.2: *Nycthemeral accumulation of structural N (N_S) in whole tomato plants (symbols) and simulations (dashed lines), under various NO_3^- nutrition. Plants were grown (12h photoperiod) with 3.0 mol m^{-3} NO_3^-. Eighteen das, plants were sampled at 3-4 hrs intervals during 24-48 hrs and their N_S content was analysed. A, the nutrient solution was replaced by a N free solution at the beginning of the day period ; B, the nutrient solution was replaced by a N free solution at the beginning of the night period ; C, the NO_3^- concentration was changed from 3.0 to 0.01 mol m^{-3} at the beginning of the day period ; D, the NO_3^- concentration was changed from 3.0 to 0.02 mol m^{-3} at the beginning of the day period ; E, the NO_3^- concentration was kept unchanged at 3.0 mol m^{-3} and this experiment was repeated on an independent crop, explaining the presence of 2 dots (open circles) at each sampling time. Shaded areas denote the night period. Symbols are the means of 6-8 plants.*

Figures 3.2-3.5 do not show marked differences in the day and night N_S accumulation rates. This may perhaps result from a lack of sensitivity of our experimental procedure, although we may argue that the measured total plant dry weight accumulation showed a regular periodicity, being high during the day and null during the night (fig 2.2 in chapter 2). This proved true for whole plants and individual organs, except roots which showed a nearly constant nycthemeral growth rate. Thus, we believe that our experiments demontrate that the circadian N_S accumulation rate is much less periodic than that of biomass.

3.4.3 Parameter optimization and simulations

The parameter values were obtained by optimization in a individual organ and in a whole plant level. At the whole plant level, the Michaelis constant kg_C was found to be null when soluble sugars and organic acids were considered as the only C resources, separately or in combination. When starch was taken into account, this parameter optimized to higher values, the best fits (*i.e.* the lowest SSE) being obtained when starch was considered alone, not in combination with other C resources. This model behaviour is consistent with the very low correlation of starch with faa shown in table 3.2. However, it should be stressed that the optimized constant for starch ($kg_C \approx 40$ mol C m^{-3}) is far under the actual range of starch concentrations observed in our experiments (270 - 2800 mol C m^{-3}) implying that kg_C could not be determined accurately. Indeed, a sensitivity analysis (not shown) showed that SSE varied only slightly with kg_C, and table 3.3 shows that when kg_C was forced to zero, SSE increased by less than 0.1 % inferring that, in our experiments, a strictly N-based model predicts N_S accumulation as well as a N- and C-based model. Conversely, when kg_N was forced to zero (not shown), SSE was nearly doubled (SSE = 2944) implying that a strictly N based model is better than a strictly C based model to predict N_S accumulation. Although the parameter values changed with organs, the same observations apply to leaves and to stems and petioles (table 3.2). In these organs starch was also the best candidate for the fonction of comprehensive C resource, although our optimization produced low kg_C compared to actual starch contents (619 compared to 640-3300 mol C m^{-3} in leaf laminae, and 4 compared to 9-140 mol C m^{-3} in stems and petioles). In these organs, forcing kg_C to zero increased marginally SSE as it was the case for the whole plant. In roots, however, the best candidate for the function of comprehensive C resource was the store of organic acids, but table 3.2 shows that, on the SSE basis, the model could equally be based only on N resources as in other organs. On the one hand, the low sensitivity of the model to the C status appears straightforward because the experiments were designed to change specifically the plant N status through nutritional treatments in the absence of specific C treatments. On the second hand, this remains puzzling because plant C status underwent large changes, generally loosely correlated to N status (table 3.2) and because the tomato growth model of Gary (1988b) based on C status was parameterized on experimental data exhibiting a range of soluble sugars and starch concentrations similar to our own experiments.

Varying the C resource concentration, therefore, did not change noticeably the N_S accumulation rate, and only the parameter specific to N resources (kg_N) could be fitted. At whole plant level, it optimized to 19,0 mol N m^{-3}, which is inside the range of actual faa concentrations (7-23 mol N m^{-3}) in our experiments. SSE proved quite sensitive to the value of this parameter (not shown). This holds true also at organ level, where kg_N

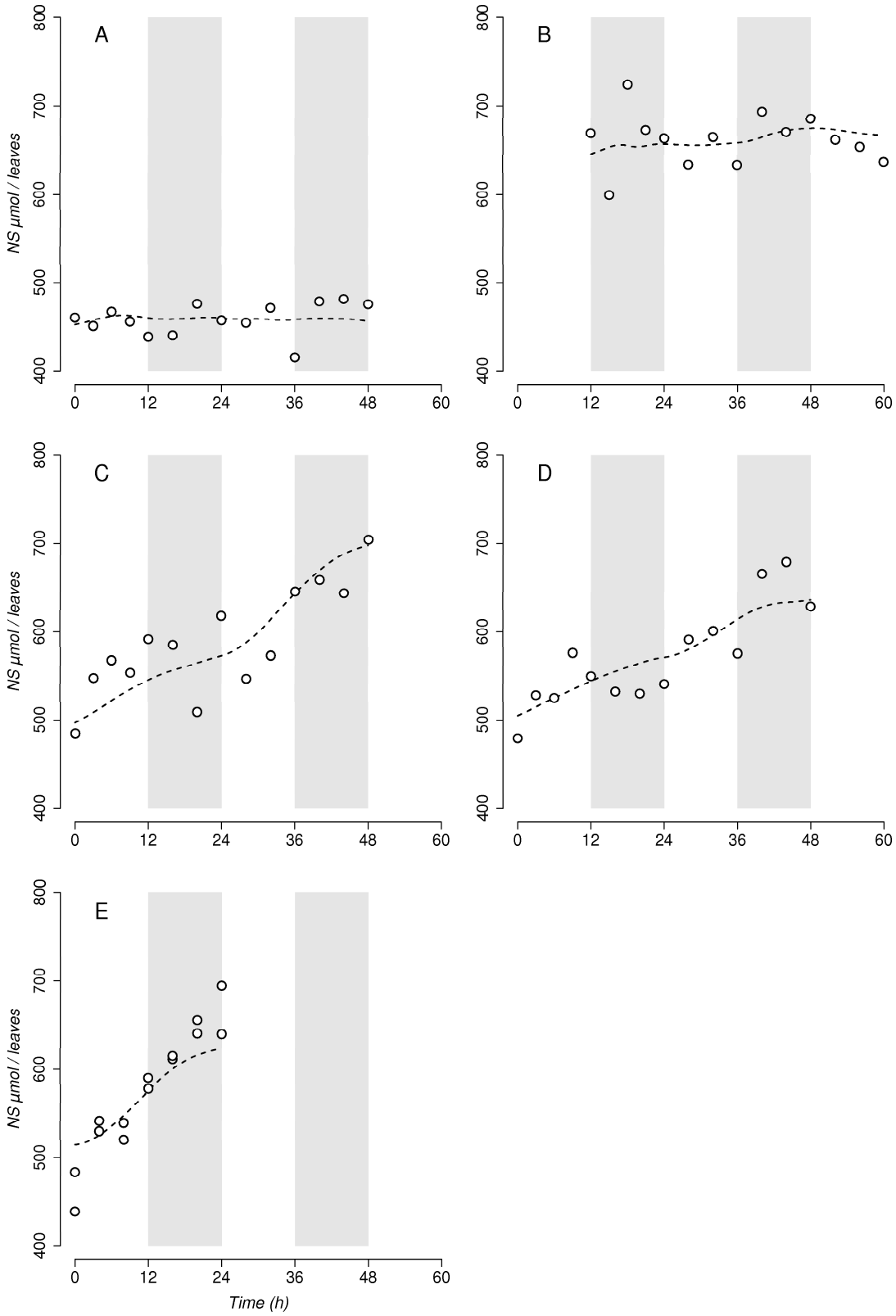


FIG. 3.3: *Nycthemeral accumulation of structural N (N_S) in tomato leaf laminae (symbols) and simulations (dashed lines), under various NO_3^- nutrition. Legend as in figure 3.2*

was higher in leaf laminae (28 mol N m^{-3}) than in other organs (7 and 6 mol N m^{-3} in stems and petioles and in roots, respectively) but was inside the actual range of their faa concentrations (9-40, 4-16 and 5-12 mol N m^{-3} in leaf laminae, stems and petioles, and in roots, respectively).

Nitrogen turnover was estimated by the parameter m_N, in moles of N recycled per mole N_S and per hour. Our estimates ranged from 1.3 to 2.5 % depending on the organ (table 3.3) with an overall value of 1.5 % at the whole plant level. This is a much higher value than expected from C maintenance (0.04-0.08 %) but not necessarily unlikely. Indeed, Thornley (1977) discriminated the structural carbon of the degradable structures (metabolic, genetic etc.) having a turnover, from the non-degradable structures (for instance supporting structures such as lignin, cellulose etc.) lacking any turnover. In contrast to C, most, if not all, structural N belongs to degradable structures (proteins, nucleotides etc) resulting in a higher overall turnover than that of carbon. It should be stressed that in our experiments with N-free nutrition, faa concentration never fell to null values in any organ (fig 2.5 in chapter 2). Our model, can explained this behavior from the constant recycling of N from the structures to the faa store. Thus, even when net structural growth ceases due to low N inputs, the N flux for growth (fg) is positive, but it is balanced by an equal recycling N flux (m_N).

The optimized maximum N_S accumulation rate, fg_{max}, reached a value of 3-7 % depending on the organ, with a mean value of 5 % at the whole plant level. Taking m_N into account, as suggested by eqn 3.7, this corresponds to a potential relative N_S increase of 3.7 % h^{-1}, (*i.e.* nearly 90 % d^{-1}). This value is rather high compared to actual relative growth rates, either showing model imperfections or indicating that endogenous N resources are always limiting for growth. It may be interesting, however, to compare this value to estimates produced by C based models. Gary (1988b) studied the dependency of respiration rates to carbohydrate content in young tomato plants. From his data at 20 °C, the maximum growth respiration that would occur when endogenous C resources are plentiful is around 4.7 g CO_2 g^{-1} d^{-1}. The corresponding relative growth rate, 700 % d^{-1}, is obtained by dividing this value by the CO_2 production factor (Penning De Vries *et al.*, 1974), estimated at 0.66 g CO_2 g^{-1} dw for tomato plants (Gary, 1988b). Thus, the maximum relative growth rate is much higher when it is extrapolated from the C based model than from our N based model, inferring that C is much less limiting for growth than nitrogen.

Dashed lines in figs 3.2 - 3.5 show the simulated N_S accumulation in our experiments, kg_C being forced to zero. These simulations suggest that there was a slightly periodic patter in the nycthemeral N_S accumulation rate in leaf laminae, *i.e.* higher during the day period and lower during the night period (fig 3.3). In other organs (figs 3.4-3.5), such a periodic behaviour was barely perceptible. The simulations are also consistent with our observation that leaves responded immediately to changes in N nutrition (figs 3.3 A-E), while N_S accumulation rate was only slightly affected in roots (figs 3.5 A-E), the stems and petioles behaviour being intermediate (figs 3.4 A-E). Indeed, when plants were submitted during 48 hours to a N-free nutrient solution, the N_S accumulation ceased in leaf laminae (figs 3.3A-B) while it increased by around 60 μmol $plant^{-1}$ in roots (figs 3.5 A-B). Except in roots where simulation fits experimental data in any experiment (fig 3.5 A-E), less satisfactory fits were obtained for other organs under adequate N nutrition (figs 3.3 E-3.4E). Indeed, leaf and stem growths are clearly underestimated by the model when N is plentiful. Several reasons may explain this weakness. For instance, the Michaelis function (eqn 3.4) was arbitrarily chosen to

describe the relationship between growth and resource concentration. This function is popular for modelling purposes because it saturates and lays on two meaningful parameters. However, it is not unique, and other simple mathematical functions may deserve to be compared. Other reasons deal with the definition of resource nitrogen. Indeed, for the sake of simplicity, we pooled all free amino-acids as a unique N source for growth, but it could be considered that growth responds only to a subset of free amino-acids. Conversely, there may be other significant N resources that were not analysed (peptides ?), resulting in an underestimate of the resource pool and in an overestimate of N_S.

An increase of the root : shoot dry weight ratio is one of the most documented effects of N limitation (Ericsson, 1995; Reynolds and Chen, 1996; Agren and Franklin, 2003). Figure 3.6 shows that in our experiments, N limitation resulted also in an increase of the root : shoot (N_S : N_S) ratio. This ratio was also computed from leaf laminae (fig. 3.3, dashed line), stem and petiole (fig. 3.4, dashed line), and root (fig. 3.5, dashed line) simulated values. At first sight, the resulting predicted root :shoot N_S ratios seem to fit remarkably well the actual experimental data under conditions of N deprivation (fig. 3.6 A-B, dashed line) or limitation (fig. 3.6 C-D, dashed line). Nevertheless, due to the shoot growth rate underestimation under adequate nutrition, the predicted root :shoot N_S ratios (fig. 3.6 E, dashed line) increased actually more than observed data.

3.5 Conclusion

Plant and organ growth was defined here as the accumulation of structural nitrogen and modelled in relation to their endogenous resource N content. This model remains perfectible, both in its form and in the definition of N resources, solely considered as a unique store of free amino-acid. However, it simulates some interesting properties of nycthemeral organ growth and accounts for the consequences of N limitation or deprivation in the nutrient solution. It shows mainly that, in contrast to biomass accumulation, the nycthemeral structural N accumulation is monotonous, inferring that the difference in accumulation rate between day *versus* night is slight while increasing from roots to leaf laminae. The model responds to N nutrition only through organ free amino-acid content, showing that a mere source-sink relationships may be sufficient to model some growth aspects (N_S accumulation, root :shoot N_S ratio) in relation to N availability.

Although the organ carbon status (*i.e.* starch, soluble sugars and non-structural carboxylates) showed very large changes along our experiments, both during the day-night cycle and with N nutrition, the model proved only sensitive to endogenous free amino-acid content. This raises the question whether growth is indeed only sensitive to the organ N status, as suggested by our experiments, or if it is also dependent on the C status. Complementary experiments with C specific treatments (air CO_2 enrichment, for instance) would be necessary to solve this question.

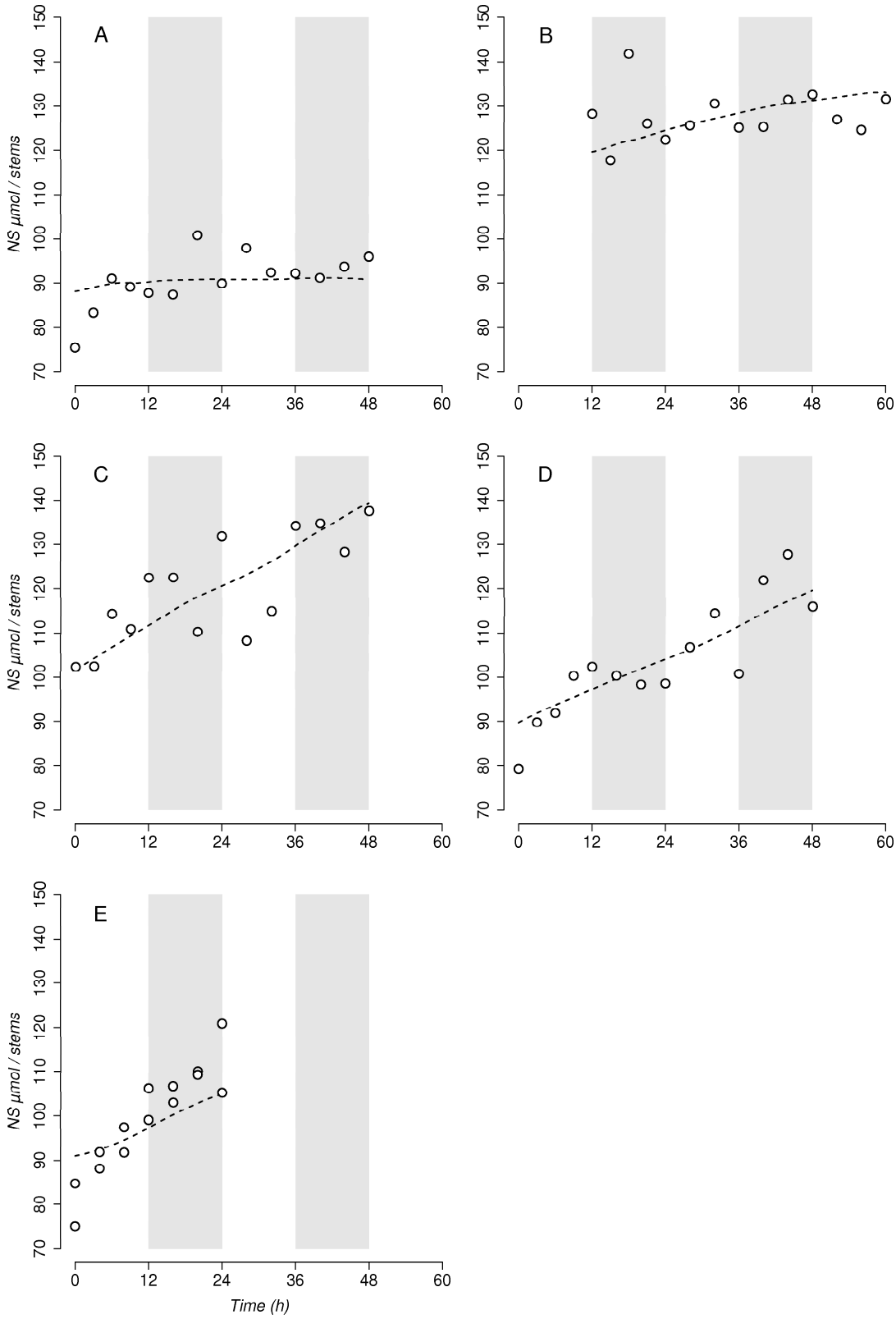


FIG. 3.4: *Nycthemeral accumulation of structural N (N_S) in tomato stems and petioles (symbols) and simulations (dashed lines), under various NO_3^- nutrition. Legend as in figure 3.2*

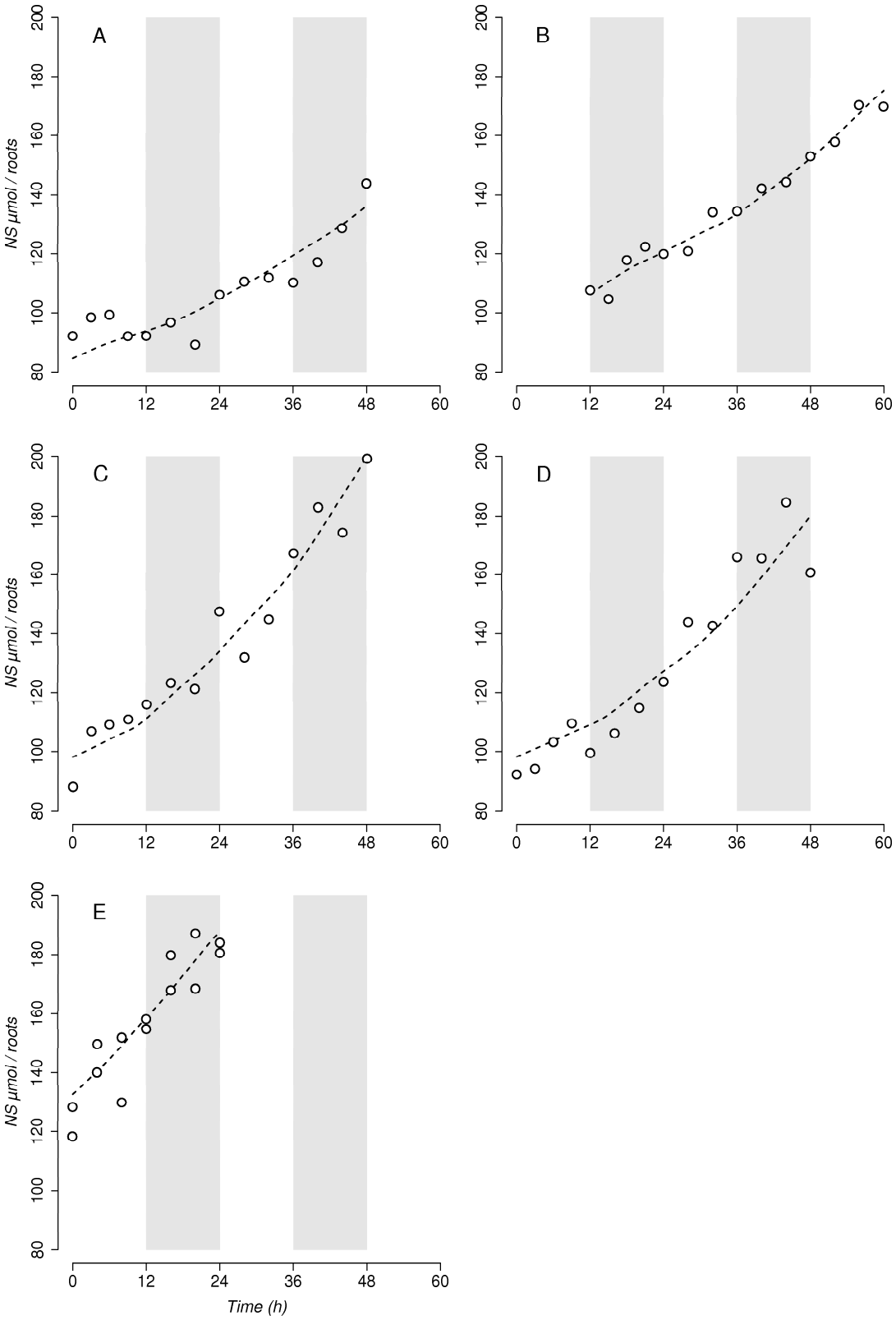


FIG. 3.5: *Nycthemeral accumulation of structural N (N_S) in tomato roots (symbols) and simulations (dashed lines), under various NO_3^- nutrition. Legend as in figure 3.2*

Parameters	C and N resources	N resources only
Whole plants		
fg_{max}	0.049	0.052
m_N	0.0016	0.0153
kg_C (C_A)	40	0
kg_N	14.7	19.0
$\overline{SSE}$	1607	1608
Leaf laminae		
fg_{max}	0.064	0.047
m_N	0.0122	0.0145
kg_C (C_A)	619	0
kg_N	36.0	28.4
SSE	850	871
Stems and petioles		
fg_{max}	0.036	0.032
m_N	0.0076	0.0130
kg_C (C_A)	4.4	0
kg_N	15.0	7.3
$\overline{SSE}$	45	45
Roots		
fg_{max}	0.075	0.068
m_N	0.0247	0.0249
kg_C (C_{OA})	7.1	0
kg_N	2.0	6.3
$\overline{SSE}$	55	56

TAB. 3.3: *Parameter values for the model described in eqns 3.3-3.4. They were optimized by minimizing the squared errors between actual data (symbols in figs 3.2-3.5) and the fitted models. Two hypotheses were examined : either with both N and C resources (between parentheses, C_A, C_{SS} or C_{OA} stand for starch, soluble sugars or organic acids, respectively. They indicate the nature of the C resource that provided the best fits), or only with N resources (obtained by forcing kg_C to null). Dashed lines in figs 3.2-3.5 were obtained with the parameters of the models based only on N resources.*

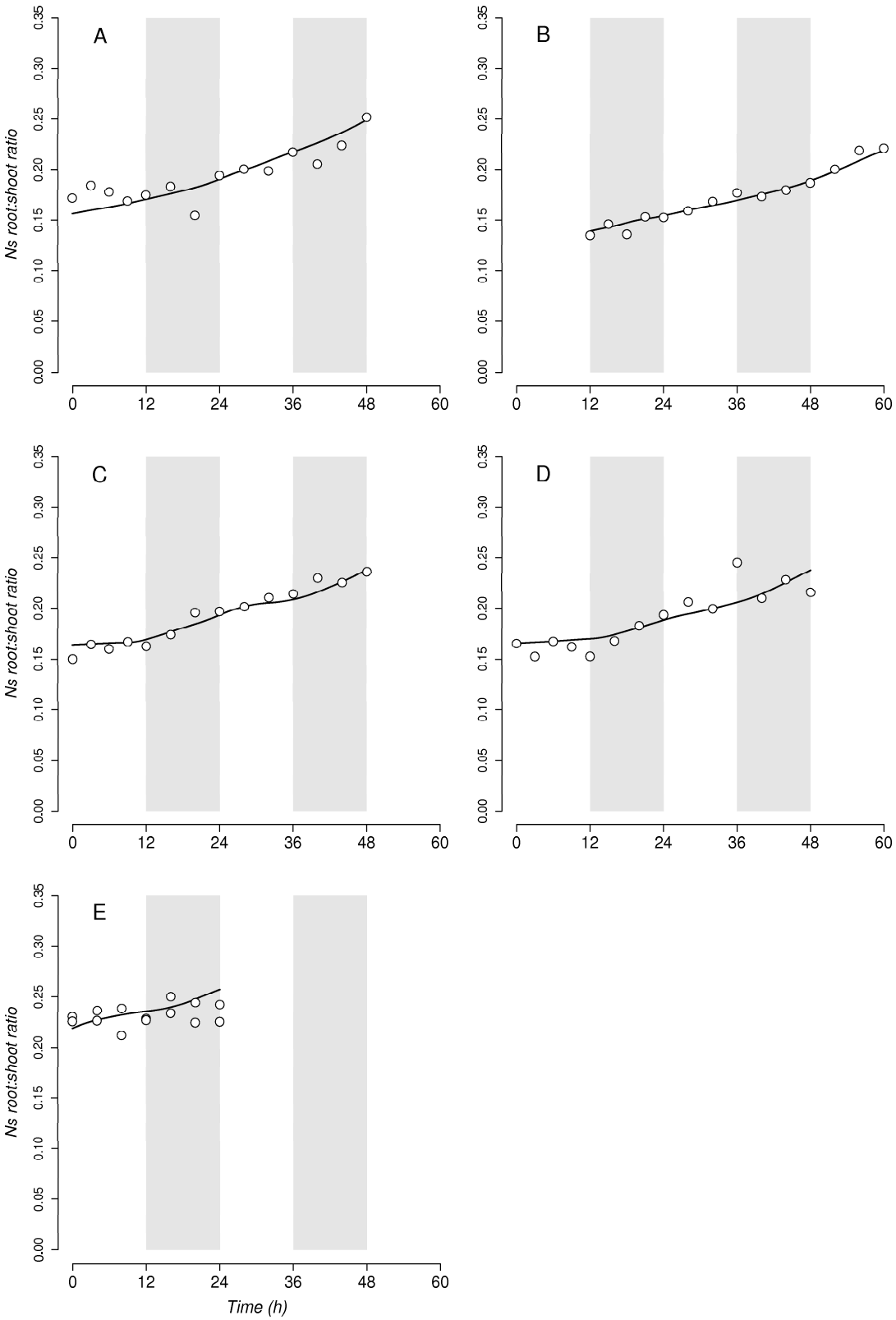


FIG. 3.6: *Structural N Root : Shoot Ratio. The ratios between root N_S and shoot N_S were computed from actual (symbols) and simulated (dashed lines) data in figs 3.3-3.5. Nutritional treatments (A-D) as described in fig 3.2*

Chapitre 4

Modélisation de la réduction du nitrate

4.1 Introduction

L'assimilation du nitrate est une activité métabolique mettant en jeu une série de réactions enzymatiques successives menant à la formation d'acides aminés. La première réaction consiste en la réduction du nitrate en nitrite catalysée par la nitrate réductase, considérée comme l'étape limitante de toute la chaîne d'assimilation (Campbell, 1999). Ceci justifierait de modéliser l'assimilation de l'azote comme étant égale à la réduction du nitrate, une simple réaction enzymatique à laquelle on pourrait appliquer une fonction saturable de type Michaélien. Néanmoins, cette simplicité n'est qu'apparente puisque la littérature signale, d'une part, que l'activité de la nitrate réductase varie en fonction des conditions d'environnement (Kaiser and Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004; Lea *et al.*, 2006; Debouba *et al.*, 2006) et n'est pas répartie uniformément dans tous les organes, et d'autre part, que le substrat de la réaction, le nitrate, se trouve compartimenté à diverses échelles, de la plante à la cellule. Ainsi, il a été suggéré de ventiler le stock endogène de nitrate en deux compartiments différant par la disponibilité du nitrate pour l'assimilation (Ferrari *et al.*, 1973; Adamowicz, 1980; Gojon *et al.*, 1991b; Miller and Smith, 1996).

En effet, nos premières tentatives (non montrées) de modélisation du flux de réduction (fr) en fonction de la teneur globale du nitrate dans la plante se sont heurtées à cette difficulté. Ayant ajusté les paramètres d'un modèle sur la base d'expériences en condition de nutrition pléthorique (3,0 mol NO_3^- m^{-3}), les prédictions d'activité d'assimilation après une restriction brutale de l'alimentation azotée surestimaient fortement (environ 3 fois) la vitesse d'assimilation effective. Ceci confirmait que le nitrate anciennement absorbé était plus lentement assimilé que celui récemment absorbé et qu'il était impératif de compartimenter notre représentation du système. Ceci peut être fait de multiples manières dont nous avons retenu et comparé quelques modalités présentées ci-dessous.

Une première approche (fig. 4.1) consiste à transposer à la plante entière la représentation que l'on se fait du système à l'échelle cellulaire, c'est à dire avec seulement 2 compartiments significatifs, dits l'un de « stockage » et l'autre « métabolique ». Le premier contiendrait potentiellement une grande quantité de nitrate en raison, soit de

son grand volume, soit de la forte concentration que le nitrate pourrait y atteindre. En revanche, il serait dénué de toute activité nitrate réductase. Le second contiendrait, au contraire, la totalité du système d'assimilation mais seulement une faible fraction du nitrate. A l'échelle cellulaire, ces compartiments ont été identifiés comme la vacuole et le cytoplasme, respectivement, où la concentration du nitrate est plus ou moins directement mesurable (Miller and Smith, 1996), bien que difficilement. Transposés à l'échelle de la plante entière, ces compartiments sont conceptuels et donc inaccessibles à toute mesure. Ils ne sont appréhendés qu'au travers de simulations numériques. En revanche, le flux de réduction (Fr), unique, peut être directement mesuré par bilan azoté établi à l'échelle de la plante entière. Dans cette représentation, le flux d'absorption du nitrate (Fu) alimente directement l'un des deux compartiments évoqués. Nous avons retenu l'hypothèse d'une alimentation directe du «pool» métabolique (fig. 4.1), plus apte à simuler une baisse brutale de Fr lors d'une restriction azotée, et, accessoirement, conforme au modèle cellulaire (*i.e.* le nitrate chargé depuis la sève xylémienne doit traverser le cytoplasme, où réside la nitrate réductase, avant d'atteindre la vacuole).

Une seconde approche (fig. 4.2) consiste à établir une correspondance entre compartiments et classes d'organes. Cette proposition est suggérée par le constat fait au chapitre 2 de l'existence d'un stock de nitrate bien plus considérable dans les tiges et pétioles de tomate que dans les feuilles (figs 2.4 A2-A3, chapitre 2), alors que ces derniers organes sont censés, d'après la littérature (Andrews *et al.*, 1984; Cramer *et al.*, 1995; Debouba *et al.*, 2006) être de loin les plus actifs pour l'assimilation du nitrate. En pratique, nous avons envisagé deux degrés de compartimentation. Le modèle le plus simple (fig. 4.2-a) n'envisage que deux compartiments : l'un constitué de la globalité des racines, tiges et pétioles, servirait de réservoir de nitrate mais serait inactif pour son assimilation ; l'autre, identifié aux feuilles, serait seul impliqué dans l'assimilation. C'est, bien entendu, une représentation caricaturale de la plante puisque tous les organes sont impliqués dans la réduction, mais à des degrés divers. En revanche, cette vision est économe en termes de compartiments et de flux et peut être comparée à la première approche dite des compartiments métaboliques et de stockage, si ce n'est que, dans le cas présent, ils correspondent à des entités mesurables et que le flux de transport entre compartiments est unidirectionnel. Le modèle le plus compartimenté (fig. 4.2-bc) établit une correspondance avec les 3 classes d'organes rencontrés par le nitrate au cours de son cheminement de la solution nutritive aux feuilles : les racines, les tiges et pétioles, et enfin les limbes. Comme dans le cas précédent (fig. 4.2-a), la concentration de l'ion dans chaque compartiment est directement accessible à la mesure. En revanche, la plupart des flux spécifiés sont inaccessibles et ne sont déduits que de simulations numériques. En particulier, le bilan azoté évoqué au paragraphe précédent ne permet pas de mesurer Fr dans chaque classe d'organe de la plante entière et intègre, mais uniquement leur somme. De plus, les représentations de la figure 4.2 nécessitent de formaliser les transferts de nitrate entre organes, ce qui nous a conduit à confronter 2 variantes : dans l'une, les compartiments sont disposés en série (fig. 4.2-b), *i.e.* les limbes tirent tout leur nitrate des tiges, qui elles-mêmes le tiennent des racines ; dans l'autre, les compartiments sont disposés en parallèle (fig. 4.2-c) grâce au réseau de transport xylémien, ce qui implique que les racines peuvent délivrer l'ion aux feuilles sans qu'il ait été stocké dans les tiges. Cette dernière représentation est sans doute la plus réaliste, mais c'est aussi la moins économe en termes de flux et de paramètres. Il n'est donc pas avéré que ce soit la plus pertinente.

Dans ce chapitre, nous montrerons les vitesses d'assimilation du nitrate de la plante

entière, telles qu'elles ont été mesurées au cours des nycthémères et selon les traitements azotés qu'ont subi les cultures décrites dans le chapitre 2. Nous utiliserons ce jeu de données pour paramétrer les différentes variantes de modèles ci-dessus décrites, et nous comparerons les simulations que ces dernières génèrent.

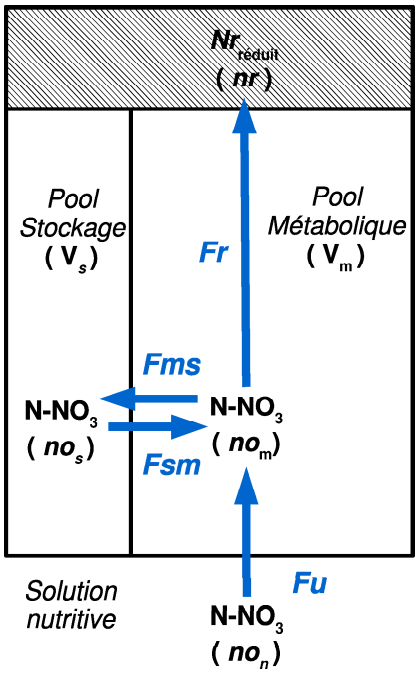


FIG. 4.1: *Représentation conceptuelle de la compartimentation du nitrate en seulement deux «pools», l'un, uniquement de stockage, et l'autre d'assimilation du NO_3^-. Variables : no_n, no_s et no_m, concentration du nitrate en solution et dans les compartiments de stockage et métabolique, respectivement ; V_s et V_m, volumes d'eau des compartiments de stockage et métabolique, respectivement ; Fu et Fr, flux d'absorption et de réduction du NO_3^-, respectivement ; Fms et Fsm, flux de transports entre les compartiments métaboliques et de stockage ; nr, concentration en azote réduit.*

4.2 Matériel et méthodes

Les conditions de culture en phytotron, les expériences et les méthodes analytiques sont décrites au chapitre 3. En bref, les tomates (*Solanum lycopersicum* L., cv. Rondello, De Ruiter-Seeds, Bleiswijk-Holland) ont été semées directement et cultivées dans un dispositif hydroponique NFT à recirculation. La solution nutritive était régulée en température, pH et teneur en nitrate. A intervalles réguliers (5 à 180 minutes), un dispositif automatique mesurait le pH et la concentration du nitrate et injectait des solutions mères (seringues 1,0 ml ref 1001 TLL et modules pousse-seringues PSD2, Hamilton Company, Reno, Nevada USA) pour les ajuster aux valeurs de consigne. De même, des ajouts d'eau permutée étaient automatiquement effectués pour ramener le niveau à sa consigne dans la cuve de solution (détecteurs optiques LLE-102000, sensibilité 1 mm, Honeywell International Inc., Morristown, NJ USA). Les volumes apportés étaient mesurés par des débitmètres en ligne (DPL-1V05 G4 L343, 0,025-0,5 litres min^{-1}, Kobold Messring GmbH, Hofheim, Allemagne). Au début de chaque période expérimentale, la solution était éventuellement remplacée pour modifier la concentration du NO_3^-. Ensuite des échantillons aléatoires (6-8 plants) ont été prélevés pour analyse à des in-

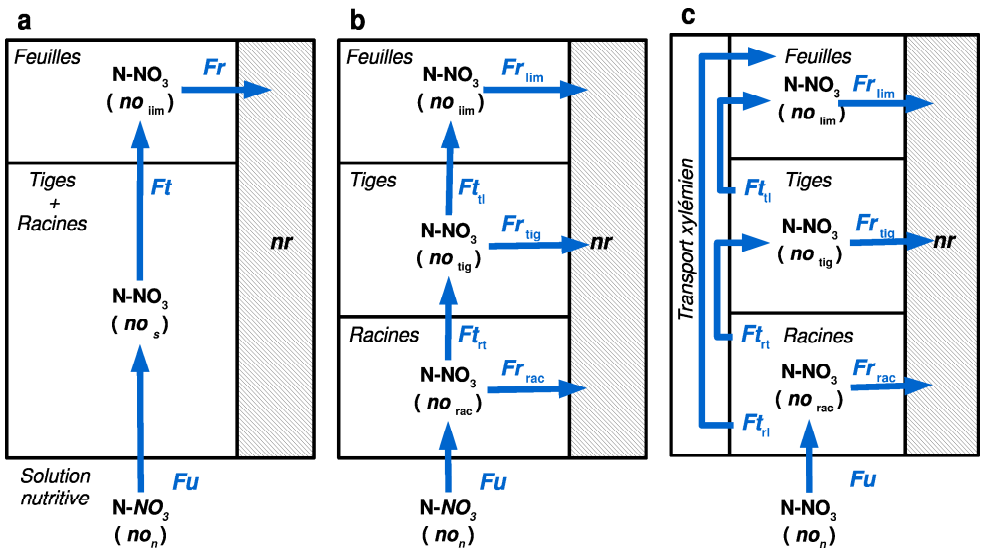


FIG. 4.2: *Trois représentations de la compartimentation en organes vis-à-vis du métabolisme du nitrate : a) les racines, tiges et pétioles sont regroupés en un unique compartiment de stockage, inactif pour l'assimilation de l'ion, contrairement aux feuilles qui sont la seule source d'azote réduit (nr) pour l'ensemble de la plante ; b) et c) chaque classe d'organe participe à l'assimilation du nitrate à partir de son stock local et contribue à l'accumulation d'azote réduit de l'ensemble de la plante, les deux schémas se distinguant par le mode de transfert du nitrate entre organes (en série et en parallèle, respectivement). Variables : no et Fr, concentration et flux de réduction du NO_3^- (les indices n, rac, tig et lim désignent la solution nutritives, les racines, les tiges et les limbes respectivement) ; Fu, flux d'absorption ; Ft, flux de transfert entre organes (les indices rt, rl et tl désignent les transferts des racines aux tiges, des racines aux limbes, et des tiges aux limbes, respectivement).*

tervalles de 3-4 heures pendant 24-48 heures selon les expériences.

4.2.1 Mesure de l'absorption du nitrate

Le flux d'absorption (Fu, mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1}) est mesuré entre les temps i et j par bilan sur la solution nutritive en utilisant les données fournies par l'automate de régulation de la solution nutritive :

$$Fu_{i,j} = \frac{(V_{n,i} \times no_{n,i}) - (V_{n,j} \times no_{n,j}) + no_{sm} \times \sum_{t=i}^{j-1} V_{sm,t}}{n \times (j-i)} \tag{4.1}$$

avec i et j, temps initiaux et finaux de la période pour laquelle Fu est calculé ; n, nombre de plantes ; no_{sm} et $V_{sm,t}$, concentration et volume de solution mère NO_3^- injectée au temps t ; $no_{n,t}$ et $V_{n,t}$, concentration et volume de la solution nutritive au temps t. Les concentrations sont en mol NO_3^- m^{-3}, les volumes en m^3 et les temps en heures.

Le volume de solution nutritive au temps t est calculé à partir du volume de consigne V_{nc} de la solution et de l'ajout d'eau effectué pour rétablir le niveau de consigne $V_{H_2O,t}$:

$$V_{n,t} = V_{nc} - V_{H_2O,t} \tag{4.2}$$

Le calcul (non montré) de l'incertitude ϵ_{Fu} sur le flux d'absorption montre qu'elle est d'autant plus faible que le nombre de plants et l'intervalle de temps sont élevés, ou que les consignes de concentration (no_c) et de volume de solution sont basses, selon la

formule :

$$\epsilon_{Fu} \approx 2 \times no_c \frac{\epsilon_V + V_{nc} \times \epsilon r_{no}}{n \times (j - i)} \tag{4.3}$$

avec ϵ_V et ϵr_{no} les incertitudes, absolues sur le volume et relatives sur la concentration, respectivement. Dans nos conditions, le volume de solution était de 60 10^{-3} m^3, la sensibilité sur son niveau de 80 10^{-6} m^3 et la reproductibilité des analyses de nitrate meilleure que 1 pour mille, donnant l'incertitude :

$$\epsilon_{Fu} \approx 280 \times 10^{-6} \frac{no_c}{n \times (j - i)} \tag{4.4}$$

En pratique, ϵ_{Fu} était donc différente selon les expériences (en fonction de la concentration du nitrate), et au sein de celles-ci selon l'heure en raison de la diminution du nombre de plantes au fur et à mesure des récoltes. Dans le cas le plus défavorable, *i.e.* à la dernière récolte (24 plantes en culture) et lorsque la concentration était la plus élevée (3 mol NO_3^- m^{-3}), $\epsilon_{Fu} \approx 8 \times 10^{-6}$, et dans le cas le plus favorable, 92 plantes en culture et 10 10^{-3} mol NO_3^- m^{-3}, $\epsilon_{Fu} \approx 8 \times 10^{-9}$ mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1}.

4.2.2 Mesure de la vitesse de réduction du nitrate

Le flux de réduction (Fr, mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1}) est calculé à partir des flux d'absorption mesurés et de la variation d'état des plantes récoltées aux temps i et j :

$$Fr_{i,j} = Fu_{i,j} - \frac{\sum_{org} \left(no_{org,j} \times V_{org,j} \right) - \sum_{org} \left(no_{org,i} \times V_{org,i} \right)}{j - i} \tag{4.5}$$

avec i et j, temps initiaux et finaux de la période pour laquelle Fr est calculé ; $no_{org,t}$ et $V_{org,t}$, concentration de NO_3^- (mol m^{-3}) et volume d'eau (m^3 $organe^{-1}$) mesurés aux temps t dans chacune des classes d'organe. L'incertitude sur Fr (ϵ_{Fr}) est la somme de ϵ_{Fu} et de l'incertitude sur la mesure de variation d'état des plantes. Cette dernière est fonction des aléas de l'échantillonnage (c.v. 20%), de la précision analytique sur le nitrate (5%) et sur le volume d'eau (40 10^{-12} m^3) des plantes. Nous l'estimons de 0,3 à 2 10^{-6} mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1} pour nos expériences à faible et forte concentration. Ceci montre que ϵ_{Fu} est la composante la plus importante de ϵ_{Fr} dans les expériences à forte concentration, mais devient négligeable à faible concentration.

4.2.3 Mesure de la transpiration

Le dispositif expérimental permet d'estimer la transpiration, considérée comme approximativement égale à l'absorption d'eau, en se basant sur les ajouts $V_{H_2O,t}$. Nous avons vérifié qu'au long de la croissance de nos jeunes plantes, la transpiration journalière était proportionnelle à la surface foliaire, et qu'au sein du nycthémère elle était plus intense de jour que de nuit. Nous avons admis que, dans les conditions reproductibles du climat du phytotron, le flux transpiratoire horaire h (en m^3 H_2O m^{-2} limbes h^{-1}) ne prenait que deux valeurs, l'une en période de jour (h_{jour}), l'autre en période de nuit (h_{nuit}), qui compte tenu de la photopériode de 12 heures se calcule comme suit :

$$h = \frac{\sum_{t=i+1}^{j} V_{H_2O,t}}{12 \times \bar{A}} \tag{4.6}$$

avec i et j, les heures de transition de la nuit au jour pour le calcul de h_{jour}, ou le contraire pour le calcul de h_{nuit} ; $\bar{A}$ la surface foliaire moyenne (m^2 pl^{-1}) des plantes pour la période considérée. Dans nos conditions, nous avons trouvé les valeurs suivante : $h_{jour} = 295 \times 10^{-6}$ et $h_{nuit} = 116 \times 10^{-6}$.

Nous avons contrôlé que les valeurs obtenues de cette manière sont du même ordre de grandeur que celles indiquées par une pince à photosynthèse, à conditions égales de température, rayonnement et humidité.

4.2.4 Calculs

Les graphiques et les calculs de régressions non linéaires ont été exécutés sur R (The R Project for Statistical Computing, http ://R-project.org). Les équations différentielles ont été résolues numériquement à l'aide du logiciel spécialisé Extend (v 4.0, Imagine That, Inc., San Jose, CA USA), avec un pas de temps inférieur à 1 minute. Les paramètres ont été estimés par optimisation en recherchant le jeu de valeurs qui minimise la somme des carrés des écarts (SCE) entre les mesures et les simulations. Certaines variables d'état (teneurs en sucres, en acides aminés et en eau des tissus, surface foliaire) sont utiles aux modèles, mais non simulées par ceux-ci. Leurs valeurs, injectées dans les calculs, ont été calculées par intrapolation linéaire des mesures effectuées lors des récoltes périodiques.

4.3 Les modèles

4.3.1 Réduction du nitrate

Le flux de réduction du nitrate à l'échelle de la plante entière (Fr) est égal à la somme des flux dans chaque classe d'organe (s'il y a lieu). Comme dans le chapitre 2, nous considérerons que les activités métaboliques sont proportionnelles au contenu en azote structural de l'organe considéré, ce qui permet d'écrire :

$$Fr = \sum_i (N_{S_i} \times fr_i) \tag{4.7}$$

l'indice « i » désigne la classe d'organe (limbes, tiges et pétioles, racines) ou toute combinaison selon le modèle choisi. N_{S_i} et fr_i sont le contenu en N structural (mol pl^{-1}) et le flux de réduction par unité de N_S (mol N mol^{-1} N_S h^{-1}) de la classe d'organe.

L'activité de réduction dépend *a priori* de la concentration de deux ressources principales : le nitrate dans le compartiment considéré (concentration notée no_i) et les ressources carbonées (concentration en équivalent C notée cr_i) nécessaires à la formation des acides aminés (concentration en équivalents N notée nr_i). De plus, la littérature signale une rétro-inhibition par ces derniers (Foyer *et al.*, 2003), ce qui conduit à la formulation générale :

$$fr_i = g(no_i) \times g'(cr_i) \times g''(nr_i) \tag{4.8}$$

avec no_i, cr_i et nr_i en mol m^{-3}.

Le nitrate et les molécules carbonées ayant le statut de ressources, on est *a priori* fondé d'appliquer aux fonctions $g(no_i)$ et $g'(cr_i)$ un formalisme saturable. Cependant,

nous avons vu au chapitre 2 que la croissance n'a pas été affectée significativement par les variations du statut carboné au cours de nos expériences, indiquant que cette ressource était sans doute saturante. Il serait raisonnable de supposer qu'il en est de même pour l'assimilation du nitrate. Néanmoins, la littérature (Morcuende *et al.*, 1998; Kaiser *et al.*, 1999; Kaiser and Huber, 2001) signale que le statut carboné est aussi impliqué dans la régulation de l'activité nitrate-réductase et nous pouvons envisager un impact significatif des sucres alors même qu'ils seraient saturants en tant que source de carbone. En ce qui concerne le nitrate, le formalisme saturable coule de source pour le modèle de la figure 4.1 parce que no_i s'y identifie à no_m, autrement dit à la concentration du nitrate sur le site même de l'enzyme. En revanche, dans les modèles de la figure 4.2, les no_i représentent des valeurs globales à l'échelle de la classe d'organe et ne représentent pas nécessairement celles des sites d'assimilation. Dans ces cas de figure, la réduction pourrait être limitée par la mobilité du nitrate (entre compartiments métabolique ou non au sein des organes). Pour ces raisons, nous avons comparé aussi bien pour le nitrate que pour le carbone, deux formulations simples, chacune n'ayant qu'un seul paramètre, la première étant saturable et l'autre non :

$$g(x_i) \; ou \; g'(x_i) = \frac{x_i}{kr_{x,i} + x_i} \tag{4.9}$$

$$g(x_i) \; ou \; g'(x_i) = x^{\alpha_{x,i}} \tag{4.10}$$

avec x_i représentant soit no_i soit cr_i ; $kr_{x,i}$, constante de Michaelis et $\alpha_{x,i}$ constante sans dimension (notées $kr_{N,i}$ et $\alpha_{N,i}$ pour le nitrate, $kr_{C,i}$ et $\alpha_{C,i}$ pour les ressources carbonées).

En l'absence de bases bibliographiques solides pour formaliser la rétro-inhibition par les acides aminés, nous avons envisagé 4 modalités, la première représentant une absence d'inhibition dans nos conditions expérimentales, et les 3 suivantes des formalismes de rétroaction issus de la littérature (Cardenas-Navarro *et al.*, 1999a; Cram, 1983) :

$$g''(nr_i) = M_i \tag{4.11}$$

$$g''(nr_i) = (M_i + 1) - (M_i + 1)^{\frac{nr_i}{sp_{a,i}}} \tag{4.12}$$

$$g''(nr_i) = M_i \times \left(1 - \frac{nr_i}{sp_{a,i}}\right) \tag{4.13}$$

$$g''(nr_i) = \frac{M_i}{\left(1 + \frac{nr_i}{sp_{a,i}}\right)} \tag{4.14}$$

avec M_i constante, en mol N assimilé mol^{-1} N_S h^{-1} et $sp_{a,i}$ en mol équivalent N aminé m^{-3}.

Les trois dernières fonctions ont en commun d'être décroissantes avec nr_i et de ne faire intervenir que 2 paramètres : M_i est la valeur maximum du flux de réduction, qui est atteinte lorsque $nr_i = 0$; $sp_{a,i}$ représente la concentration nr_i pour laquelle $g''(nr_i) = 0$ dans les eqns 4.12-4.13, et représente une constante d'inhibition dans la dernière équation. La figure 4.3 permet de comparer ces 4 fonctions.

4.3.2 Transfert du nitrate entre compartiments

Les deux types de compartimentation envisagés, conceptuelle ou en organes, se distinguent notablement par la représentation des flux de transfert du nitrate et la modélisation que l'on peut en faire :

Compartimentation conceptuelle

La figure 4.1 fait apparaître deux flux, Fms du compartiment métabolique vers celui de stockage, et Fsm dans le sens inverse, dont nous admettrons qu'ils sont proportionnés au contenu en N structural de la plante entière ($N_{S_{pl}}$) :

$$Fms = N_{S_{pl}} \times fms \tag{4.15}$$

$$Fsm = N_{S_{pl}} \times fsm \tag{4.16}$$

avec Fms et Fsm en mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1}, fms et fsm en mol NO_3^- mol^{-1} N_S h^{-1}.

Nous proposons un flux de stockage proportionnel à la concentration du nitrate dans le compartiment source :

$$fms = ks \times no_m \tag{4.17}$$

avec ks en m^3 mol^{-1} N_S h^{-1} Ce même formalisme peut aussi s'appliquer au flux de remobilisation :

$$fsm = ks \times no_s \tag{4.18}$$

Néanmoins, ces équations supposent que le stockage et le déstockage s'effectuent avec la même facilité. Nous avons donc testé une alternative à l'équation 4.18 basée sur la cinétique des transporteurs :

$$fsm = \frac{fsm_{max} \times no_s}{ksm + no_s} \tag{4.19}$$

avec fsm_{max}, flux maximum (mêmes unités que fsm) et ksm, constante en mol m^{-3}

Les équations 4.18-4.19 ne génèrent aucune régulation de la concentration du nitrate dans le compartiment métabolique, comme cela a été proposé. Pour remédier à cette limitation, nous avons envisagé une relation d'homéostasie :

$$fsm_{max} = (M_{fsm} + 1) - (M_{fsm} + 1)^{\frac{no_m}{sp_m}} \tag{4.20}$$

avec M_{fsm} valeur maximum potentielle de fsm_{max} (avec les mêmes unités), sp_m consigne (mol m^{-3}) de concentration du nitrate dans le compartiment métabolique.

Compartimentation en classes d'organes

A la différence du cas précédent, la figure 4.2 ne fait apparaître que des flux unidirectionnels allant dans le sens du flux transpiratoire. On notera Ft_{ij} et ft_{ij} les flux de transport en mol NO_3^- pl^{-1} h^{-1} et mol NO_3^- mol^{-1} N_S h^{-1} respectivement, de la classe d'organe i à la classe j (i et j pouvant représenter les limbes, les tiges et pétioles, les racines, ou une combinaison), avec :

$$Ft_{ij} = N_{S_{pl}} \times ft_{ij} \tag{4.21}$$

On admettra que le nitrate est porté par le flux d'eau entre compartiments :

$$ft_{ij} = kt_{ij} \times ft_{H_2O} \times g'''\left(no_i, no_j\right) \tag{4.22}$$

avec kt_{ij}, constante sans dimensions ; ft_{H_2O}, flux d'eau ramené à l'unité de N structural ($m^3\ mol^{-1}\ N_S\ h^{-1}$).

La fonction $g'''\left(no_i, no_j\right)$ exprime l'existence d'une relation entre ft_{ij} et les concentrations des compartiments source (i) et éventuellement puits (j). Pour cette fonction, nous avons testé quatre modalités :

$$g'''\left(no_i, no_j\right) = no_i \tag{4.23}$$

$$g'''\left(no_i, no_j\right) = no_i - kn_j \times no_j \tag{4.24}$$

$$g'''\left(no_i, no_j\right) = no_i \times \left(sp_j - no_j\right) \tag{4.25}$$

$$g'''\left(no_i, no_j\right) = \frac{no_i}{km_i + no_i} \times \left(sp_j - no_j\right) \tag{4.26}$$

La première modalité (eqn 4.23) ne dépend que de la concentration du compartiment source, le flux ne peut être nul qu'à la condition que $no_i = 0$, et il est parfaitement possible que le compartiment puits devienne plus riche que la source. Dans la deuxième modalité (eqn 4.24), le flux dépend du gradient de concentration entre source et puits, la constante kn_j (sans unité) autorisant, à l'équilibre, des concentrations différentes entre source et puits. Les deux dernières relations expriment l'existence d'une homeostasie dans le compartiment puits, telle que le flux devienne nul lorsque no_j atteint une concentration de consigne sp_j. Ces deux expressions diffèrent par l'effet de la source, simplement proportionnel (eqn 4.25) à l'image d'une diffusion, ou saturable (eqn 4.26) à l'image d'un transport.

Le flux d'eau ascendant est une fonction de la transpiration (h, défini dans la section 4.2), elle même dépendante de la surface des limbes (A en $m^2\ pl^{-1}$) :

$$ft_{H_2O} = (h + h_c) \times \frac{A}{N_{S_{pl}}} \tag{4.27}$$

Le paramètre h_c est une constante (mêmes unités que h) représentant le flux d'eau ascendant qui persiste même lorsque la transpiration est nulle.

4.3.3 Changements d'état

L'équation fondamentale qui permet de simuler à la fois les flux et les contenus en nitrate des divers compartiments, exprime qu'au sein d'un compartiment i, la vitesse de variation du contenu en nitrate Qno_i est égale au bilan des flux entrants et sortants (I_i et E_i, respectivement en mol $NO_3^-\ h^{-1}$).

$$\frac{dQno_i}{dt} = \sum I_i - \sum E_i \tag{4.28}$$

Le contenu Qno_i (mol NO_3^-) se calcule à partir de la concentration et du volume d'eau du compartiment :

$$Qno_i = no_i \times v_i \times N_{S_i} \tag{4.29}$$

avec v_i ($m^3\ mol^{-1}\ N_{S_i}$, volume d'eau du compartiment i par unité d'azote structural). Sa variation s'écrit :

$$dQno_i = dno_i \times v_i \times N_{S_i} + no_i \times dv_i \times N_{S_i} + no_i \times v_i \times dN_{S_i} \tag{4.30}$$

En combinant 4.28 et 4.30, et après réarrangement, on obtient :

$$\frac{dno_i}{dt} = \frac{1}{v_i \times N_{S_i}} \times \left(\sum I_i - \sum E_i\right) - no_i \times \left(\frac{dN_{S_i}}{N_{S_i} \times dt} + \frac{dv_i}{v_i \times dt}\right) \tag{4.31}$$

Nous noterons R_{N_i} et R_{v_i} les vitesses relatives de variation des contenus en N structural et en eau, respectivement :

$$R_{N_i} = \frac{dN_{S_i}}{N_{S_i} \times dt} \tag{4.32}$$

$$R_{v_i} = \frac{dv_i}{v_i \times dt} \tag{4.33}$$

ce qui permet d'écrire l'équation 4.31 sous la forme :

$$\frac{dno_i}{dt} = \frac{1}{v_i \times N_{S_i}} \times \left(\sum I_i - \sum E_i\right) - no_i \times (R_{N_i} + R_{v_i}) \tag{4.34}$$

Cette relation dévoile deux grandes composantes de la vitesse de variation de la teneur en nitrate d'un compartiment : la première représente le bilan des flux ; la seconde représente l'effet de dilution ou de concentration imputable aux variations de dimensions du compartiment lui-même.

Les flux entrants et sortants sont contingents de la représentation du système (figs 4.1-4.2) et du compartiment considéré. Les flux de transfert sont généralement entrants pour un compartiment, et sortants pour un autre. En revanche, le flux d'absorption (Fu) est uniquement entrant, et les flux de réduction sont toujours sortants.

Les termes R_{N_i}, qui représentent la vitesse relative de croissance (sur une base d'azote structural) sont des valeurs mesurables ou simulables par le modèle du chapitre 2. Il n'est pas dans les ambitions de ce travail de modéliser le contenu en eau des organes et donc R_{v_i}. Nous avons constaté comme Cardenas-Navarro *et al.* (1998), que v_i variait nettement au cours des nycthémères, avec une augmentation nocturne et une diminution diurne et nous avons simplement injecté les valeurs mesurées de R_{v_i} dans le modèle. Cependant, dans le cas représenté dans la figure 4.1, les compartiments sont conceptuels et nous avons dû, dans ce cas précis, émettre des hypothèses pour spécifier les volumes d'eau concernés et estimer les R_{v_i} correspondants. Nous avons considéré que les variations temporaires du volume total d'eau (v) sont entièrement supportées par le compartiment de stockage, ce qui entraîne :

$$dv_s = dv \tag{4.35}$$

En contrepartie v_m est constant, et donc :

$$dv_m = 0 \Rightarrow R_{v_m} = 0 \tag{4.36}$$

Nous avons fixé arbitrairement v_m à 10% de la valeur moyenne de v (voir table 4.1) constatée dans l'ensemble de nos expériences. Ce choix a été dicté par la transposition du modèle cellulaire, dans lequel v_m représente le volume du cytosol et v_s, celui de la vacuole. Le volume de stockage se déduit du volume d'eau total et de v_m :

$$v_s = v - v_m \tag{4.37}$$

La vitesse de variation relative de ce volume s'écrit :

$$R_{v_s} = \frac{dv_s}{v_s \times dt} \tag{4.38}$$

En remplaçant par les valeurs des équations 4.35 et 4.37, on obtient :

$$R_{v_s} = \frac{đv}{(v - v_m) \times dt} \tag{4.39}$$

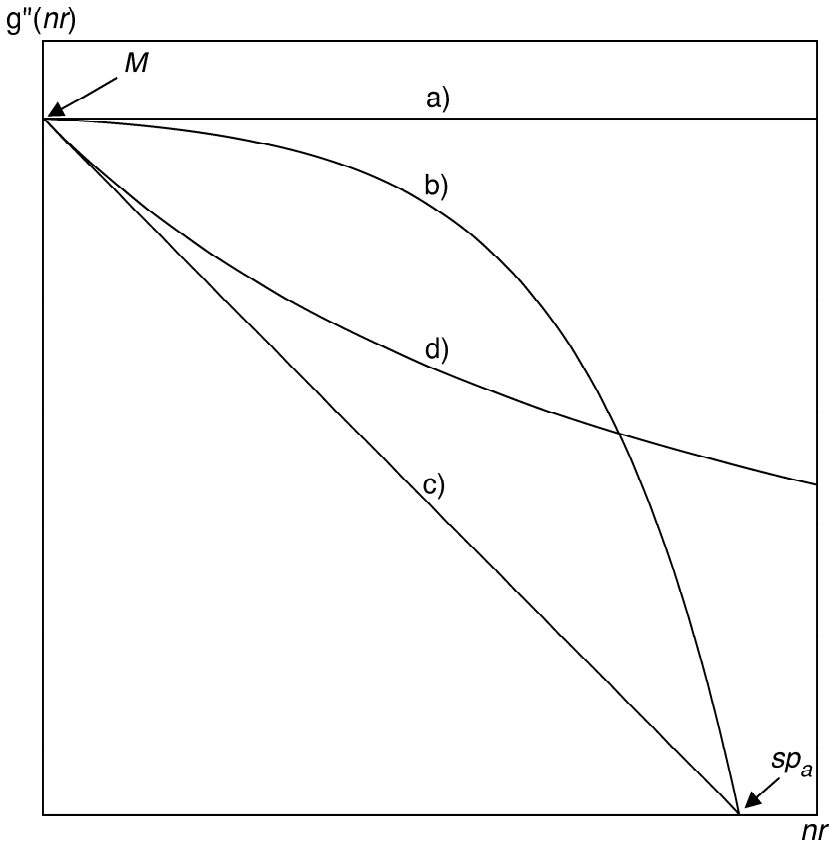


FIG. 4.3: *Quatre modalités de rétroaction de la concentration en azote aminé (nr) sur la vitesse de réduction du nitrate g"(nr) : Les tracés a-d correspondent aux équations 4.11-4.14 respectives.*

4.3.4 Valeurs de départ des paramètres

La table 4.1 résume l'ensemble des paramètres utilisés, leurs unités, et, éventuellement leurs valeurs si elles sont connues ou fixées arbitrairement. Le tableau précise aussi si elles sont mesurées ou estimées par optimisation, *i.e.* en cherchant le jeu de valeurs qui minimise la somme des carrés des écarts (SCE) entre les simulations et les observations. Pour faciliter cette tâche, il est bon d'avoir une idée *a priori* de leurs ordres de grandeur, ce qui a pu être fait pour quelques paramètres.

- M_i : Ce paramètre (en h^{-1}) représente le flux de réduction horaire maximum par unité d'azote structural. Il est raisonnable de faire l'hypothèse qu'il prend une valeur compatible avec la vitesse de croissance relative maximum, soit $\approx$ 0,050 h^{-1} (voir chapitre 3).

- ks : Cette constante peut être approchée grâce aux expériences de privation d'azote. En effet, dans ces conditions, fsm est le flux qui limite la réduction du nitrate. Dans ces expériences, nous avons constaté que la vitesse de réduction était divisée par 3, soit $\frac{M}{3} \approx 0,016$ h-1. En injectant cette valeur de fsm dans l'équation 4.18 et en considérant que la teneur en nitrate du stock est peu différente de la teneur globale (soit de l'ordre de 50 mol m^{-3} en début de privation), on obtient $ks \approx 0,0003$ m^3 mol ^{1} h ^{1}.
- sp_i : Ce paramètre représente la concentration du NO_3^- à laquelle se stabilise un compartiment lorsque les flux deviennent nuls. Considérant que cette situation est approchée au bout d'une période de nuit prolongée (au moins 24 h), nous avons retenu les données de Cardenas-Navarro *et al.* (1998) : 50, 90 et 50 mol m^{-3} pour les racines, les tiges et les limbes, respectivement.

4.4 Résultats et discussion

4.4.1 Absorption et réduction du nitrate

Sur le plan expérimental, la vitesse de réduction du nitrate a été déduite de bilans prenant en compte, d'une part la variation du contenu en nitrate d'échantillons prélevés périodiquement, et, d'autre part, la vitesse d'absorption de l'ion (voir section 4.2.2). L'absorption déterminant l'entrée initiale de l'ion dans le végétal, elle représente un élément important, voire *in fine* limitant de l'assimilation. Il ne serait donc pas surprenant *a priori* que les variations de ces deux fonctions présentent de grandes similitudes et il est impératif de les comparer.

En raison du caractère non destructif de la méthode de mesure de la vitesse d'absorption (Fu), celle-ci a été suivie en continu depuis le début de chaque culture, autrement dit dès avant la période expérimentale. Toutes les cultures ont eu le même comportement, dont un exemple typique est présenté dans la figure 4.4. Pendant la période initiale, l'absorption journalière s'est accrue selon une progression exponentielle révélatrice de la croissance des plantes. De plus, malgré des conditions d'environnement radiculaire stable en température (20 °C), pH (5.0) et concentration du nitrate (3.0 mol m^{-3}), Fu a présenté des fluctuations nycthémérales prononcées et conformes aux données de la littérature (Cardenas-Navarro *et al.*, 1998; Clement *et al.*, 1978). La période expérimentale débute par une éventuelle mais brusque diminution de nutrition azotée (passage à 10 10^{-3} mol m^{-3} dans l'exemple commenté). Cette restriction a eu pour effet de diminuer fortement Fu à une valeur quasiment nulle, qui s'est progressivement accrue pendant les 48 heures de durée du traitement selon une relation apparemment sigmoïde dans laquelle on ne peut déceler aucun caractère oscillatoire. A la fin de l'expérience (20 jas dans la fig. 4.4, la nutrition pléthorique a été rétablie brusquement, avec un double effet : une stimulation immédiate et considérable de Fu, et une reprise des oscillations journalières. Les mesures au cours de cette dernière phase sont manifestement bruitées en raison de la conjonction d'un faible nombre de plantes (seulemnt 8 après la période expérimentale) et d'une forte concentration de la solution nutritive (voir section 4.2.1).

Pendant la période expérimentale (18-19 jas dans la fig.4.4), des plants ont été récoltés périodiquement et analysés pour leur contenu en NO_3^-, ce qui a permis d'en calculer

Noms	Eqn.	Val.	Unités	Description
			Variables de flux	
E_i	4.28		mol pl^{-1} h^{-1}	Tout flux de NO_3^- sortant
Fms	4.15	s	mol pl^{-1} h^{-1}	Flux de stockage de NO_3^-
fms	4.15	s	h^{-1}	Flux de stockage de NO_3^- par unité de N structural
Fr	4.7	m	mol pl^{-1} h^{-1}	Flux de réduction du NO_3^- total de la plante
fr_i	4.7	s	h^{-1}	Flux de réduction par unité de N structural
Fsm	4.16	s	mol pl^{-1} h^{-1}	Flux de destockage de NO_3^-
fsm	4.16	s	h^{-1}	Flux de destockage de NO_3^- par unité de N structural
ft_{H_2O}	4.22	s	m^3 mol^{-1} h^{-1}	Flux d'eau par unité de N structural
Ft_{ij}	4.21	s	mol pl^{-1} h^{-1}	Flux de transfert de NO_3^-
ft_{ij}	4.21	s	h^{-1}	Flux de transfert de NO_3^- par unité de N structural
Fu	-	m	mol pl^{-1} h^{-1}	Flux d'absorption de NO_3^-
h	4.27	m	m h^{-1}	Transpiration par unité de surface foliaire
I_i	4.28		mol pl^{-1} h^{-1}	Tout flux de NO_3^- *entrant*
			Variables d'état	
A	4.27	m	m^2 pl^{-1}	Surface foliaire totale
cr_i	4.8	m	mol m^{-3}	Concentration des ressources carbonées en équivalents C
no_i	4.8	m	mol m^{-3}	Concentration du NO_3^-
no_m	4.17	s	mol m^{-3}	Concentration du NO_3^- métabolique
no_s	4.18	s	mol m^{-3}	Concentration du NO_3^- stocké
nr_i	4.8	m	mol m^{-3}	Concentration des ac. aminés libres en équivalents N
Ns_i	4.7	m	mol pl^{-1}	Contenu en N structural
Qno_i	4.28	m	mol pl^{-1}	Contenu en NO_3^-
R_{N_i}	4.32	m	h^{-1}	Vitesse relative de variation du contenu en N structural
R_{v_i}	4.33	m	h^{-1}	Vitesse relative de variation du contenu en eau
v	4.35	m	m^3 mol^{-1}	Volume d'eau par unité de N structural à l'échelle de la plante
v_i	4.29	m	m^3 mol^{-1}	Volume d'eau par unité de N structural
v_m	4.36	31 10^{-4}	m^3 mol^{-1}	idem pour le compartiment métabolique
v_s	4.35	s	m^3 mol^{-1}	idem pour le compartiment structural
			Paramètres	
$\alpha_{C,i}$	4.10	o	-	Paramètre des ressources C pour la réduction du nitrate
$\alpha_{N,i}$	4.10	o	-	Paramètre du nitrate pour la réduction
fsm_{max}	4.19	o	h^{-1}	Flux maximum de destockage du NO_3^- par unité de N structural
h_c	4.27	o	m h^{-1}	Flux d'eau acropète non transpiratoire par unité de surface foliaire
km_i	4.26	o	mol m^{-3}	Cte de Michaelis du nitrate pour le transfert
kn_j	4.24	o	-	Paramètre du transport de NO_3^- entre organes
$kr_{C,i}$	4.9	o	mol m^{-3}	Cte de Michaelis des ressources C pour la réduction du nitrate
$kr_{N,i}$	4.9	o	mol m^{-3}	Cte de Michaelis du NO_3^- pour la réduction
ks	4.17	o	m^3 mol^{-1} h^{-1}	Perméabilité au NO_3^- entre comp. métabolique et de stockage
ksm	4.19	o	mol m^{-3}	Cte de Michaelis pour le destockage du NO_3^-
kt_{ij}	4.22	o	-	Paramètre du transport de NO_3^- entre organes
M_{fsm}	4.20	o	h^{-1}	Valeur potentielle du flux maximum de destockage du NO_3^- par unité de N structural
M_i	4.11	o	h^{-1}	Maximum du flux de réduction du NO_3^- par unité de N structural
$sp_{a,i}$	4.12	o	mol m^{-3}	Paramètre de la rétroaction des ac. aminés sur la réduction du NO_3^-
sp_i	4.25	o	mol m^{-3}	Consigne de concentration du nitrate
sp_m	4.20	o	mol m^{-3}	Consigne de concentration du nitrate dans le comp. métabolique

TAB. 4.1: *Variables et paramètres invoqués dans la modélisation de la réduction du nitrate. Les indices i et j désignent des compartiments : (l)imbes, (t)iges et pétioles, (r)acines, (pl)antes, (m)étaboliques et de (s)tockage). La colonne Eqn désigne la première occurence de la variable dans une équation, et la colonne Val indique si les valeurs sont mesurées (m), simulées (s), ou obtenues par optimisation (o).*

la vitesse de réduction (Fr, eqn 4.5). Nous ne disposons donc pas de suivi continu de Fr sur de longues périodes, contrairement à Fu. Néanmoins, en condition de nutrition pléthorique (3.0 mol NO_3^- m^{-3}), nous avons constaté que Fr présentait des oscillations nycthémérales de forte amplitude (non montré). En cas de restriction de nutrition, Fr était affaibli, mais, surtout, la figure 4.4 illustre un fait remarquable : le maintien du caractère oscillatoire de Fr malgré la monotonie de Fu.

Ces observations montrent que :

1) les oscillations de Fr ne sont pas imputables à un *artefact* méthodologique (voir section 4.2.2) ;
2) les oscillations de Fr ne sont pas la conséquence des oscillations de Fu ;
3) Fr et Fu sont relativement découplés, rendant indispensable l'interposition de compartiments nitriques ayant le rôle de tampon entre les 2 flux.

Les traitements nutritionnels ont affecté la croissance, et *a fortiori* l'accumulation de N structural (cf chapitre 2). Afin de faciliter la comparaison des expériences entre-elles, les mesures ont été normalisées en exprimant les flux d'absorption et de réduction par mole d'azote structural. Sur cette base, la figure 4.5 montre bien le caractère général des oscillations nycthémérales de la réduction : même dans les 2 expériences de suppression du NO_3^- en solution ($\Rightarrow Fu = 0$), ce caractère oscillatoire a persisté (fig. 4.5 A-B), bien que d'amplitude faible. Dans ce cas, la réduction étant nécessairement supérieure à l'absorption, se fait exclusivement et en permanence aux dépens du stock endogène de NO_3^-. En conditions de nutrition restreinte à 10-20 10^{-3} mol m^{-3}, la vitesse d'absorption devient positive et croissante (fig. 4.5 C-D) et celle de réduction, nettement augmentée, oscille de part et d'autre de l'absorption. Cette observation met en relief un autre fait remarquable : chez des plants exposés à une restriction d'alimentation, le destockage de NO_3^-, bien qu'inéluctable à long terme, alterne néanmoins avec des phases de stockage. En condition de nutrition pléthorique (fig. 4.5 E), la vitesse d'absorption est nettement augmentée sur une base journalière, mais elle devient fortement oscillatoire. En conséquence, à certaines périodes de la journée elle peut être inférieure à la vitesse d'absorption de plants exposés à 10-20 10^{-3} mol m^{-3}. L'amplitude des oscillations de la vitesse de réduction se trouve exacerbée à 3.0 mol m^{-3} et dépasse celle de l'absorption. Autrement dit, malgré la pléthore, un destockage se manifeste à certains moments de la journée, et alterne avec des phases de stockage.

La figure 4.6 présente les concentrations des composés impliqués dans l'équation 4.8, donc potentiellement responsables des oscillations, dans deux situations contrastées : la pléthore et la privation nitriques. Le NO_3^- est le substrat principal du système que nous étudions. Sa teneur dans la plante (fig 4.6-A) fluctue amplement dans le nycthémère lorsque la nutrition n'est pas limitante (symboles fermés). Mais, en cas de privation (symboles ouverts), elle ne fait que diminuer, bien que plus lentement la nuit que le jour. Quoiqu'il en soit, la monotonie de cette décroissance ne permet pas d'expliquer les oscillations nycthémérales de la réduction. De même, le comportement des acides aminés libres s'inverse en situation de carence (fig 4.6-B) et ne peut donc être à l'origine de la persistance des fluctuations de la réduction. Contrairement au nitrate, les sucres solubles montrent une ample variation nycthémérale dans les deux situations expérimentales (fig 4.6-C), allant dans le même sens que celle de la réduction (augmentation de jour et diminution de nuit). Les autres ressources carbonées, amidon (fig 4.6-D) et acides organiques non-structuraux (fig 4.6-E) varient de même, mais avec une amplitude très atténuée lors de la privation. Les composés carbonés, et, parmi eux, surtout

les sucres solubles, sont donc sans doute les meilleurs candidats pour expliquer le comportement nycthéméral de la réduction du nitrate.

4.4.2 Modèle à compartimentation conceptuelle

Des deux formalismes proposés pour l'action du nitrate (eqns 4.9 - 4.10), seul le premier, de type Michaelien, a pu être ajusté. Ce formalisme est cohérent dans la mesure où la concentration considérée dans l'équation 4.9 représente en principe celle du nitrate métabolique. D'autre part, il n'a pas été possible de déterminer la valeur des paramètres sans prendre en compte une source de C, et parmi elles, seuls les sucres solubles ont produit des paramètres ajustables selon un formalisme saturable (eqn 4.9).

Le tableau 4.2 compare les paramètres obtenus pour les 4 hypothèses de rétroaction des acides aminés (eqns 4.11 - 4.14). Le plus faible CME est obtenu pour la première équation qui, de surcroît, est la plus économe en nombre de paramètres. Ce formalisme, qui correspond à une absence de rétroaction, indique que le jeu de données expérimentales n'a pas permis d'observer des concentrations suffisamment élevées en acides aminés pour déceler l'effet sur la réduction du nitrate. Parmi les différentes propositions pour le destockage du nitrate (eqns 4.18 - 4.20), seule la première, un simple diffusion avec un unique paramètre (ks) a pu être ajustée. Finalement, le modèle retenu ne comporte que 4 paramètres (tableau 4.2, première ligne).

Eqn rétroaction	sp_a	ks	M	kr_N	kr_C	CME
4.11	-	0.000156	0.096	84.5	112	2.06 10^{-05}
4.12	174	0.000135	0.075	36.0	110	2.15 10^{-05}
4.13	77.5	0.000165	0.137	106.1	110	2.16 10^{-05}
4.14	171	0.000166	0.109	91.1	110.4	2.09 10^{-05}

TAB. 4.2: *Paramètres du modèle Michaelien de réduction du nitrate métabolique. L'ion s'échange entre 2 compartiments par simple diffusion selon une perméabilité ks. Autres variables : M vitesse de réduction maximum, kr_N et kr_C constantes de Michaelis pour le nitrate et le C des sucres solubles, respectivement. Quatre hypothèses de rétroinhibition par les acides aminés sont comparées (eqns 4.11-4.14). Les valeurs obtenues sont celles qui minimisent la les carrés moyens des écarts (CME) entre les vitesses de réduction simulée et observée.*

La figure 4.7 présente les simulations de ce modèle. Pour plus de clarté, l'expérience à 20 10^{-3} mol NO_3^- m^{-3} a été omise, mais elle présente un aspect comparable à celle à 10 10^{-3} mol m^{-3} (fig. 4.7 C). Les simulations de fr respectent les tendances à long terme, *i.e.* diminution de fr dans les 2 expériences de privation azotée (fig. 4.7 A1-B1), et une relative stabilité à faible (fig. 4.7 C1) et à forte (fig. 4.7 D1) disponibilités nitriques. A court terme, en revanche, les simulations ne reproduisent pas les oscillations nycthémérales, à l'exception de la nutrition pléthorique où apparaissent un pic diurne et une vallée nocturne ; mais d'amplitude atténuée par rapport aux observations.

Les concentrations simulées des nitrates métaboliques (no_m) et de stockage (no_s) se situent logiquement de part et d'autre des concentrations mesurées globalement sur les plantes, quelles que soient les expériences (fig. 4.7 A2-D2). Néanmoins, les valeurs expérimentales (symboles) épousent no_s (lignes pleines). C'est une conséquence logique du concept de compartiment de stockage et du choix *a priori* de lui attribuer le plus grand volume (90% de l'eau de la plante). On remarquera donc que, contrairement au flux de réduction, la teneur en nitrate globale est assez fidèlement simulée à court et

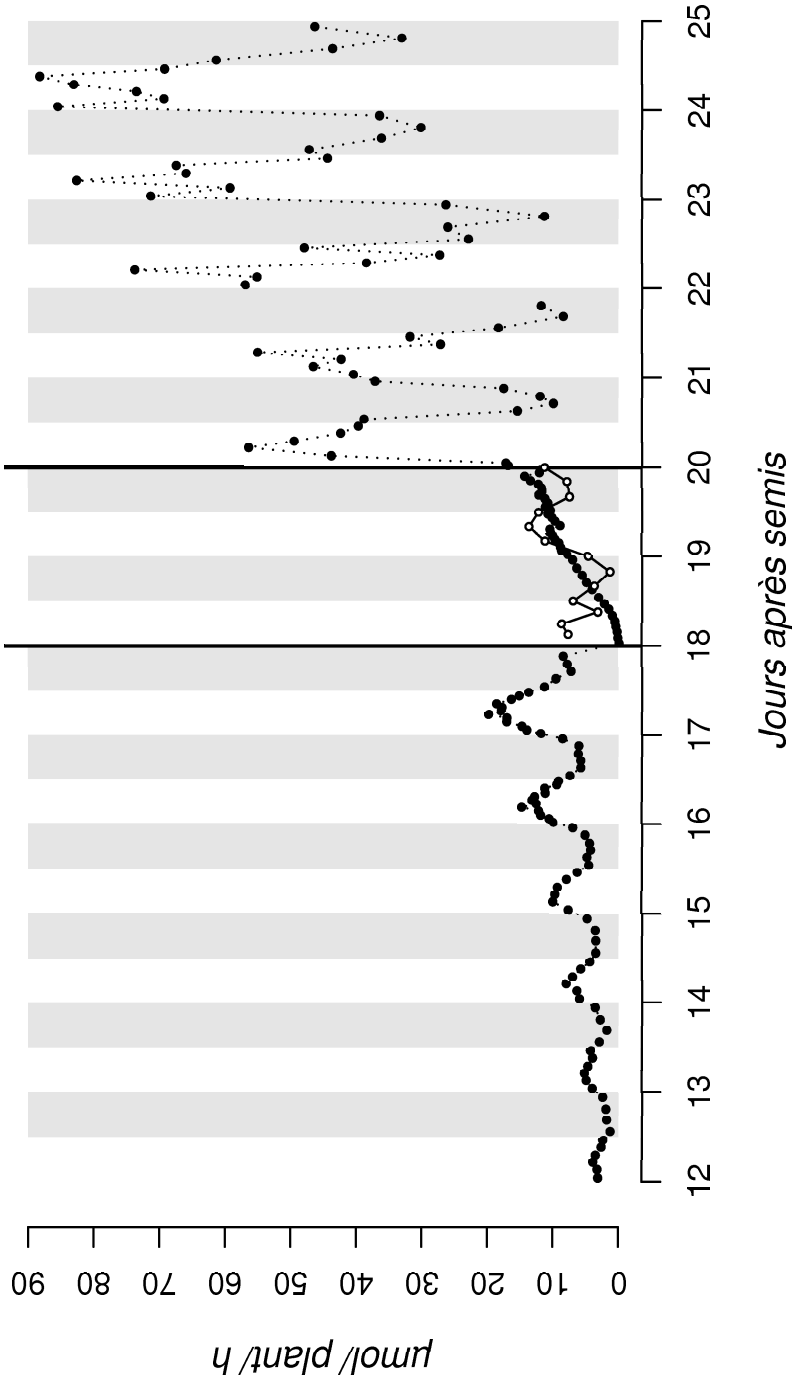


FIG. 4.4: *Exemple de cinétiques d'absorption et de réduction du nitrate. Quatre-vingt-douze plants de tomate ont été cultivés en phytotron depuis le semis sur une solution nutritive maintenue à 20 °C, pH 5,0 et 3,0 mol NO_3^- m^{-3} par un automate opérant à des pas de temps variables (de 5 à 150 min) selon les contraintes de régulation. À 18 jas (trait vertical), $[NO_3^-]$ a été abaissée et maintenue à 10 10^{-3} mol m^{-3} puis restituée à 3,0 mol m^{-3} à 20 jas (trait vertical). Pendant cette période, 14 échantillons aléatoires de 6 plants ont été prélevés afin d'en analyser le contenu en NO_3^-. La vitesse d'absorption (symboles fermés, pointillés) a été calculée selon eqn 4.1, et la vitesse de réduction de 18 à 20 jas (symboles ouverts, ligne pleine) selon eqn 4.5. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

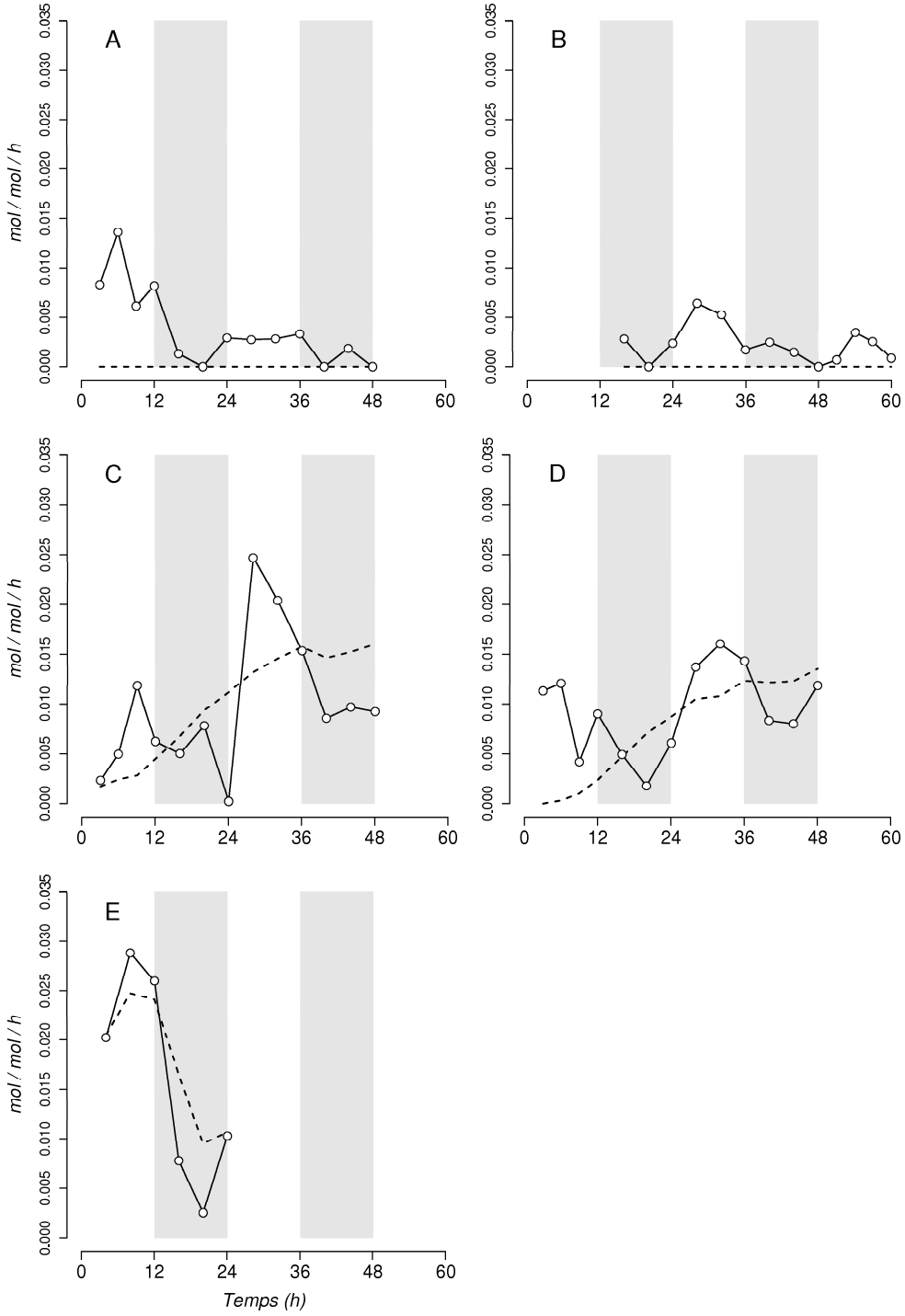


FIG. 4.5: *Comparaison des vitesses d'absorption (tirets) et de réduction (lignes pleines, symboles ouverts) dans 5 expériences de changement de nutrition, de 3.0 mol NO_3^- m^{-3} à : 0.0 (A et B) ; 10 10^{-3} (C) ; 20 10^{-3} (D) ; 3.0 (E) . Les flux sont normalisés par moles d'azote structural dans la plante entière. Pour plus de lisibilité, les symboles ont été omis pour le flux d'absorption. Le temps zéro en abscisse correspond à l'allumage des lampes à 18 jas. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

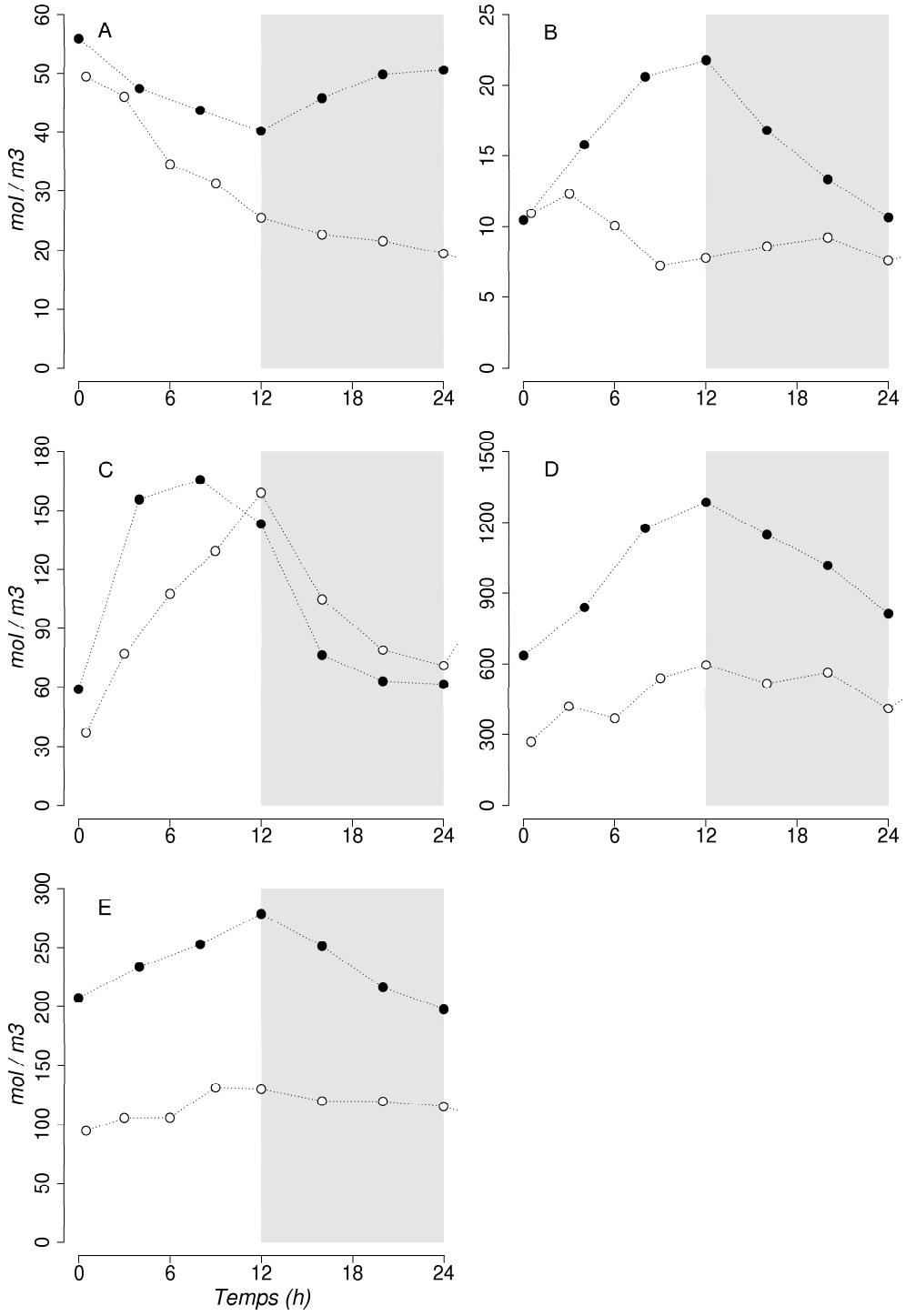


FIG. 4.6: *Variations nycthémèrales des concentrations (mol m^{-3}) du N-NO_3^- (A), des acides aminés libres (B, en équivalents azote), des sucres solubles (C, en équivalents carbone), de l'amidon (D, en équivalents carbone) et des acides organiques non-structuraux (E, en équivalents carbone). Les analyses présentées concernent les plantes entières au cours des 24 premières heures de 2 expériences typiques, nutrition pléthorique (symboles fermés, 3 mol NO_3^- m^{-3}) et privation d'azote (symboles ouverts). Le temps zéro en abscisse correspond à l'allumage des lampes à 18 jas. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

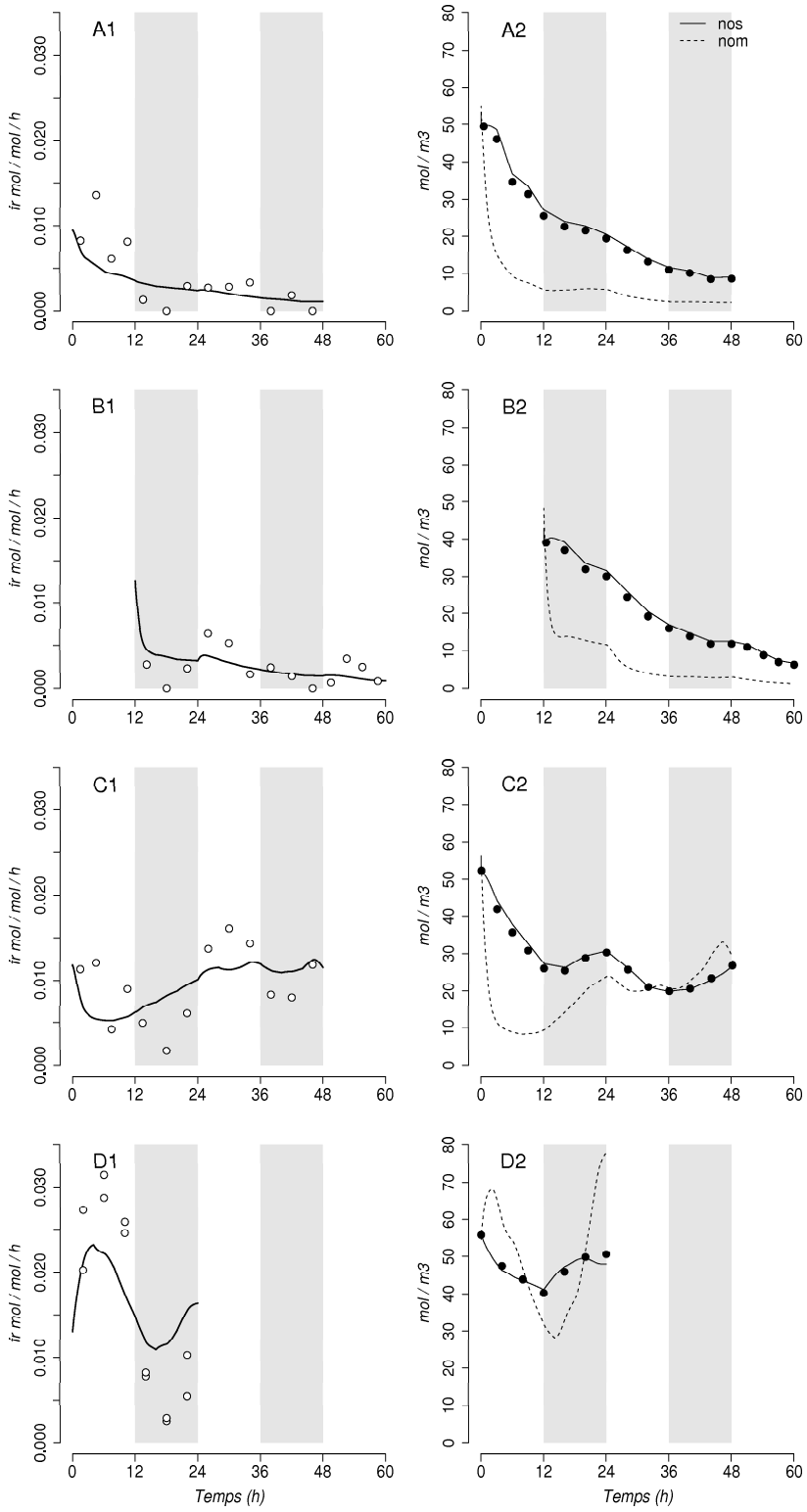


FIG. 4.7: *Mesures (symboles) et simulations (lignes) des flux fr_{pl} de réduction par mol de N structural (A1-D1) et des concentrations en nitrate (A2-D2) par le modèle à compartimentation conceptuelle. Les teneurs en nitrate sont mesurées globalement à l'échelle de la plante, les simulations concernent le nitrate stocké (no_s, ligne pleine, A2-D2) et métabolique (no_m, tirets, A2-D2). Les quatre conditions expérimentales sont : suppression du NO_3^- en solution (A,B), diminution à 10 10^{-3} mol m^{-3} (C) et maintien à 3 mol m^{-3} (D). Le temps zéro en abscisse correspond à l'allumage des lampes à 18 jas. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

long termes. Les simulations de no_m (tirets) présentent des variations très rapides comparées à celles de no_s. Dans les expériences de privation (fig. 4.7 A2-B2), no_m chute à une valeur plancher en à peine une demi journée, ce qui limite fr. Ce comportement est conforme à la théorie de la limitation du flux de réduction par le transport de l'ion entre compartiments. A l'inverse, en nutrition pléthorique, no_m oscille amplement dans le nycthémère de part et d'autre de no_s, ce qui implique une alternance de phases de stockage et de destockage.

4.4.3 Modèle à compartimentation en classes d'organes

Contrairement au modèle précédent, on peut ici, par régression, mettre fr directement en relation avec les teneurs en nitrate mesurées à l'échelle de l'organe, sans passer par une phase de simulation. Ceci permet, en particulier, de paramétrer la réduction sans avoir à formuler préalablement d'hypothèses sur le transport de l'ion. En revanche, la tâche d'optimisation se trouve compliquée par un nombre de paramètres multiplié par le nombre de classes d'organes prises en compte. Ainsi, comme pour le modèle à compartimentation conceptuelle, il n'a pas été possible de paramétrer la rétroinhibition par les acides aminés libres (eqns 4.12 - 4.14), et l'équation 4.11 sans rétroaction a donc été retenue. De même, parmi les sources de C, sucres solubles, amidon et acides organiques non-structuraux, seuls les premiers ont permis de déterminer des paramètres significatifs. Il est à remarquer que nos tentatives (non montrées) d'ajuster des variantes de modèles ne prenant pas en compte les sucres solubles (*i.e.* en supprimant $g'(cr_i)$ dans eqn 4.8) ont augmenté la variance résiduelle (environ 20%) et engendré des valeurs aberrantes (négatives) pour certains paramètres. Que ce soit pour les sucres solubles ou le nitrate, l'équation saturable 4.9 n'a pas pu être ajustée, et la formule 4.10 a été retenue pour ces deux ressources. D'une façon générale, le paramètre $\alpha_{N,i}$, caractéristique du nitrate, a été trouvé significativement non nul dans les limbes et les racines, mais non différent de un. Dans les tiges, en revanche, il n'a pu être ajustée. En conséquence, pour simplifier le système, nous avons décidé d'en fixer la valeur à un dans tous les organes ($\alpha_{N,l} = \alpha_{N,t} = \alpha_{N,r} = 1$), ce qui revient à supprimer 3 paramètres à optimiser. Pour résumer, les régressions nous incitent à considérer que fr est une fonction plus linéaire que Michaelienne pour la gamme de teneurs en NO_3^- rencontrées dans nos expériences.

Le tableau 4.3 compare les paramètres ajustés pour 3 hypothèses de participation des organes à l'assimilation du nitrate. Dans tous les cas de figure, le paramètre $\alpha_{C,l}$, caractéristique des limbes s'avère très hautement significatif, et de plus très significativement supérieur à un, ce qui justifie de maintenir le formalisme proposé (eqn 4.10). Le scénario le plus simple fait supporter toute l'assimilation de la plante aux limbes comme dans la figure 4.2-a. La prise en compte des racines (deuxième organe le plus étudié pour l'assimilation du nitrate) abaisse effectivement l'erreur résiduelle, $\alpha_{C,r}$ étant, de surcroît, significatif. Au contraire, l'ajout des tiges détériore l'erreur résiduelle, $\alpha_{C,t}$ et $\alpha_{C,r}$ devenant de plus non significatifs. On remarquera aussi que la prise en compte des tiges n'a pas modifié les paramètres relatifs aux limbes et aux racines. En conséquence, dans la suite de ce document, on négligera la participitation des tiges à l'assimilation du nitrate (*i.e.* $M_t = 0$).

Les valeurs des paramètres du tableau 4.3 ont été utilisées pour la résolution numérique de l'équation 4.34. Une procédure d'optimisation a permis de paramétrer le

	Limbes	Limbes + Racines	Limbes + Tiges + Racines
M_l	$1.513\ 10^{-08}$	$2.664\ 10^{-09}$	$2.667\ 10^{-09}$
$\alpha_{C,l}$	2.099 ***	2.389 ***	2.388 ***
M_t	-	-	$2.373\ 10^{-15}$
$\alpha_{C,t}$	-	-	4.978
M_r	-	$5.688\ 10^{-05}$	$5.718\ 10^{-05}$
$\alpha_{C,r}$	-	$6.652\ 10^{-01}$ *	$6.638\ 10^{-01}$
DDL	62	60	58
ESR	0.005352	0.005096	0.005182
Signif. codes : 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*'			

TAB. 4.3: *Paramètres du modèle de réduction pour 3 hypothèses de participation des organes à l'assimilation de la plante entière. Le paramètre caractéristique du nitrate ($\alpha_{N,i}$ dans eqn 4.10) a été forcé à 1 pour les 3 classes d'organe. Les valeurs, déterminées par régression non linéaire, minimisent la somme des carrés des écarts entre les vitesses de réduction mesurées et simulées à l'échelle de la plante entière. DDL, degrés de liberté ; ESR, erreur standard résiduelle.*

tranport du nitrate entre organes, en minimisant SCE entre les teneurs en nitrate mesurées et simulées dans chacun d'eux. Il n'a pas été possible de paramétrer un modèle de transport sans faire figurer explicitement le flux d'eau acropète (ft_{H_2O} dans eqn 4.22). Ce flux ascendant comporte 2 composantes, dépendantes et indépendantes de la transpiration, respectivement (eqn 4.27). Néanmoins, les plus faibles SCE ont été obtenues lorsque la composante transpiratoire était omise ($= h = 0$). Le formalisme résultant serait donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle le flux d'eau endogène xylémien qui compense le flux phloëmien suffirait à assurer efficacement les mouvements de nitrate. Par ailleurs diverses formulations des effets de la concentration du nitrate dans les compartiments sources et puits (eqns 4.23-4.26) ont été comparées et ont produit des ajustements très différents (CME du simple au triple), en faveur de l'équation 4.24 qui a été retenue pour la suite.

Trois représentations des flux et de la compartimentation (fig. 4.2) ont été testées. La première simplifie le système à l'extrême en faisant porter tout le flux de réduction sur les limbes (fr_{pl} paramétré selon colonne 1 du tableau 4.3), et en assignant à l'ensemble des tiges et des racines l'unique rôle de réservoir. Il n'a pas été possible de déterminer un jeu de paramètres cohérents (tous positifs) dans ce cas de figure, et les simulations se traduisaient par des oscillations amples et rapides de Fr autour de zéro. Cette incohérence provient sans doute du remplissage direct du compartiment de stockage par Fu, caractéristique de cette représentation. En conséquence, la suppression brutale de NO_3^- en solution, ne peut pas se traduire par la chute rapide de Fr que nous avons observée. A ce titre, la représentation conceptuelle de la fig 4.1 est plus cohérente. Les deux représentations suivantes (fig. 4.2 b-c) font un même découpage en trois classes d'organes auxquelles elles assignent un même rôle, mais elles diffèrent par le schéma des transferts de NO_3^-, en série ou en parallèle. Notons cependant, qu'à l'origine, on attribuait aux tiges un rôle actif pour la réduction de NO_3^-, mais que, désormais, fr_t est considéré comme négligeable (voir plus haut). Le tableau 4.4 présente les valeurs optimisées des paramètres du transport et montre que la prise en compte d'un transport xylémien direct des racines aux limbes diminue CME de près de 60 % . On remarquera aussi que hc, supposé représenter la composante non transpiratoire du flux d'eau dans eqn 4.27, est près de 2 fois supérieur à la composante transpiratoire en période de jour ($h_{jour} = 295 \times 10^{-6}$) dans la disposition en série. La valeur trouvée dans le schéma en

parallèle paraît plus vraisemblable.

	Série	Parallele
kt_{rl}	-	1,4383
kt_{rt}	20,93	0,0871
kt_{tl}	0,209	0,0419
kn_t	0,700	0,4066
kn_l	7,001	3,2683
hc	560 10^{-6}	118 10^{-6}
CME	112,05	47,185

TAB. 4.4: *Paramètres du modèle de transport de nitrate pour 2 dispositions des compartiments, en série et en parallèle. Le modèle, basé sur les équations 4.22, 4.24 et 4.27, s'étant avéré insensible au flux d'eau transpiratoire, h a été forcé à zéro. Les valeurs, obtenues par optimisation, minimisent la somme des carrés des écarts entre les teneurs en nitrate mesurées et simulées dans chaque organe. CME, carré moyen des écarts.*

Finalement, la résolution numérique de l'équation 4.34 avec les valeurs pré-déterminées des paramètres de réduction des limbes et racines (tableau 4.3) et celles du transport entre organes selon un schéma parallèle (tableau 4.4) simule simultanément les vitesses de réduction et les teneurs en nitrate des organes. Sur l'ensemble des expériences, le CME entre fr_{pl} mesuré et simulé a été de 9,43 10^{-6}, soit moins de la moitié du CME mesuré dans le modèle à compartimentation conceptuelle. La figure 4.8 permet de comprendre l'origine de cette amélioration. Le modèle compartimenté en organes mime les variations nycthémérales de la vitesse de réduction dans toutes les situations expérimentales, de la carence en NO_3^- (fig 4.8-A) à la pléthore (fig 4.8-C). De plus, elle respecte les tendances à plus long terme, *i.e.* la baisse quotidienne de la vitesse de réduction en situation de carence (fig 4.8-A), et, au contraire, l'augmentation en situation de nutrition limitante (fig 4.8-B).

L'examen de la participation des limbes et des racines au métabolisme de la plante entière (fig 4.8 D-F) permet d'analyser plus en détail ces comportements. Il apparaît en particulier, que, dans toutes les situations nutritionnelles, le comportement nycthéméral est imputable aux seuls limbes, en accord avec l'opinion courante (Kaiser and Huber, 2001) et avec la relative stabilité de l'activité nitrate réductase radiculaire (Geiger *et al.*, 1998; Scheible *et al.*, 1997c; De la Haba *et al.*, 2001). *A priori*, un tel comportement aurait pu être attribué aux oscillations du flux d'eau transpiratoire, d'autant plus que des expériences sur des feuilles détachées (Shaner and Boyer, 1976; Robin *et al.*, 1983; Gojon *et al.*, 1991b) militaient en faveur de cette hypothèse. Dans le présent modèle, au contraire, les fluctuations dépendent de celles, contradictoires, des concentrations en nitrate qui diminuent le jour (fig 4.6 A) et en sucres solubles qui diminuent la nuit (fig 4.6 C). Le paramétrage proposé (tableau 4.3) attribue un poids nettement supérieur aux sucres solubles qu'au nitrate dans les limbes ($\alpha_{C,l}\ approx 2,4\ vs\ \alpha_{N,l} = 1$), entraînant une certaine ressemblance des variations nycthyémérales de l'assimilation du nitrate et de la concentration en sucres solubles dans ces organes. Dans les racines, au contraire, le paramétrage attribue un poids inférieur aux sucres qu'au nitrate ($\alpha_{C,r} \approx 0,67\ vs\ \alpha_{N,r} = 1$)) et, ce dernier fluctuant peu dans cet organe (voir chapitre 2), il résulte un métabolisme nitrique relativement monotone.

Les tendances à plus long terme attirent aussi l'attention sur les racines. En nutrition pléthorique (fig 4.8 F) leurs vitesses de réduction semblent relativement stables (pour autant que l'on puisse en juger sur 24 heures), mais dès l'application d'une carence (fig 4.8 D), elles chutent rapidement à une valeur quasiment nulle. En l'occurence, ceci

s'explique par le contenu radiculaire en nitrate, initialement faible et, donc, vite épuisé. En revanche, la situation intermédiaire d'une limitation limitante à 10 (non montré) ou 20 10^{-3} mol m^{-3} (fig 4.8 E) se traduit par une augmentation régulière de la vitesse de réduction par cet organe. Celle-ci ne peut être attribuée à la concentration en nitrate no_r qui, au contraire, diminue initialement en comparaison du témoin à 3 mol m^{-3}, puis semble se stabiliser (voir chapitre 2). En revanche, la concentration en sucres solubles cr_r se trouve très fortement augmentée par le traitement nutritionnel (voir chapitre 2), stimulant ainsi l'activité de réduction, mais, surtout, la croissance des racines (*i.e.* l'augmentation de Ns_r) a été nettement stimulée, contrairement aux limbes (voir chapitre 3).

Ce modèle permet aussi d'évaluer globalement, par intégration, la participation respective des limbes et des racines au budget total de l'assimilation du nitrate. En situation de nutrition pléthorique, les limbes ont réduit environ 60% du NO_3^- pendant un nycthémère complet, confirmant leur rôle prépondérant mais montrant aussi que la participation des racines ne peut être négligée. En situation limitante, à 10 et 20 10^{-3} mol m^{-3}, les limbes n'ont réduit que 55 % du NO_3^- en 48 h. Ce résultat corrobore le rôle plus important des racines dans les milieux pauvres en azote, opinion généralement basée sur l'analyse du rapport N nitrique sur N aminé dans la sève xylémienne (Andrews *et al.*, 1984; Andrews, 1986; Gojon *et al.*, 1991a). Cet accroissement de la participation racinaire ne peut cependant être extrapolé à la situation de carence, pour laquelle nous avons calculé que les limbes ont assimilé 66 % (exp. non montrée de carence débutant la nuit) à 82 % (carence débutant le jour, fig. 4.8 D) du NO_3^-. Dans cette situation, les racines sont limitées à l'assimilation de leur propre stock, initialement déjà faible, contrairement aux limbes qui disposent de l'important réservoir des tiges.

La figure 4.9 A-C présente les teneurs en nitrate mesurées et simulées dans chaque classe d'organes. Globalement, ce modèle préserve la hiérarchie des organes des plus riches aux plus pauvres : tiges et pétioles, racines puis limbes. Dans les tiges, la concentration du NO_3^- simulée, no_t, est généralement proche des mesures, et sa variation en situation de limitation (B) et de carence (A) est relativement fidèle. En revanche, en nutrition pléthorique (C), bien que les simulations soient en moyenne très proches des mesures, elles reproduisent mal la tendance nycthémérale de cet organe : une baisse de no_t pendant l'héméropériode, suivie d'une augmentation pendant toute la nyctipériode. Les mêmes remarques s'appliquent aux limbes dans lesquels les simulations de no_l sont en général proches de l'observation, excepté pendant la nyctipériode en situation de pléthore nitrique (C). En revanche, les simulations amplifient très fortement les variations de no_r dans toutes les situations, de la carence (A) à la pléthore (C), donnant une vision assez biaisée du statut nitrique des racines. L'examen des flux de transport simulés (fig 4.9 D-F) permet d'analyser l'origine de ce biais. En situation de carence, la simulation montre, de façon très vraisemblable, que les racines exportent extrêmement peu de nitrate vers les parties aériennes (D, lignes pleines et tirets). La baisse exagérément rapide du stock radiculaire proviendrait donc d'une surestimation de la vitesse de réduction de leur stock endogène. Néanmoins, ce défaut est à pondérer, considérant qu'un léger biais sur le formalisme de fr_r se trouve rapidement amplifié en termes d'effets sur no_r en raison du faible stock contenu par ces organes. C'est sans doute aussi pour cette raison que, contrairement à l'observation, de fortes fluctuations sont simulées en nutrition pléthoriques (C, ligne pleine).

Dans le modèle que nous avons retenu, les limbes tiennent leur nitrate de 2 sources : les racines et les tiges. La figure (fig 4.9 D-F) illustre l'importance relative de ces der-

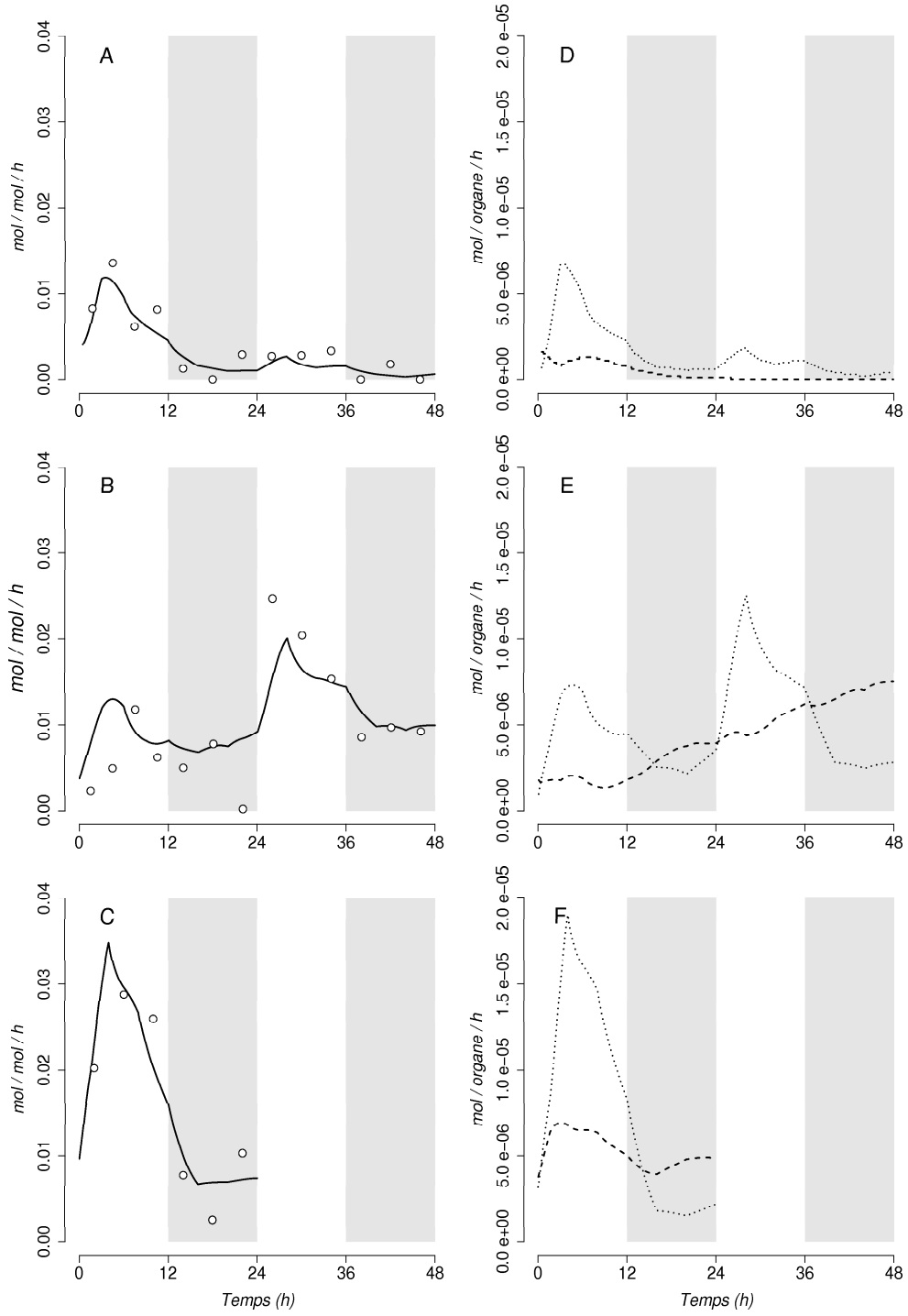


FIG. 4.8: *Mesures (symboles) et simulations (lignes) des flux de réduction par un modèle compartimenté en 3 classes d'organes disposés en parallèle vis-à-vis du transfert de NO_3^-, les tiges ne participant pas à l'assimilation de l'azote : A-C) flux fr_{pl} à l'échelle de la plante entière, en mol NO_3^- mol^{-1} N_S h^{-1} ; D-F) flux assuré par les racines (tirets) et par les limbes (pointillés) en mol NO_3^- $organe^{-1}$ h^{-1}. Trois conditions expérimentales sont présentées : suppression du NO_3^- en solution (A, D), diminution à 20 10^{-3} mol m^{-3} (B,E) et maintien à 3 mol m^{-3} (C,F). Le temps zéro en abscisse correspond à l'allumage des lampes à 18 jas. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

nières selon la nutrition. En situation de carence, la tige (D, pointillés) fournit la quasi totalité du nitrate, illustrant ainsi sa fonction de réservoir pour les limbes. En revanche, en situation de nutrition limitante (E) ou pléthorique (F), la racine (ligne pleine) devient la source principale à tout moment du nycthémère.

4.5 Conclusions

Les expériences présentées ont permis de mesurer la vitesse de réduction du nitrate à l'échelle de la plante entière et d'étudier les effets à court terme de deux facteurs d'environnement : le changement de régime nutritif azoté, d'une part, et le changement d'ambiance lumineuse par le truchement de la position dans le nycthémère, d'autre part.

L'étude de plants, riches en nitrate préalablement accumulé, a montré que leur vitesse de réduction s'effondre dès leur exposition à une solution dépourvue de NO_3^-. Ce résultat témoigne d'une différence de disponibilité des ions anciennement et récemment absorbés, que nous avons prise en compte dans les modèles sous la forme d'une compartimentation de l'ion. Deux approches de cette dernière ont été tentées : l'une, purement conceptuelle, ventile l'ion entre une fraction métabolique et une de réserve ; l'autre établit une correspondance entre compartiments et classes d'organes. Les deux se sont avérées aptes à simuler la propriété mentionnée, mais avec un réalisme bien supérieur dans le cas de la décomposition en organes, où la tige fait figure de compartiment de stockage du nitrate. Il est vrai aussi que ces deux représentations du système font appel à un nombre sensiblement différent de paramètres, 4 pour le premier *vs* 10 pour le second. Néanmoins, ce dernier, en plus de l'amélioration apportée à la simulation de la vitesse de réduction, apporte en plus des informations sur le contenu en nitrate des organes. Une approche encore plus réaliste de la compartimentation pourrait consister en la combinaison des deux représentations, en subdivisant les racines et les limbes en compartiments métaboliques et de stockage. Sur le plan mécaniste, ce raffinement serait justifié dans la mesure où des expérimentations sur organes détachés ont aussi conduit à distinguer le nitrate ancien du récent (Gojon *et al.*, 1991b; Shaner and Boyer, 1976). Cependant, toutes les représentations du système sont confrontées à la même difficulté de devoir formaliser le transport du nitrate entre compartiments. Le transport entre organes ne semble pas sensible aux variations de la transpiration, indiquant qu'il est sans doute limité par les mécanismes de charge et de décharge de la sève xylémique, faisant sans doute intervenir des transporteurs. Cependant, en l'absence de formalisme mécaniste établi permettant de simuler cette fonction, notre proposition (eqn 4.24) doit surtout être interprétée comme un formule simple rendant compte de l'offre de l'organe source, et de la demande de l'organe puits.

Le suivi nycthéméral de la réduction du nitrate a révélé le caractère oscillatoire de celle-ci, en cohérence avec les variations publiées de l'activité de NR (Kaiser and Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004; Debouba *et al.*, 2006), et, de façon inédite, sa permanence après suppression du nitrate dans la solution. Ce résultat pourrait surprendre, surtout parce qu'en nutrition limitante nous avons observé un résultat original : la vitesse d'absorption du nitrate devient monotone. Cette différence avec la réduction, qui reste oscillatoire, est une manifestation du découplage des deux fonctions et souligne l'importance du nitrate stocké. En nutrition pléthorique, la vitesse de réduction varie amplement au cours du nycthémère. Ceci n'a pu être expliqué par la concentration endogène du

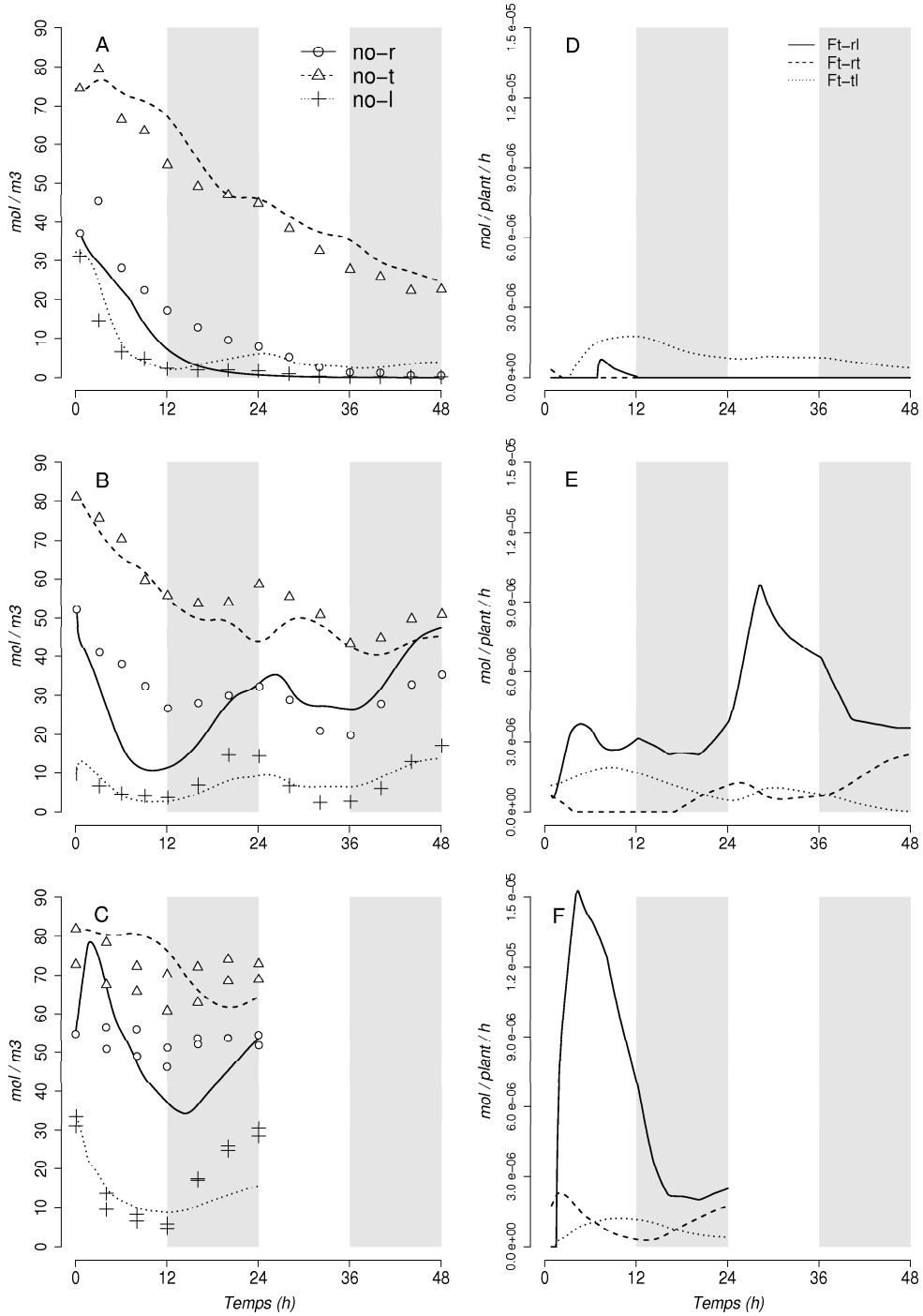


FIG. 4.9: *Mesures (symboles) et simulations (lignes) de la concentration du NO_3^- (A-C) des 3 classes d'organe (+ pointillés, limbes ; △ tirets, tiges et pétioles ; ◯ ligne pleine, racines), et de son transport (D-F) entre eux (ligne pleine, racines à limbes ; tirets, racines à tiges ; pointillés, tiges à limbes). Même modèle et mêmes conditions expérimentales que dans la figure 4.8 : suppression du NO_3^- en solution (A, D), diminution à 20 10^{-3} mol m^{-3} (B,E) et maintien à 3 mol m^{-3} (C,F). Le temps zéro en abscisse correspond à l'allumage des lampes à 18 jas. Les bandes claires et grisées dénotent le jour et la nuit, respectivement.*

NO_3^- qui varie de façon opposée, mais par celle des sucres solubles, pour lesquels un rôle de messager entre la photosynthèse et les sytèmes d'assimilation du nitrate a été suggéré (Morcuende *et al.*, 1998; Kaiser *et al.*, 1999; Kaiser and Huber, 2001). Le modèle fait dépendre aussi bien l'activité foliaire que radiculaire de la concentration locale en sucres solubles avec 2 conséquences : ils sont la cause des oscillations nycthémérales de l'activité foliaire, et ils stimulent l'activité racinaire lors d'une restriction azotée. En conséquence, la mise en œuvre d'un modèle d'assimilation du NO_3^- nécessite le couplage à un modèle de métabolisme carboné. Il est important de noter ici qu'il devrait spécifiquement prédire la concentration en sucres solubles, puisque nous n'avons pas pu paramétrer la réduction du NO_3^- en fonction des autres ressources carbonées : amidon et acides organiques.

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Dans un contexte agronomique, ce travail se situe dans la production horticole en systèmes hydroponiques, dont un enjeu est de minimiser les apports nitriques, actuellement en fort excès par rapport aux stricts besoins des cultures. En effet, il apparaît une discordance entre : 1) les longs pas de temps englobant le cycle de culture, qui ont servi à établir les connaissances et les modèles agronomiques de la fertilisation minérale ; 2) l'extrême fractionnement de la fertirrigation à pas de temps quasi horaire, typique de l'hydroponie. Il a d'ailleurs été montré que la simple intrapolation des modèles d'une échelle de temps à une autre conduit à des incohérences (Le Bot *et al.*, 1998). Le manque de capteurs spécifiques permettant de témoigner « en ligne » de l'absorption des cultures, ainsi que la carence de connaissances adaptées à l'échelle horaire, confèrent un caractère occulte à la nutrition minérale à court terme, auquel les praticiens ont répondu empiriquement par des pratiques de surfertilisation systématique, qui garantissent des rendements élevés, mais dont l'effet pervers consiste en un gaspillage de minéraux dont le principal, le nitrate, est source de pollution. Le travail présenté ne prétend pas résoudre l'ensemble des questions pertinentes concernant les relations entre l'environnement et la nutrition azotée horaire, mais c'est une contribution à leur compréhension, centrée sur deux facteurs importants et examinés simultanément sur une plante typique de ces systèmes de culture, la tomate : l'intensité de la nutrition nitrique et le rayonnement lumineux par l'intermédiaire de l'alternance jour-nuit.

La thèse présentée est construite sur deux piliers : une approche expérimentale destinée à révéler les comportements nycthéméraux de la tomate exposée à divers changements nutritionnels, en termes de croissance, d'absorption et d'assimilation d'azote ; une approche de modélisation systémique, qui tente de donner à la plante une représentation, inspirée de connaissances physiologiques, devant expliquer et simuler les comportements observés à l'échelle de la plante entière.

5.1 Données expérimentales

Trois informations importantes devaient être caractérisées à court terme, la croissance, la vitesse d'absorption et celle de réduction du nitrate.

Expérimentalement, il s'agissait de mesurer, sur des durées de 24 à 48 h, l'évolution des biomasses au travers de prélèvements destructifs d'échantillons de plantes. Consi-

dérant l'espace restreint qu'offre une salle de culture, et donc le petit nombre de plantes à disposition, ce fut un défi que d'obtenir l'homogénéité et la reproductibilité nécessaires pour des mesures significatives à d'aussi faibles intervalles de temps. Divers procédés ont été combinés pour y parvenir : étude restreinte à la phase exponentielle de croissance ; semis excédentaire d'un facteur 3, suivi d'une sélection après levée ; aucune manipulation de plants du semis à la récolte afin d'éviter tout stress mécanique ; régulation de la température des solutions, en plus de celle de l'air ; régulation en continu de la composition des solutions nutritives (pH et $[NO_3^-]$) ; plan d'échantillonnage prenant en compte l'hétérogénéité d'éclairement de la salle de culture. Bien entendu, un plus grand nombre de plantes aurait permis d'améliorer la sensibilité, et/ou d'effectuer des expériences sur des durées plus longues. Néanmoins, ce protocole a permis de vérifier directement une caractéristique de la croissance : une accumulation de biomasse sèche exclusivement diurne contrastant avec celle de biomasse structurale monotone dans le nycthémère.

La distinction entre ces classes de biomasses s'avère donc fondamentale à cette échelle de temps puisque leurs proportions sont rapidement variables. Cependant, il importe ici de préciser les notions sous-jacentes et les concessions expérimentales auxquelles on est contraint. La biomasse structurale recouvre aussi bien des structures de soutien (cellulose, pectines, lignine etc.) que métaboliques (organites cellulaires, enzymes, ADN, etc.) qu'on ne peut raisonnablement évaluer de façon directe. C'est pourquoi on procède indirectement par différence entre masses sèches totale et non-structurale, ce qui déplace la difficulté vers l'évaluation de cette dernière. On sous-entend qu'elle est minoritaire, mais elle recouvre quand même un nombre imposant de composés, comportant les réserves auxquelles nous nous intéressons directement dans ce travail, et ceux qui n'appartiennent ni aux structures, ni aux réserves (composés volatiles, polyphénols, alcaloïdes, etc.). En pratique, parce qu'on ne connaît pas leur catalogue complet et en raison du coût que représenterait une vision exhaustive, on se limite au dosage des molécules ayant une fonction d'intérêt dans le modèle. Ainsi, pour l'étude de la gestion du carbone, les expérimentateurs se sont focalisés sur les contenus en sucres solubles et en amidon, parce qu'ils font figure d'intermédiaire entre l'acquisition par la photosynthèse et l'utilisation du C pour l'élaboration des structures. Un même principe aurait pu restreindre notre étude au dosage du nitrate, intermédiaire entre son absorption et sa réduction, et des acides aminés libres, intermédiaires entre l'assimilation et l'incorporation dans les structures. Cependant, la littérature ayant mentionné le fort impact de la nutrition azotée sur toutes les ressources carbonées, amidon, sucres solubles ainsi qu'acides organiques non-structuraux, leur prise en compte permettait d'éviter un biais connu. De plus, elle offrait l'opportunité d'aborder l'interaction entre les métabolismes C et N. Finalement, sur cette base, nos évaluations de la biomasse non-structurale se sont révélées très élevées, dépassant parfois 40% de la masse sèche des limbes. Sans doute, ces valeurs sous-estiment moins la biomasse non structurale qu'à l'habitude, mais nous ignorons l'importance du biais résiduel, imputable aux composés non analysés. On admet implicitement que les conséquences en sont minimes si le biais est systématique. Cependant, les réflexions en cours concernant les effets de l'azote sur la richesse en composés secondaires incitent à rester prudent (Stout *et al.*, 1998; Gayler *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2006b). Une façon de contourner ces questionnements a consisté à exprimer la croissance en termes d'accumulation d'azote structural, plutôt que de biomasse. En théorie, il y aurait deux avantages : permettre d'exprimer les activités métaboliques proportionnellement à l'azote structural, dont on admet qu'il constitue une des meilleures mesures globales de l'importance de

la machinerie métabolique ; restreindre le catalogue des molécules à doser aux seuls composés azotés. Dans l'ignorance de l'importance quantitative des composés azotés non dosés (peptides etc.), c'est surtout pour la première raison que nous avons exprimé la croissance de cette manière. La distinction entre N total et structural est en cohérence avec nos objectifs, mais n'est pas triviale. En pratique, la littérature se repose généralement sur N total pour évaluer la machinerie métabolique, au point que son analyse figure au catalogue des méthodes classiques de dosage des protéines totales (protéines$= 6{,}25 \times$ N). Nos évaluations montrent pourtant que, dans nos essais, l'azote non-structural représentait jusqu'à 9, 23 et 48 % de N total dans les limbes, racines et tiges, respectivement. Ceci montre que N total peut donner une vision très biaisée des structures métaboliques.

Une autre méthodologie, que nous ne pouvions mener de front avec cette étude, mériterait d'être tentée pour mettre en relation le statut azoté des plantes et la croissance : la mesure de la respiration à l'obscurité, dont on admet qu'elle en est une manifestation. Cette technique a contribué à l'étude des relations de la croissance avec le statut carboné des tomates (Gary, 1988a; Gent, 1984), et il ne semble pas y avoir d'obstacle à l'étendre au statut azoté. La méthode a l'inconvénient de reposer sur une mesure indirecte de la croissance, qui ne peut être interprétée qu'au travers d'un modèle de budget respiratoire, mais elle présente le double avantage de ne pas nécessiter de connaissances précises sur la composition des structures et, surtout, d'être d'une très grande sensibilité permettant d'aborder des pas de temps se chiffrant en minutes, non en heures. De plus, moyennant des adaptations matérielles, il serait envisageable d'effectuer des mesures directes de respiration sur les différentes classes d'organes en place, et donc d'en évaluer séparément la croissance.

La mesure de l'absorption du nitrate a tiré parti de la mise au point, par le laboratoire d'accueil et pendant le déroulement de cette thèse, d'un outil permettant de réguler avec précision la teneur en nitrate des solutions nutritives pendant toutes la durée des cultures, avec un pas de temps aussi fin que nécessaire, jusqu'à 5 minutes. Ceci a permis de cultiver les tomates sur des volumes de solution restreints et de composition stable, permettant d'augmenter la sensibilité sur le calcul de la vitesse d'absorption, information dont nous disposions en temps réel. Cette mesure n'était pas un objectif de la thèse, mais il était indispensable de l'effectuer avec le maximum de précision en tant qu'élément essentiel du bilan nitrique dont on déduit la vitesse de réduction. Bien que nos calculs de précision montraient la viabilité de cette approche, nous craignions que les larges variations journalières de l'absorption relatées dans la littérature, et vérifiées dans ce travail, n'aient un effet d'entrainement sur le calcul de la vitesse de réduction. Une observation originale a levé le doute : en conditions de nutrition limitante, les oscillations de l'absorption sont devenues imperceptibles, contrairement à celles, calculées, de la vitesse de réduction du nitrate. Notons que ce comportement de l'absorption semble général, puisqu'il a été vérifié dans le laboratoire sur deux autres cultures dans leur phase linéaire de croissance : chou chinois sous serre et pêcher en plein air. La méthode du bilan que nous avons employée n'a sans doute pas toute la sensibilité souhaitable, mais présente l'avantage d'être, par construction, non biaisée. En revanche, elle restreint l'évaluation de la réduction à la plante entière, sans donner d'information sur les contributions particulières des différentes classes d'organes. L'étude d'organes détachés (Gojon *et al.*, 1991b) a permis de démontrer l'intérêt de distinguer le nitrate anciennement et actuellement absorbé. Cependant, cette méthodologie est limitée à l'étude des feuilles, laissant de côté les tiges et leur rôle de réservoir, ainsi que les

racines dont la contribution à l'assimilation semble non négligeable, voire essentielle en nutrition limitante (Gojon *et al.*, 1994, 1991a). Les feuilles détachées permettent d'étudier leur dépendance du flux xylémien de nitrate imposé par l'expérience. Cependant, elles n'apportent rien sur la connaissance de ces flux sur les organes en place, relevant ainsi la principale faiblesse de ces études et de la nôtre : une incapacité à mesurer les flux xylémiens de nitrate sur la plante entière, alors que tout démontre leur rôle clé.

5.2 Modélisation

La modélisation proposée a été établie sur une décomposition des flux (absorption, transport, réduction, croissance) et une compartimentation faisant apparaître des réservoirs. La représentation que l'on donne de ces derniers conditionne fortement le comportement du modèle. Nous avons testé une représentation des plus simples en seulement 2 compartiments dits « de stockage » et « métabolique », transposant ainsi à la plante entière la compartimentation cellulaire du métabolisme nitrique sur laquelle se focalise la physiologie végétale. Cette transposition n'a pas donné satisfaction, sans que l'on puisse en déterminer précisément le point faible : en effet, s'agissant de compartiments virtuels, ni leur degré de remplissage, ni les flux de transport qui les unissent, ne peuvent être mesurés expérimentalement. Ces flux ne peuvent eux-mêmes s'appuyer sur une transposition des flux membranaires bi-direrionnels de nitrate, la bibliographie n'apportant pas de support. L'autre type de représentation que nous avons testé repose sur une compartimentation macroscopique, plus concrète, en classes d'organes. La question du déterminisme du transport y semble simplifiée par son caractère unidirectionnel, des racines aux limbes, mais se heurte tout de même à l'absence de mesure directe ainsi que de formalisme accepté rendant compte, pour cet ion, des relations entre les sources et les puits. Aussi, nous avons procédé empiriquement, en aveugle, par simple comparaison de formalismes dont les paramètres n'ont sans doute pas d'interprétation mécaniste. Quoiqu'il en soit, cette prise en compte des organes a conduit à des simulations de la vitesse de réduction du nitrate qui en reproduisent toutes les caractéristiques connues : le caractère oscillatoire dans le nycthémère ; la dominance de la période de jour par rapport à la nuit (pour des plantes bien alimentées) ; l'importance croissante de la réduction racinaire en conditions de restriction azotée, opposée à la domination des feuilles en nutrition pléthorique. Il convient de remarquer une particularité des oscillations : elles semblent anticiper les transitions jour-nuit et inversement, bien qu'en salle de culture le changement de régime lumineux soit brutal, sans signe avant-coureur. C'est sans doute une manifestation des oscillations de l'activité nitrate réductase, ou de son degré d'activation, qui possèdent la même propriété (Lea *et al.*, 2006; Scheible *et al.*, 1997c). Notre proposition de modèle ne spécifie pas explicitement les activités enzymatiques, mais tient compte de la concentration en sucres solubles qui semblent déterminer ce comportement, et dont il a été proposé qu'ils représentent le signal par lequel la lumière modifie l'activité nitrate réductase.

Ces qualités du modèle sont intéressantes, mais on ne peut nier certaines imperfections, soit que les réponses du modèle exagèrent ou au contraire atténuent les observations. C'est peut-être une conséquence d'imperfections dans les formalismes, mais aussi du degré de compartimentation adopté. Il serait intéressant, par exemple, de mesurer le gain qu'apporterait la compartimentation conceptuelle des organes en nitrate stocké et métabolique. Le prix de cette amélioration du réalisme est un accroissement

du nombre de paramètres, et une plus grande difficulté calculatoire pour en approcher les valeurs par optimisation. Le jeu pourrait néanmoins en valoir la chandelle, si l'on considère qu'une retombée concerne la prédiction de la teneur en nitrate des organes en relation avec la qualité des productions. C'est surtout sur ce critère que les défauts apparaissent dans le modèle actuel, en particulier pour la teneur en nitrate des racines.

Cependant, l'absence d'autonomie est la véritable limite à l'utilisation du modèle en l'état, puisqu'il nécessite un couplage avec un modèle d'absorption du nitrate, un modèle de gestion du carbone et, enfin, un modèle de croissance. Des modèles de gestion du carbone pré-existent, en particulier pour la tomate, mais ils nécessitent des évolutions pour faire apparaître explicitement les sucres solubles. En effet, ils considèrent un pool unique de ressources carbonées, sans en détailler aucune composante. De plus, ils doivent être paramétrés selon chaque classe d'organes, racines comprises, ce qui n'est pas le cas actuellement. L'absorption nitrique a été mesurée et non simulée. *A priori* le couplage à un modèle d'absorption ne devrait pas présenter de difficulté : le laboratoire en a développé un préalablement, sur la même variété de tomate et dans les mêmes conditions de culture (Cardenas-Navarro *et al.*, 1998, 1999b,a; Cardenas-Navarro, 1998). Notons que l'observation originale signalée plus haut, la perte des oscillations de l'absorption en conditions de nutrition limitantes aurait sans doute pu être prévue à partir de ce modèle. En effet, il prédit la vitesse d'absorption selon une relation décroissante avec le statut nitrique de la plante. L'explication de nos observations tient à la non-linéarité de cette relation (similaire à eqn. 4.12 dans le chapitre 4), telle que la pente est forte lorsque la plante est riche en nitrate, et très faible dans le cas contraire. Autrement dit, la vitesse d'absorption est quasi indépendante du statut nitrique des plants pauvres, mais y extrêmement sensible dans le cas contraire.

Cette fonction est à la base d'un principe homéostatique, l'idée sous-jacente étant que l'absorption ne peut se poursuivre indéfiniment lorsque la plante n'utilise pas le nitrate absorbé. Un mécanisme régulateur est nécessaire pour réfréner l'absorption des plantes bien nourries. Nous avons tenté d'appliquer cette logique aux acides aminés libres : un mécanisme doit exister pour empêcher les systèmes d'assimilation d'accumuler des acides aminés inutilisés par la croissance. Les données de la physiologie vont dans ce sens, certains acides aminés (glutamine, acides glutamique et aspartique) exerçant une rétroaction négative sur l'expression de la nitrate réductase (Lea *et al.*, 2006). Aucune amélioration n'a cependant été apportée dans notre modèle, soit en raison d'un jeu de données expérimentales peu propice à révéler cette propriété, soit en raison de la globalisation des acides aminés en un pool unique, que nous avons préférée par souci de simplification. Il serait sans doute pertinent de tester à nouveau l'hypothèse de la rétroaction en ciblant un sous-ensemble d'acides aminés. L'intérêt qu'on leur porte ne se focalise pas sur leur rôle modérateur de l'assimilation, mais se justifie aussi par leur statut de source d'azote dans un modèle croissance. Nous avons proposé un tel modèle, qui ouvre donc la voie au couplage avec l'assimilation du nitrate. On notera que dans sa version actuelle, le modèle a tendance à sous estimer la croissance en nutrition pléthorique. Là aussi, la globalisation des acides aminés pourrait en être la cause, et un ré-examen de la croissance en fonction d'une partie d'entre eux serait souhaitable. Cependant, c'est surtout l'absence d'effet significatif du statut carboné sur la croissance qui intrigue. On peut arguer que c'est une conséquence logique de l'absence de traitement spécifique de la nutrition carbonée dans nos expériences. Cependant, le statut carboné de nos plantes y était variable et peu corrélé au statut azoté, situation théoriquement favorable à démêler les effets respectifs des 2 ressources. De plus, des modèles

de croissance et de gestion du carbone par la tomate ont déjà été paramétrés, sans appliquer de traitement C spécifiques, sur la simple base des variations journalières du statut carboné endogène. Nous estimons que nos expériences couvrent la même gamme de variation et que l'effet du statut carboné, s'il est réel, aurait dû être détecté. Il apparait donc important de ré-examiner la modélisation de la croissance en fonction des statuts carboné et azoté, sur une base expérimentale croisant des traitements azotés, comme dans le présent travail, et carboné (par exemple, enrichissement ou appauvrissement de l'air en CO_2).

Chapitre 6

Annexes

6.1 Activité respiratoire et teneur en Carbone

Afin de faciliter le paramétrage des ressources carbonées dans un modèle de croissance nous avons recherché des données dans la littérature. Gary (1988a) a étudié la respiration de jeunes plants de tomate, dont il suit, entre autres, l'évolution des réserves glucidiques (glucose, fructose, saccharose) au cours d'une obscurité prolongée de 48 heures à différents températures, dont nous avons recueilli les données à 20°C (figure 6.1). On fait l'hypothèse que la respiration totale de ces plantes est proportionnelle à leur vitesse de croissance et suit une relation saturable de type Michaelis-Menten avec la concentration en sucres solubles. Le Km exprimé sur une base de matière sèche a été converti sur une base d'eau de végétation (kg_C), en se basant sur la teneur en matière sèche de nos propres échantillons, soit : $kg_C = 82$ mol C m^{-3} H_2O

6.2 Dispositif de culture

La figure 6.2 présente l'implantation de la culture dans le phytotron. Celle-ci a été optimisée pour cultiver un nombre maximum de plantes en évitant 1) qu'elles n'interagissent sur le plan de l'interception de la lumière ; 2) que les racines de plantes voisines sur un même tube ne s'emmêlent. Deux réseaux de solution nutritive (non figurés) permettent soit d'alimenter 1 tube de culture sur 2 par des solutions différentes, soit de basculer rapidement l'ensemble de la culture d'une nutrition à une autre. Un troisième réseau permet de distribuer une solution de rinçage. Ils comportent : en contrebas dans une fosse adjacente au phytotron, les cuves de solutions (figure 6.9) munies chacune de capteurs et serpentins inox pour leur climatisation et de 2 pompes centrifuges véhiculant la solution, l'une auprès de la culture, l'autre auprès de l'automate d'analyse et de régulation des solutions nutritives ; une canalisation apportant la solution de la pompe à l'amont des tubes de culture ; une autre recueillant les solutions s'écoulant par gravité à l'aval des tubes, jusqu'à la cuve où l'égout. La figure 6.6 présente le plan de culture après suppression de 2 plants sur 3 (dixième jour après semis). La figure 6.8 montre un plant de tomate au stade expérimental, 19 jours après semis.

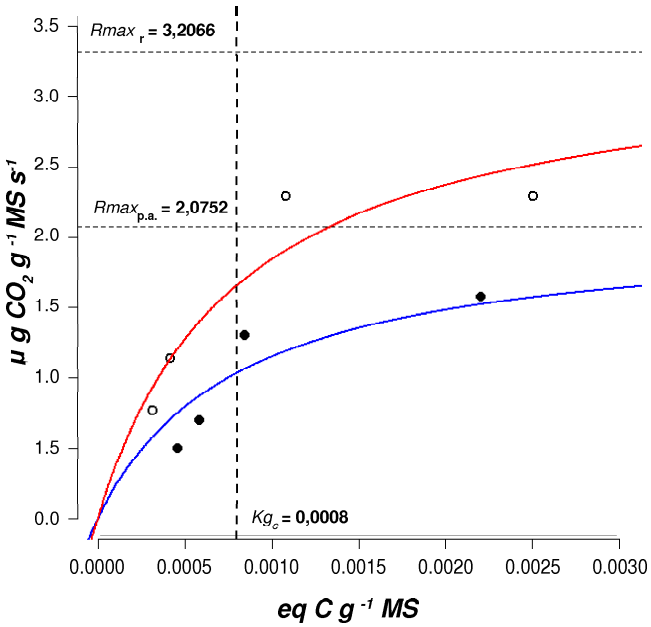


FIG. 6.1: *Relation entre l'activité respiratoire et la teneur en sucres solubles (en équivalents C par g de matière sèche) des parties aériennes (symboles fermés) et racines (symboles ouverts) de tomate. Les mesures sont effectuées en cours d'obscurité prolongée de 24 heures, sur de jeunes plants cultivés à 20 °C. Les lignes continues sont des ajustements non linéaires selon la formule de Michaelis-Menten, sur la base d'un Km commun aux parties aériennes (bleu) et aux racines (rouge). Les tiretés marquent le Km commun (vertical, 0,0080 mol C g^{-1} ms) et les respirations maximales de chaque organe (horizontales). D'après Gary (1988a).*

6.3 Automate de régulation des solutions nutritives

L'automate (figure 6.4) conçu localement est constitué d'instruments de laboratoire pilotés par un microordinateur, et réalise trois fonctions :

fonction d'analyse : Chaque cuve (figure 6.9) est munie d'un capteur optique, placé dans un vase communiquant, et permettant de déterminer si le niveau de solution nutritive est à sa valeur de consigne. Un pH mètre et une sonde pH sont aussi affectés à chaque cuve. Le nitrate est analysé par spectrophotométrie UV. Le spectrophotomètre, muni d'un chariot mobile porte cellules, est équipé d'autant de cellules en quartz que de solutions nutritives à piloter (jusqu'à 7). Les solutions sont filtrées et pompées en continu au travers des cellules en quartz. A chaque cycle, les solutions sont analysées séquentiellement en présentant successivement les cellule devant le faisceau UV de mesure. L'analyse procède par déconvolution spectrale à 5 longueurs d'onde (201, 206, 214, 226 et 280 nm), autrement dit en déterminant les concentrations des 2 composés optiquement actifs (nitrate et EDTA-Fe) qui minimisent la somme des carrés des écarts avec les absorbances mesurées.

fonction de régulation : A chaque cycle analytique, deux solutions mères titrées (H_2SO_4 et NO_3^-), sont injectées à l'aide de seringues de laboratoire pilotées (résolution 2000 pas), afin de rétablir les consignes (figure 6.3). Le calcul tient compte du volume de solution nutritive, du titre des solutions mères, et de l'écart entre les mesures et les consignes. La solution mère de nitrate est un mélange de nitrate de K, Ca et Mg. Leurs proportions molaires (0,58 / 0,29 / 0,13) ont été calculées sur la base de l'analyse de plantes entières lors d'essais préliminaires. Cette pratique limite les dérives de

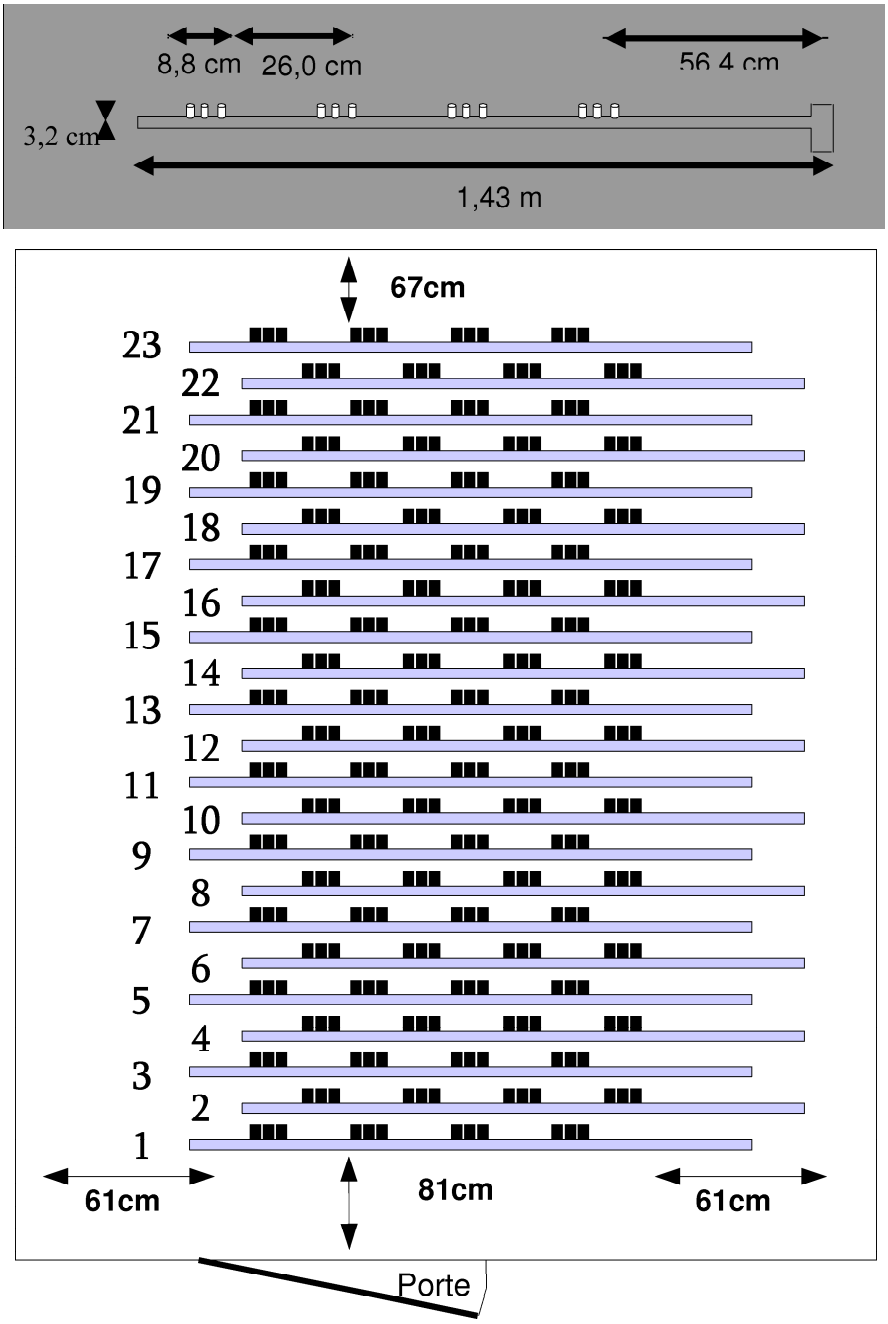


FIG. 6.2: *Implantation de la culture dans le phytotron. Le fond gris clair dénote l'espace du phytotron. Les tubes parallèles horizontaux (numérotés de 1 à 23) figurent les tubes de culture dont une vue de profil est présentée sur fond gris foncé. Sur chaque tube de culture, sont insérés 4 groupes de 3 tubes verticaux, munis à leur base de tamis servant de support à la plante dès le semis. Après levée, la culture est homogénéisée par élimination de 2 plantules par groupe de 3, sans manipuler la troisième. La disposition générale en quinconce permet de maintenir les plantes en situation isolée par rapport à la lumière. L'ensemble des tubes de culture est disposé sur une table semi-roulante (non figurée) permettant de maintenir la zone cultivée à peu près centrée dans la salle, et, temporairement d'élargir une allée sur un côté pour permettre le passage d'un expérimentateur.*

composition de la solution. Les contrôles effectués montrent que sur la durée de nos cultures, les concentrations de cations dérivent de moins de 5%. La concentration en sulfate s'accroît en cours de culture, en raison des apports de H_2SO_4. Seul le phosphate s'appauvrit, de 1,00 à 0,89 mol m^{-3}. Enfin, le volume de solution est rétabli par ajout d'eau déionisée jusqu'à ce que le capteur indique que le niveau de consigne est atteint. Le volume apporté est mesuré par un débitmètre en ligne sur la canalisation d'admission d'eau.

fonction d'archivage : Tous les paramètres expérimentaux, les mesures et les actions, sont automatiquement archivés dans des fichiers pendant le déroulement de l'expérience. Un logiciel annexe organise automatiquement les données dans un tableur pour en faciliter l'exploitation.

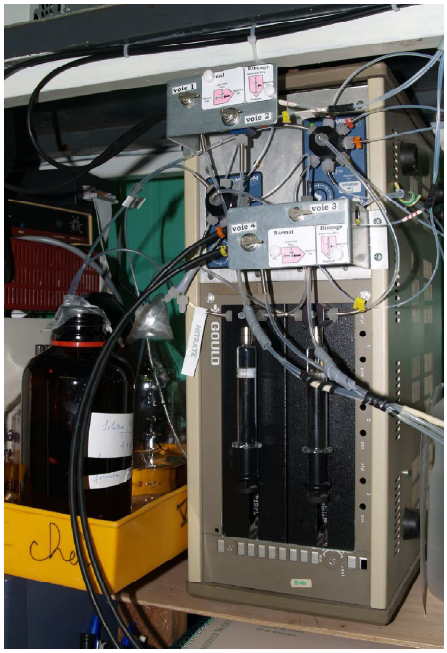


FIG. 6.3: *Vue détaillée de l'automate de régulation des solutions nutritives : Pousse-seringues et vannes de distribution de solutions-mères.*

6.4 Échantillonnage et hétérogénéité du rayonnement

L'intensité du rayonnement photosynthétiquement actif (PPFD) a été mesurée par un capteur au silicium (Li-Cor, LI-190) à chaque emplacement de plante (Moyenne 320 μmol m^{-2} s^{-1}, écart-type = 22). La figure 6.5 montre la répartition de l'hétérogénéité dans la salle de culture, ainsi que la disposition des plantes. Des analyses de covariance ont révélé une corrélation significative entre la matière sèche des plantes à une date de récolte et cette intensité. Afin de minimiser le biais induit par cette hétérogénéité, à chaque récolte, l'échantillonnage a consisté à prélever 1 plante au hasard à l'intérieur de chacune des 6 zones figurées.

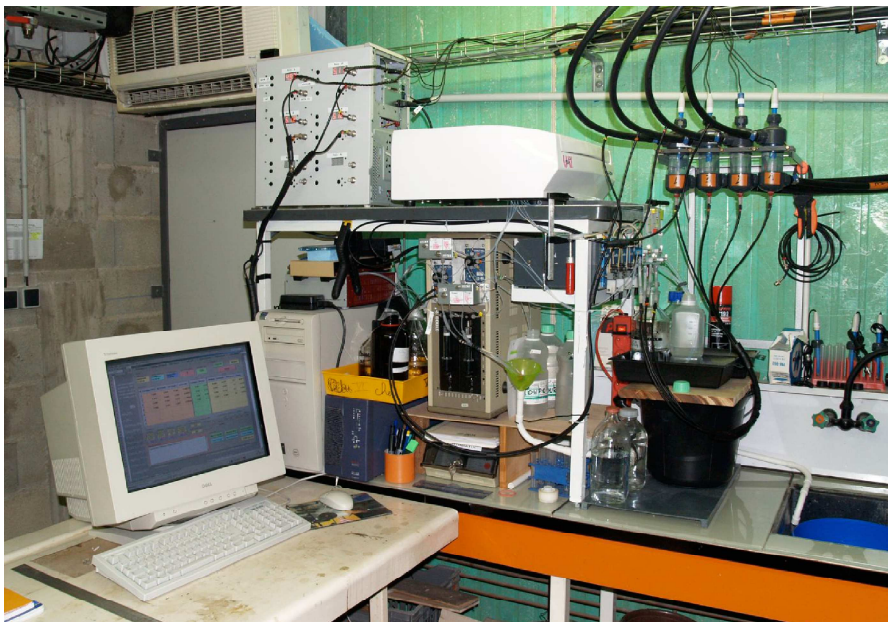


FIG. 6.4: *Vue générale de l'automate de régulation des solutions nutritives.*

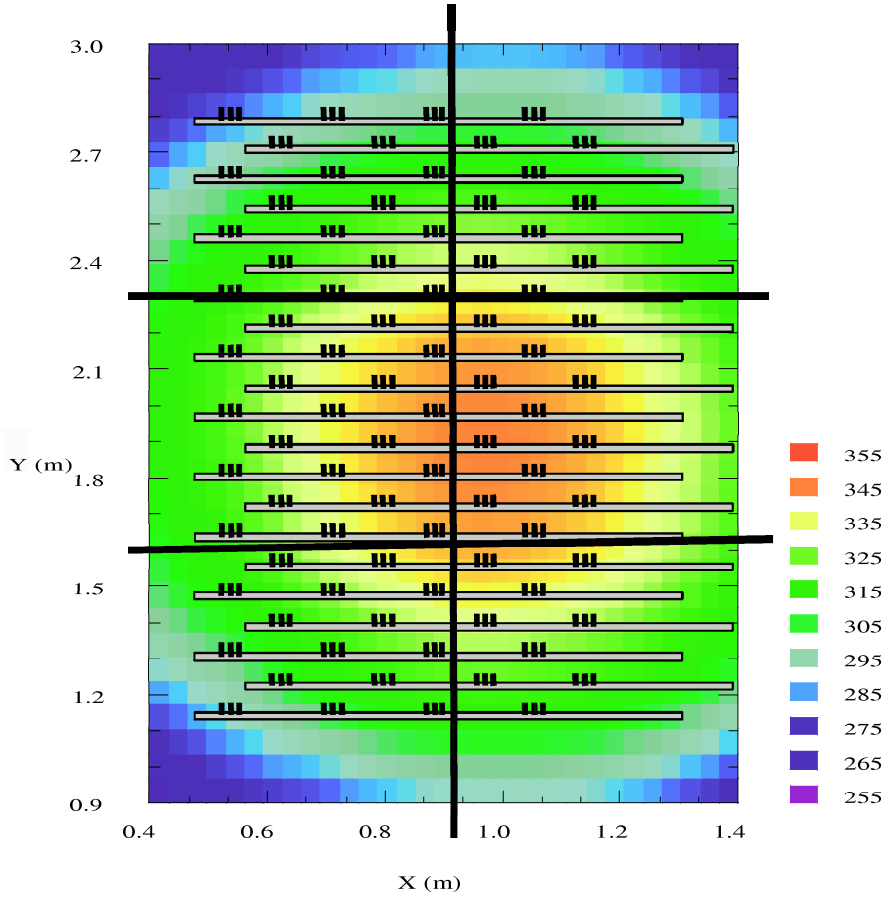


FIG. 6.5: *Distribution de l'intensité du PAR ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) au niveau de la table de culture. Les lignes délimitent les 6 zones de prélèvement lors des récoltes.*

FIG. 6.6: *Culture de Tomate en phytotron, 10 jours après semis. Remarquer la mousse d'isolation thermique gainant les tubes de culture, et 2 marques jouxtant les plantules. Elles trahissent l'emplacement de deux autres plantes, supprimées ce même jour pour homogénéiser la culture.*

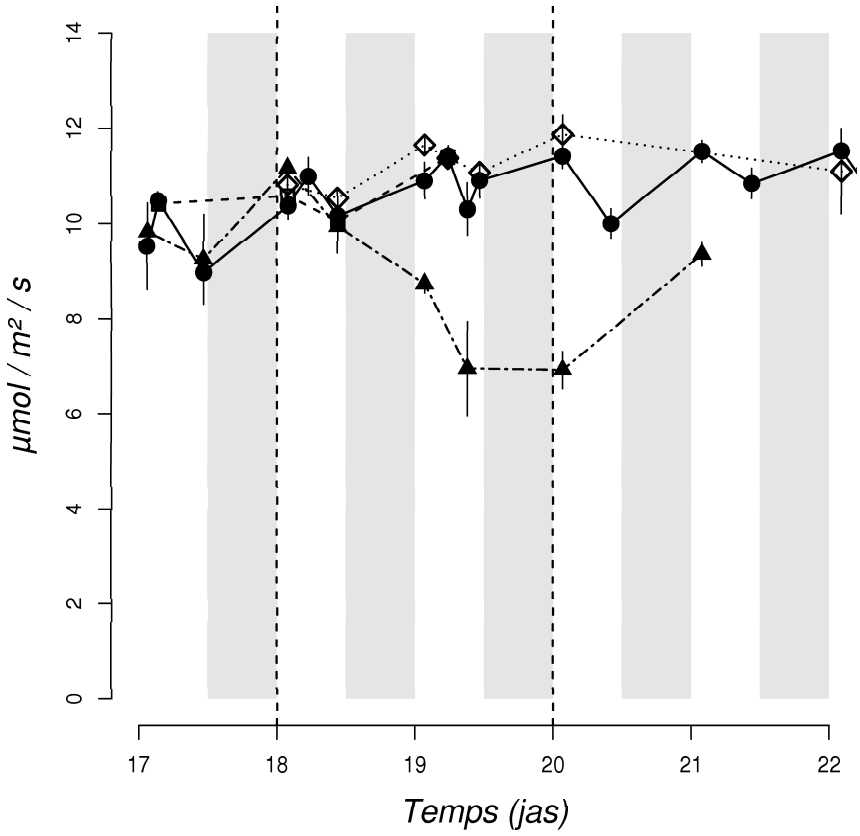


FIG. 6.7: *Influence de la nutrition sur l'intensité de la photosynthèse nette (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) mesurée par un système portable (CIRAS-1 avec illuminateur intégré, version 2.7, IRGA différentiel CO_2 / H_2O, surface de chambre 2,5 cm^2) sur le plus grand foliole. Les conditions dans la cellule de mesure ont été fixées aux valeurs caractéristiques régnant dans le phytotron : PPFD = 377 µmol m^{-2} s^{-1} ; température = 20 °C ; [CO_2] à la sortie = 370 ppm ; pression de vapeur d'eau = 14 mbar. Les plants de tomate ont été cultivés pendant 22 jours sur une solution à 3,00 mol NO_3 m^{-3} (cercles fermés), excepté pendant une période délimitée par les tirets verticaux, où certaines ont été exposées temporairement à 0,020 (losanges ouverts), 0,010 (carrés ouverts) ou 0,000 (triangles fermés) mol NO_3 m^{-3}. Les barres verticales dénotent l'écart-type des mesures entre plantes.*

6.5 Mesures de photosynthèse

L'intensité de la photosynthèse par unité de surface foliaire a été régulièrement mesurée au cours de nos essais, sur 8 plantes excédentaires, jamais récoltées. Les mesures, de l'ordre de 11 μmol CO_2 m^{-2} s^{-1} dans les conditions environnementales du phytotron, sont assez reproductibles d'essais en essais et représentent environ la moitié du Pmax (20,0 μmol CO_2 m^{-2} s^{-1} à 1000 μmol m^{-2} s^{-1} PPFD). La figure 6.7 montre que l'application temporaire (48 h) de nutritions N limitantes pour la croissance (0,010 - 0,020 mol NO_3 m^{-3}) n'a eu aucun effet mesurable sur l'efficacité photosynthétique. En revanche, l'application d'une carence N totale l'a réduite d'environ 1/3 après 24 h de carence. Le rétablissement de la pleine nutrition N augmente rapidement l'efficacité.

FIG. 6.8: *Plant de tomate au stade expérimental, 19 jours après semis. Les règles donnent l'échelle en cm.*

FIG. 6.9: *Cuve de solution nutritive.*

Liste des illustrations

1.1 Gestion des ressources : modèle carbone . . . 11
1.2 Gestion des ressources : modèle azote . . . 12
1.3 Gestion des ressource : modèle à deux compartiments azotés . . . 13
1.4 Métabolisme du NO_3^- . . . 13
1.5 Métabolisme du NO_3^- à l'échelle cellulaire . . . 15
1.6 Régulation de la Nitrate Réductase . . . 20
1.7 Deux représentations de la compartimentation du métabolisme du nitrate . . . 25

2.1 Croissance à long-terme . . . 32
2.2 Evolution nycthémérale de la biomasse sèche et de ses composantes . . . 34
2.3 Composantes de la biomasse sèche . . . 36
2.4 Evolution nycthémérale de la teneur NO_3^- . . . 38
2.5 Evolution nycthémérale de la teneur en N des acides aminés libres . . . 39
2.6 Evolution nycthémérale de la teneur en C d'amidon . . . 41
2.7 Evolution nycthémérale de la teneur en C des sucres solubles . . . 42
2.8 Evolution nycthémérale de la teneur en C des acides organique non structuraux . . . 43
2.9 Evolution nycthémérale de la teneur en C des acides aminés libres . . . 44

3.1 Flux de N et croissance . . . 51
3.2 Accumulation d'azote structural : plante entière . . . 55
3.3 Accumulation d'azote structural : limbes . . . 57
3.4 Accumulation d'azote structural : tiges et pétioles . . . 60
3.5 Accumulation d'azote structural : racines . . . 61
3.6 Rapport du N structural des racines à celui des parties aériennes . . . 63

4.1 Flux de réduction conceptuelle . . . 67
4.2 Flux de réduction compartimenté entre organes . . . 68
4.3 Formalismes de rétroaction sur $g''(nr)$ . . . 75
4.4 Cinétiques d'absorption et de réduction du nitrate . . . 80
4.5 Comparaison des vitesses d'absorption et de réduction . . . 81
4.6 Substrats pour le modèle de réduction . . . 82
4.7 Simulation du modèle à compartimentation conceptuelle . . . 83
4.8 Modèles de réduction . . . 88
4.9 Modèles de transport . . . 90

6.1 Activité respiratoire et sucres solubles . . . 100
6.2 Implantation de la culture dans le phytotron . . . 101
6.3 Automate : vue détaillée . . . 102
6.4 Automate : vue générale . . . 103

6.5 Hétérogénéité du PPFD dans le phytotron 103
6.6 Culture de Tomate en phytotron : Vues générale 104
6.7 Photosynthèse nette et nutrition N 104
6.8 Culture de Tomate en phytotron : Vues rapprochée 105
6.9 Cuve de solution nutritive 106

Liste des tableaux

3.1 Variables et parametères 53
3.2 Corrélation entre métabolites 54
3.3 Valeurs des paramètres du modèles de croissance 62

4.1 Variables et paramètres 77
4.2 Rétroaction des acides aminés 79
4.3 Comparaison des modèles de réduction 85
4.4 Comparaison des modèles de transport 86

Bibliographie

Abrol, Y. P., Sawhney, S. K., and Naik, M. S. (1983). Light and dark assimilation of nitrate in plants. *Plant, Cell and Environment*, **6**(8), 595–599.

Adamowicz, S. (1980). Mise en évidence des « pools » de nitrate par la méthode de mesure *in vivo* de la nitrate réductase. *Physiologie Végétale*, **18**(3), 453–461.

Adamowicz, S. and Le Bot, J. (1999). Trends in modelling nitrate uptake. *Acta Horticultura*, **507**, 231–239.

Agren, G. I. and Franklin, O. (2003). Root :shoot ratios, optimization and nitrogen productivity. *Annals of Botany*, **92**(6), 795–800.

Andrews, M. (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell and Environment*, **9**, 511–519.

Andrews, M., Sutherland, J. M., Thomas, R. J., and Spren, I. J. (1984). Distribution of nitrate reductase activity in six legumes : the importance of the stem. *New Phytologist*, **98**(2), 301–310.

Andriolo, J. L. (1995). *Analyse des flux de NO_3^-, H_2O et CO_2 au cours de la culture et du nycthémère chez la tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) adulte en hors-sol*. Thèse, USTL Montpellier II.

Aslam, M. and Huffaker, R. C. (1982). In vivo nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings in light and darkness. *Plant physiology*, **70**, 1009 – 1013.

Aslam, M., Travis, R. L., and Rains, D. W. (2001). Diurnal flucuations of nitrate uptake and in vivo nitrate reductase activity in pima and acala cotton. *Crop Science*, **41**, 372–378.

Ball, R. A., Sabbe, W. E., and DeLong, R. E. (1998). Starch and nitrogen status in soybean during shading and nutrient defeciency. *Journal of Plant Nutrition*, **21**(4), 665–685.

Ben Zioni, A., Vaadia, Y., and Lips, S. H. (1971). Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. *Physiologia Plantarum*, **24**, 288–290.

Bertin, N. and Gary, C. (1993). Évaluation d'un modèle dynamique de croissance et de développement de la tomate (*Lycopersicon esculentum* mill), tomgro, pour différents niveaux d'offre et de demande en assimilats. *Agronomie*, **13**, 395–405.

Bijlsma, R. J. and Lambers (2000). A dynamic whole-plant model of integrated metabolism of nitrogen and carbon. 2. Balanced growth driven by C fluxes and regulated by signals from C and N substrate. *Plant and Soil*, **220**(1/2), 71–87.

Bijlsma, R. J., Lambers, H., and Kooijman, S. A. L. M. (2000). A dynamic whole-plant model of integrated metabolism of nitrogen and carbon. 1. Comparative ecological implications of ammonium-nitrate interactions. *Plant and Soil*, **220**(1/2), 49–69.

Black, B. L., Fuchigami, L. H., and Coleman, G. D. (2002). Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar. *Tree Physiology*, **22**, 717–724.

Botrel, A. and Kaiser, W. M. (1997). Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta*, **201**(4), 496–501.

Breteler, H. and Nissen, P. (1982). Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiology*, **70**, 754–759.

Brewitz, E., Larsson, C.-M., and Larsson, M. (1996). Responses of nitrate assimilation and N translocation in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill) to reduced ambient air humidity. *Journal of Experimental Botany*, **47**(7), 855–861.

Britto, D. T. and Kronzucker, H. J. (2003). The case for cytosolic NO_3^- heterostasis : a critique of a recently proposed model. *Plant, Cell and Environment*, **26**(2), 183–188.

Brouquisse, R., James, F., Pradet, A., and Raymond, P. (1992). Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta*, **188**(3), 384–395.

Brun, R. and Blanc, D. (1987). *Cinétique de l'absorption hydrique et minérale composition des solutions*. INRA Publications, Paris, 1 edition.

Brunetti, N. and Hageman, R. H. (1976). Comparison of in vivo and in vitro assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* l.) seedlings. *Plant Physiology*, **58**, 583–587.

Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation : Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 277–303.

Cardenas-Navarro, R. (1998). *Modélisation de l'absorption du nitrate à pas de temps court. Analyse écophysiologique du rétrocontrôle par le nitrate interne*. Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Cardenas-Navarro, R., Adamowicz, S., and Robin, P. (1998). Diurnal nitrate uptake in young tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) plants : test of a feedback-based model. *Journal of Experimental Botany*, **49**(321), 721–730.

Cardenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Gojon, A., and Robin, P. (1999a). Modelling nitrate influx in young tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) plants. *Journal of Experimental Botany*, **50**(334), 625–635.

Cardenas-Navarro, R., Adamowicz, S., and Robin, P. (1999b). Nitrate accumulation in plants : a role for water. *Journal of Experimental Botany*, **50**(334), 613–624.

Chaffei, C., Gouia, H., Masclaux, C., and Ghorbel, M. H. (2003). Réversibilité des effets du cadmium sur la croissance et l'assimilation de l'azote chez la tomate *Lycopersicon esculentum*. *Biologie et pathologie végétales*, **326**(4), 401–412.

Chapin III, F. S., Walter, C. H. S., and Clarkson, D. T. (1998). Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by absicic acid, water relations and photosynthesis. *Planta*, **173**(3), 352–366.

Clarkson, D. T. (1993). Roots and the Delivery of Solutes to the Xylem. *Royal Society of London Philosophical Transactions Series B*, **341**, 5–17.

Clement, C. R., Hopper, M. J., Jones, L. H. P., and Leafe, E. L. (1978). The uptake of nitrate by *Lolium perenne* from flowing nutrient solution. II. Effect of light, defoliation, and relationship to CO_2 Flux. *Journal of Experimental Botany*, **29**(112), 1173–1183.

Cram, W. J. (1983). Chloride accumulation as a homeostatic system : Set points and perturbations, the physiological significance of influx isotherms, temperature effects and the influence of plant growth substances. *J. Exp. Bot.*, **34**(11), 1484–1502.

Cramer, M. D., Nagel, O. W., Lips, S. H., and Lambers, H. (1995). Reduction, assimilation and transport of N in normal and gibberellin-deficient tomato plants. *Physiologia Plantarum*, **95**(3), 347–354.

De Cires, A., De la Torre, A., Delgado, B., and Lara, C. (1993). Role of light and CO_2 fixation in the control of nitrate-reductase activity in barley leaves. *Planta*, **190**(2), 277–283.

De Groot, C. C., Marcelis, L. F. M., van den Boogaard, R., and Lambers, H. (2002). Interactive effects of nitrogen and irradiance on growth and partitioning of dry mass and nitrogen in young tomato plants. *Functional Plant Biology*, **29**(11), 1319–1328.

De Groot, C. C., van den Boogaard, R., Marcelis, L. F. M., Harbinson, J., and Lambers, H. (2003). Contratsting effects of N and P derivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. *Journal of Experimental Botany*, **54**(389), 1957–1967.

De la Haba, P., Agüera, E., Benitez, L., and Maldonado, J. M. (2001). Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Plant Science*, **161**(2), 231–237.

Debouba, M., Gouia, H., Valadier, M. H., Ghorbel, M. H., and Suzuki, A. (2006). Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**(6), 409–419.

Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., and Passama, L. (1995). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants I. Changes in NO_3^- influx, efflux , and N utilization in the plant during the day/night cycle. *Journal of Experimental Botany*, **46**(10), 1585–1594.

Delhon, P., Gojon, A., Tillard, P., and Passama, L. (1996). Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants III. Implication of Dijkshoorn-Ben Zion medel in relation with the diurnal changes in NO_3^- assimilation. *Journal of Experimental Botany*, **47**(7), 885–892.

Dorbe, M.-F., Caboche, M., and Daniel-Vedele, F. (1992). The tomato nia gene complements a nicotiana plumbaginifolia nitrate reductase-deficient mutant and is properly regulated. *Plant Molecular Biology*, **18**(2), 363–375.

Ericsson, T. (1995). Growth and shoot :root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil*, **168-169**(1), 205–214.

Evans, R. D., Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., and Ehleringer, J. R. (1996). Nitrogen isotope composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5) grown under ammonium or nitrate nutrition. *Plant, Cell and Environement*, **19**(11), 1317–1323.

Ferrari, T. E., Yoder, O. C., and Filner, P. (1973). Anaerobic nitrite production by plant cells and tissue : Evidence for two nitrate pools. *Plant Physiology*, **51**(3), 423–431.

Ferrario, S., Valadier, M. H., and Foyer, C. H. (1996). Short-term modulation of nitrate reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. *Planta*, **199**(3), 366–371.

Ferrario-Méry, S., Murchie, E., Hirel, B., Galtier, N., Quick, P. W., and Foyer, C. H. (1997). Manipulation of the pathways of sucrose biosynthesis and nitrogen assimilation in transformed plants to imrpove photosynthesis and productivity. In C. H. F. a. W. P. Quick, editor, *A molecular approach to prymary metabolism in higher plants*, pages 125–153. Taylor and Francis, Great Britain.

Foyer, C. H., Parry, M., and Noctor, G. (2003). Markers and signals associates with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, **54**(382), 585–593.

Franko, U., Oelschlägel, B., and Schenk, S. (1995). Simulation of temperature-, water- and nitrogen dynamics using the model CANDY. *Ecological Modelling*, **81**(1-3), 213–222.

Fritz, C., Mueller, C., Matt, P., Feil, R., and Stitt, M. (2006a). Impact of the C-N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment*, **29**(11), 2055–2076.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006b). Regulation of secondary metabolism by the carbonnitrogen status in tobacco : nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant journal*, **46**(4), 533–548.

Gary, C. (1988a). Relation entre température, teneur en glucides et respiration de la plante entière chez la tomate en phase végétative. *Agronomie*, **8**(5), 419–424.

Gary, C. (1988b). Un modèle simple de simulation des relations microclimat-bilan carboné chez la tomate en phase végétative. *Agronomie*, **8**(8), 685–692.

Gayler, S., Leser, C., Priesack, E., and Treutter, D. (2004). Modelling the effect of environmental factors on the "trade-off" between growth and defensive compounds in young apple trees. *Trees*, pages 363–371.

Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Harnecker, J., Schulze, E. D., Ludewig, F., Sonnewald, U., Scheible, W. R., and Stitt, M. (1998). Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell and Environment*, **21**(3), 253–268.

Geiger, M.and Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., and Stitt, M. (1999). The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environement*, **22**(10), 1177–1199.

Gent, M. P. N. (1984). Carbohydrate level and growth of tomato plants. i. the effect of carbon dioxide enrichment and diurnally fluctuating temperatures. *Plant Physiology*, **76**(3), 694–699.

Gent, M. P. N. (1986). Carbohydrate level and growth of tomato plants. *Plant Physiology*, **81**(4), 1075–1079.

Gent, M. P. N. and Enoch, H. Z. (1983). Temperature dependence of vegetative growth and dark respiration : a mathematical model. *Plant Physiology*, **71**, 562–567.

Gojon, A., Soussana, J.-F., Passama, L., and Robin, P. (1986). Nitrate reduction in roots and shoots of barley (*Hordeum vulgare* L.) and corn (*Zea mays* L.) seedlings. I. ^{15}N study. *Plant Physiology*, **82**, 254–260.

Gojon, A., Bussi, C., Grignon, C., and Salsac, L. (1991a). Distribution of NO_3^- reduction between roots and shoots of peach tree seedlings as affected by NO_3^- uptake rate. *Physiologia Plantarum*, **82**(4), 505–512.

Gojon, A., Wakrm, R., Passama, L., and Robin, P. (1991b). Regulation of NO_3^- assimilation by anion availability in excised soybean leaves. *Plant Physiology*, **96**, 398–405.

Gojon, A., Plassard, C., and Bussi, C. (1994). Root/shoot distribution of NO_3^- assimilation in herbaceous and woody species. In G. E. Roy J, editor, *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions.*, pages 131–147. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.

Gojon, A., Grignon, N., Tillard, P., Massiot, P., Lefebvre, F., Thellier, M., and Ripoll, C. (1996). Imaging and microanalysis of ^{14}N and ^{15}N by SIMS microscopy in yeast and plant samples. *Cellular and Molecular Biology*, **42**(3), 351–360.

Gojon, A., Dapoigny, L., Lejay, L., Tillard, P., and Rufty Jr., T. W. (1998). Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on $^{15}NO_3^-$ uptake and reduction in nicotiana plants. *Plant, Cell and Environement*, **21**, 43–53.

Gomez, L., Rubio, E., and Auge, M. (2002). A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**(4), 360–369.

Gomez, L., Bancel, D., Rubio, E., and Vercambre, G. (2007). The microplate reader : an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues. Validation of a micro-method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**(10), 1893–1905.

Goutouly, J. P. and Habib, R. (1996). Variations nycthémérales et spatiales de la capacité d'absorption de NO_3^- chez le pêcher. *Agronomie*, **16**(6), 337–345.

Grechi, I., Vivin, P., Hilberta, G., Milina, S., Roberta, T., and Gaudillère, J.-P. (2007). Effect of light and nitrogen supply on internal c :n balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine. *Environmental and Experimental Botany*, **59**(2), 139–149.

Guérin, V., Huché-Théliera, L., and Charpentier, S. (2007). Mobilisation of nutrients and transport via the xylem sap in a shrub (*Ligustrum ovalifolium*) during spring growth : N and C compounds and interactions. *Journal of Plant Physiology*, **164**(5), 562–573.

Herdel, K., Schmidt, P., Feil, R., Mohr, A., and Schurr, U. (2001). Dynamics of concentrations and nutrient fluxes in the xylem of *Ricinus communis* diurnal course, impact of nutrient availability and nutrient uptake. *Plant, Cell and Environment*, **24**(1), 41–52.

Iijima, M., Oribe, Y., Horbibe, Y., and Kono, Y. (1998). Time lapse analysis of root elongation rates of rice and sorghum during the day and night. *Annals of Botany*, **81**(5), 603–607.

Ingestad, T. and Agren, G. I. (1992). Theories and methods on plant nutrition and growth. *Physiologia plantarum*, **84**, 177–184.

Ivashikina, N. V. and Sokolov, O. A. (2004). Regulation of nitrate absorption control by concomitant cations : changes in the bioelectric potential of roots. *Agrokhimiya*, **3**, 10–15.

Kaiser, W. M. and Huber, S. C. (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase : mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, **52**(363), 1981–1989.

Kaiser, W. M., Weiner, H., and Huber, S. C. (1999). Nitrate reductase in higher plants : A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiologia Plantarum*, **105**(2), 384–389.

Kaiser, W. M., Kandlbinder, A., Stoimenova, M., and Glaab, J. (2000). Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitarte reductase activity in leaf extracts : What limits nitrate reduction in situ ? *Planta*, **210**(5), 801–807.

Keltjens, W. G. and Nijenstein, J. H. (1987). Diurnal variations in uptake, transport and assimilation of NO_3^- and efflux of OH^- in maize plants. *Journal of plant nutrition*, **10**(8), 887–900.

Kirkby, E. A. and Knight, A. H. (1977). Influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation, and cation-anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology*, **60**(3), 349–353.

Kirkby, E. A. and Mengel, K. (1967). Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea or ammonium nutrition. *Plant Physiology*, **42**, 6–14.

Kroon, H. d., Zalm, E. v. d., Rheenen, J. W. A. v., Dijk, A. v., and Kreulen, R. (1998). The interaction between water and nitrogen translocation in a rhizomatous sedge (*Carex flacca*). *Oecologia*, **116**(1-2), 38–49.

Lambers, H., Szaniawski, R. K., and de Visser, R. (1983). Respiration for growth, maintenance and ion uptake. an evaluation of concepts, methods, values and their significance. *Physiologia Plantarum*, **58**, 556–563.

Le Bot, J. and Kirkby, E. A. (1992). Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *Journal of plant nutrition*, **15**(2), 247–264.

Le Bot, J., Adamowicz, S., and Robin, P. (1998). Nutrition minérale chez les herbacées un point de vue sur les modèles.

Lea, U. S., Leydecker, M.-T., Quilleré, I., Meyer, C., and Lillo, C. (2006). Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence]. *Plant Physiology*, **140**, 1085–1094.

Lejay, L., Tillard, P., Lepetit, M., Olive, F. D., Filleur, S., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (1999). Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant Journal*, **18**(5), 509–519.

Lexa, M. and Cheeseman, J. M. (1997). Growth and nitrogen relations in reciprocal grafts of wild-type and nitrate reductase-deficient mutants of pea (*Pisum sativum* L var. Juneau). *Journal of Experimental Botany*, **48**(311), 1241–1250.

Lillo, C., Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., and Oltedal, S. (2004). Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany*, **55**(401), 1275–1282.

Lim, J. T., Wilkerson, G. G., D., R. J. C., and Gold, H. J. (1990). A dynamic growth model of vegetative soya bean plants : Model structure and behaviour under varying root temperature and nitrogen concentration. *Journal of Experimental Botany*, **41**(223), 229–241.

Lorenz, H. (1976). Nitrate, ammonium and amino acids in the bleeding sap of tomato plants in relation to form and concentration of nitrogen in the medium. *Plant and Soil*, **45**, 169–175.

Macduff, J. H. and Bakken, A. K. (2003). Diurnal variation in uptake and xylem contents of inorganic and assimilated N under continuous and interrupted N supply to Phleum pratense and Festuca pratensis. *Journal of Experimental Botany*, **54**(381), 431–444.

Macduff, J. H., Bakken, A. K., and Dhanoa, M. S. (1997). An analysis of the physiological basis of commonality between diurnal patterns of NH_4^+,NO_3^- and K^+ uptake by *Phleum pratense* and *Festuca pratensis*. *Journal of Experimental Botany*, **48**(314), 1691–1701.

MacKintosh, C. and Meek, S. E. M. (2001). Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**(2), 205–214.

Mackown, C. T. (1987). Nitrate uptake and assimilation following nitrate deprivation. *Journal of Experimental Botany*, **38**(192), 1079–1090.

Malone, M. and Herron, M.and Morales, M.-A. (2002). Continuous measurement of macronutrient ions in the transpiration stream of intact plants using the meadow spittlebug coupled with ion chromatography. *Plant Physiology*, **130**(3), 1436–1442.

Masclaux-Daubresse, C., Valdier, M. H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M., and Hirel, B. (2002). Diurnal changes en the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environement*, **25**(11), 1451–1462.

Matsubara, S., Hurry, V., Druart, N., Benedict, C., Janzik, I., Chavarria-Krauser, A., Walter, A., and Schurr, U. (2006). Nocturnal changes in leaf growth of populus deltoides are controlled by cytoplasmic growth. *Planta*, **223**(6), 1315–1328.

Matt, P., Schurr, U., Klein, D., Krapp, A., and Stitt, M. (1998). Growth of tobacco in short-day conditions leads to high starch, low sugars, altered diurnal changes in the Nia transcript and low nitrate reductase activity, and inhibition of amino acid synthesis. *Planta*, **207**(1), 27–41.

Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., and Stitt, M. (2001a). Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment*, **24**(11), 1119–1137.

Matt, P., Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Krapp, A., and Stitt, M. (2001b). The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco : a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the fist part of the light period. *Plant, Cell and Environement*, **24**, 177–190.

Maynard, D. N., Barker, A. V., Monotti, P. L., and Peck, N. H. (1976). Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, **28**, 71–118.

McClung, C. (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, **18**(4), 792–803.

McCree, K. J. and Silsbury, J. H. (1978). Growth and maintenance requirements of subterranean clover. *Crop Science*, **18**, 13–18.

Mengel, K. and Kirkby, E. A. (1987). *Principles of plant nutrition*. Kluwer Academic Publishers, Bern, Switzerland, 4th edition.

Miller, A. J. and Smith, S. J. (1996). Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany*, **47**, 843–854.

Müller, C., Scheible, W. R., Stitt, M., and Krapp, A. (2001). Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcipt level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environement*, **24**(2), 191–203.

Morcuende, R., Krapp, A., Hurry, V., and Stitt, M. (1998). Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of alpha-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta*, **206**(3), 394–409.

Morot-Gaudry, j.-F. (1997). Systèmes de transport et prélèvements du nitrate. In *Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique et moléculaire*. INRA Editor, Paris.

Murei, I. (1976). Expenditures for respiration during the period of the vegetative phase of growth in tomato. *Soviet Plant Physiology*, **23**, 810–815.

Novak, V. and Vidovic, J. (2003). Transpiration and nutrient uptake dynamics in maize (*Zea mays* L.). *Ecological Modelling*, **166**(1-2), 99–107.

Oaks, A., Poulle, M., Goodfellow, V. J., Cass, L. A., and Deising, H. (1988). The role of nitrate and ammonium ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiology*, **88**, 1067–1072.

Oscarson, P. and Larsson, C.-M. (1986). Relations between uptake and utilization of no-3 in pisum growing exponentially under nitrogen limitation. *Physiologia Plantarum*, **67**(1), 109–117.

Ostrem, J. A. and Collins, G. B. (1983). Genetic variation for nitrate concentration in *Nicotiana tabacum* L. *The Journal of Heredity*, **74**(6), 431–434.

Ourry, A., Macduff, J. H., Prudhomme, M. P., and Boucaud, J. (1996). Diurnal variation in the simultaneous uptake and « sink » allocation of NH_4^+ and NO_3^- by Lolium perenne in fmowing solution culture. *Journal of Experimental Botany*, **47**(305), 1853–1863.

Pardossi, A., Falossi, F., Malorgio, F., Incrocci, L., and Bellocchi, G. (2004). Empirical models of macronutrient uptake in melon plants grown in recirculating nutrient solution culture. *Journal of plant nutrition*, **27**(7), 1261–1280.

Passama, L., Gojon, A., Robin, P., and Salsac, L. (1987). In situ nitrate reductase activity as an indicator of nitrate availability. *Plant and Soil*, **102**(1), 145–148.

Paul, M. J. and 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**(1), 110–116.

Pearson, C. J., Volk, R. J., and Jackson, W. A. (1981). Daily changes in nitrate influx, efflux and metabolism in maize and pearl millet. *Planta*, **152**(4), 319–324.

Pedersen, O. and Sand-Jensen, K. (1997). Transpiration does not control growth and nutrient supply in the amphibious plant *Mentha aquatica*. *Plant, Cell and Environment*, **20**(1), 117–123.

Penning De Vries, F., Brunsting, A., and Van Laar, H. (1974). Products, requirements and efficiency of biosynthesis : A quantitative approach. *Journal of Theoretical Biology*, **45**(2), 339–377.

Peuke, A. D. and Jeschke, W. D. (1993). The uptake and flow of C, N and lons between roots and shoots in *Ricinus communis* L. *Journal of Experimental Botany*, **44**(7), 1167–1176.

Peuke, A. D. and Jeschke, W. D. (1998). The effects of light on induction, time courses, and kinetic patterns of net nitrate uptake in barley. *Plant, Cell and Environment*, **21**(8), 765–774.

Peuke, A. D., Rokitta, M., Zimmermann, U., Schreiber, L., and Haase, A. (2001). Simultaneous measurement of water flow velocity and solute transport in xylem and phloem of adult plants of ricinus communis over a daily time course by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Plant, Cell and Environement*, **24**(5), 491–503.

Reed, A. J., Canvin, D. T., Sherrard, J. H., and Hageman, R. H. (1983). Assimilation of ^{15}N nitrate and ^{15}N nitrite in leaves of five plant species under light and dark conditions. *Plant Physiology*, **71**, 291–294.

Reynolds, J. F. and Chen, J. (1996). Modelling whole-plant allocation in relation to carbon and nitrogen supply : Coordination versus optimization : Opinion. *Plant and Soil*, **185**(1), 65–74.

Robin, P., Conejero, G., Passama, L., and Salsac, L. (1983). Evaluation de la fraction métabolisable du nitrate par la mesure in situ de sa réduction. *Physiologie Végetale*, **21**(1), 115–122.

Robinson, J. M. (1988). Does O_2 photoreduction occur within chloroplasts in vivo ? *Physiologia Plantarum*, **72**(3), 666–680.

Rufty, J. T. W., Israel, W., and Volk, R. J. (1984). Assimilation of $^{15}NO_3^-$ taken up by plants in the light and in the dark. *Plant Physiology*, **76**, 769–775.

Rufty, J. T. W., Huber, S. C., and Volk, R. J. (1988). Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiology*, **88**(3), 725–730.

Ruget, F. (1981). Respiration de croissance et respiration d'entretien : méthodes de mesure, comparaison des résultats. *Agronomie*, **1**(7), 601–610.

Scaife, A. (1989). A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant and Soil*, **114**(1), 139–141.

Scheible, W. R., Lauerer, M., Schulze, E. D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997a). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *The Plant Journal*, **11**(4), 671–691.

Scheible, W. R., González-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., and Stitt, M. (1997b). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant cell*, **9**(5), 783–798.

Scheible, W. R., González-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schulze, E. D., and Stitt, M. (1997c). Tobacco mutants with a decreased number of functional nia genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta*, **203**(3), 304–319.

Schneidereit, J., Häusler, R. E., Fiene, G., Kaiser, W. M., and Weber, A. P. M. (2006). Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. *The Plant journal*, **45**(2), 206–224.

Shaner, D. L. and Boyer, J. S. (1976). Nitrate reductase activity in Maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology*, **58**(4), 499–504.

Siddiqi, M. Y. and Glass, D. M. (2002). An evaluation of the evidence for, and implications of, cytoplasmic nitarte homeostasis. *Plant, Cell and Environement*, **25**, 1211–1217.

Sivasankar, S., Rothstein, S., and Oaks, A. (1997). Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. *Plant Physiology*, **114**(2), 583–589.

Soussana, J.-F., Gojon, A., Passama, L., Wakrim, R., and Robin, P. (1989). Critical evaluation of the in situ nitrate reductase assay. *Plant and Soil*, **120**(2), 243–251.

Stitt, M. and Schulze, D. (1994). Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth ? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant, Cell and Environment*, **17**(5), 465–487.

Stout, M. J., Brovont, R. A., and Duffey, S. S. (1998). Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Chemical Ecology*, **24**(6), 945–963.

Tanner, W. and Beevers, H. (1990). Does transpiration have an essential function in long-distance ion transport in plants ? *Plant, Cell and Environment*, **13**(8), 745–750.

Thornley, J. and Johnson, I. R. (1976). *Transport processes*. Claredon press Oxford, Oxford, New York.

Thornley, J. H. M. (1972). A balanced quantitative model for root :shoot ratios in vegetative plants. *Annals of Botany*, **36**(145), 431–441.

Thornley, J. H. M. (1976). *Mathematical models in plant physiology*. Academic Press (Inc.) London, Ltd. ; London ; UK, UK.

Thornley, J. H. M. (1977). Growth, maintenance and respiration : a re-interpretation. *Annals of Botany*, **41**(6), 1191–1203.

Thornton, B. and Macduff, J. H. (2002). Short-term changes in xylem N compounds in *Lolium perenne* following defoliation. *Annals of Botany*, **89**(6), 715–722.

Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell and Environment*, **23**(10), 1005–1024.

Torre, S. and Moe, R. (1998). Temperature, DIF and photoperiod effects on the rhythm and rate of stem elongation in *Campanula isophylla* Moretti. *Scientia Horticulturae*, **72**(2), 123–133.

Touraine, B., Grignon, N., and Grignon, C. (1988). Charge balance in NO_3^--fed soybean. Estimation of K+ and carboxylate recirculation. *Plant Physiology*, **88**(3), 605–612.

Triboi-Blondel, A. M. (1979). Dynamique comparée de l'absorption des nitrates et de l'eau par des plantes de blé. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences D*, **288**, 1545–1548.

Urbanczyk-Wochniak, E. and Fernie, A. R. (2005). Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany*, **56**(410), 309–321.

van der Leij, M., Smith, S. J., and Miller, A. J. (1998). Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. *Planta*, **205**(1), 64–72.

Vercambre, G. and Adamowicz, S. (1996). Dosage de l'ion nitrate en solution nutritive et en présence de polyéthylène glycol par spectrométrie UV. *Agronomie*, **16**, 73–87.

Walter, A., Spies, H., Terjung, S., Küsters, R., KirchgBner, N., and Schurr, U. (2002). Spatio-temporal dynamics of expansion growth in roots : automatic quantification of diurnal course and temperature response by digital image sequence processing. *Journal of Experimental Botany*, **53**(369), 689–698.

Walter, A., Christ, M. M., Barron-Gafford, G. A., Grieve, K. A., Murthy, R., and Rascher, U. (2005). The effect of elevated CO_2 on diel leaf growth cycle, leaf carbohydrate conetnt and canopy growth performance of populus deltoides. *Global Change Biology*, **11**, 1207–1219.

Webb, A. (2003). The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytologist*, **160**(2), 281–303.

Wiese, A., Christ, M. M., Virnich, O., Schurr, U., and Walter, A. (2007). Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis taliana* and evidence for sugar contraol of the diel leaf growt cycle. *New phytologist*, **174**(4), 752–761.

Wild, A., Jones, L. H. P., and Macduff, J. H. (1987). Uptake of mineral nutrients and crop growth : the use of flowing nutrient solutions. *Advances in Agronomy*, **41**, 171–219.

Zerihun, A., McKenzie, B. A., and Morton, J. D. (1998). Photosynthate costs associated with the utilization of different nitrogen-forms : influence on the carbon balance of plants and shoot-root biomass partitioning. *New Phytologist*, **138**(1), 1–11.

Zongjian, Y. and Midmore, D. J. (2005). A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. *Annals of Botany*, **96**(16), 1019–1026.

Summary

This work has two objectives : (1) the experimental study of plant nitrate assimilation and growth in the diel cycle under contrasted conditions of nitrate nutrition ranging from deficiency to plethora ; (2) the development of a model capable to simulate these functions.

The study focused on young tomato plants grown hydroponically in a growth chamber using a recirculating nutrient system capable to control precisely the nitrate concentration in solution and to measure continuously plant nitrate uptake rates. The rate of plant nitrate assimilation was calculated from the time based differences between the amounts of nitrate taken-up and stored as free ions in the tissues of plants harvested periodically over the day and night cycle. The most significant results are : a marked diel periodicity of nitrate assimilation independent of the nutritional diet ; a uniform rate of nitrate uptake under conditions of low N-nutrition contrasting with a marked oscillatory pattern under a plethora of NO_3^- ; a nearly threefold decrease in NO3 assimilation rate for NO_3^- sufficient plants suddenly deprived of nitrogen ; a slighter effect of the changes of nutritional regimes on root compared to shoot growth.

The results have been interpreted considering various stores (1) of nitrate, which uncouples assimilation from uptake, (2) of free amino acids, which detaches growth from NO3 assimilation. It is proposed a model in which growth is fuelled by the flux of free amino acids produced by the assimilation of endogenous NO_3^-. Among the workable plant representations, considering three organs, namely the leaf blades, the stems and the roots, produced the best simulations both for growth and NO_3^- assimilation patterns. In this model, the stems are the central store of nitrate. The simulations reproduce several plant characteristics : diel periodicity in the rate of NO_3^- assimilation ; major role of leaves under ample nutrition ; magnified role of roots under low N nutrition ; uniform growth rate under all circumstances.

This modelling stage has highlighted a lack of knowledge in two important domains : the formalism of NO_3^- transport between organs and the CxN interaction in particular during the phase of resource utilization for growth rather than during their acquisition process.

Keywords : Model, growth, assimilation, resources, endogenous nitrate, carbon, carbohydrates, free amino acids, nitrogen nutrition.

Resumé

Ce travail a deux objectifs : l'étude expérimentale de l'assimilation du nitrate et de la croissance au cours du cycle nycthéméral, et sous divers régimes de nutrition azotée allant de la carence à la pléthore ; l'élaboration de modèles permettant de les simuler.

L'étude a porté sur de jeunes plants de tomate cultivés en phytotron sur système hydroponique à recirculation continue, afin de pouvoir contrôler finement la nutrition azotée et de mesurer en permanence l'absorption du nitrate. L'assimilation a été mesurée par bilan en fonction de l'absorption, et des variations de contenu en cet ion dans des échantillons prélevés au cours de nycthémères. Les résultats les plus marquants sont : les oscillations nycthémérales accentuées de l'assimilation du nitrate, quelque soit le régime nutritif ; la monotonie de la vitesse d'absorption en régime de nutrition limitante, opposée à de fortes oscillations en régime pléthorique ; la diminution prononcée, d'environ 3 fois, de la vitesse d'assimilation chez des plants riches en nitrate, brutalement exposés à une solution carencée ; une croissance racinaire moins affectée par les changements de régime nutritif que la croissance aérienne.

Ces résultats ont été interprétés en termes de réservoirs 1) de nitrate, découplant l'assimilation de l'absorption, 2) d'acides aminés libres, découplant la croissance de l'assimilation. Un modèle est proposé, où la croissance se nourrit des acides aminés libres produits par l'assimilation du nitrate des tissus. Parmi différentes représentations possibles, c'est le découpage de la plante en 3 classes d'organes (limbes, tiges, racines) qui a donné les simulations les plus réalistes tant en termes de croissance que d'assimilation du nitrate. La tige y tient surtout le rôle de réservoir principal de cet ion. Les simulations reproduisent les caractéristiques suivantes : oscillations nycthémérales de la vitesse d'assimilation ; dominance des limbes en nutrition pléthorique ; importance accentuée des racines en nutrition limitante ; monotonie de la croissance nycthémérale en toutes circonstances.

L'étape de modélisation a mis en avant la nécessité d'améliorer les connaissances surtout dans deux domaines : la formalisation des transports du nitrate entre organes ; l'interaction C x N au niveau de leur utilisation pour la croissance, plus qu'au niveau de leur acquisition.

Mots clés : Modèle croissance, modèle réduction, ressources, nitrate endogène, carbone endogène, acides aminées libres nutrition azotée.