

Université de Bourgogne

INRA – Département Environnement et Agronomie – UMR 1347 Agroécologie
Pôle GEAPSI – Equipe Ecophysiologie

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

En Sciences de la Vie

Spécialité : Ecophysiologie Végétale

Par

Alexandre-Brice CAZENAVE

**Réponse adaptative à court terme de la fixation
symbiotique du pois protéagineux à une ablation d'une
partie des racines nodulées, en lien avec la disponibilité en
assimilats carbonés.**

Directeur de Thèse : Christophe SALON

Encadrante : Anne-Sophie VOISIN

Soutenue le 17 Mars 2014, devant le jury composé de :

**D. WIPF
J.-C. AVICE
F. GASTAL
V. BIARNES
C. ROBIN
C. SALON
A.-S. VOISIN**

**Professeur, Université de Bourgogne
Professeur UCBN - Caen
Directeur de Recherche - Lusignan
Ingénieur UNIP - Paris
Directeur de Recherche - Nancy
Directeur de Recherche INRA - Dijon
Chargée de Recherche INRA - Dijon**

**Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse
Co-encadrante**

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Christophe SALON pour l'accueil au sein de l'équipe Ecophysiologie et pour son accompagnement au cours de ces trois années. Je le remercie pour sa bonne humeur, ses blagues sur mes origines mais surtout pour son immense savoir sur la physiologie des plantes et le marquage isotopique. Je le remercie enfin pour sa grande accessibilité et le temps accordé aux corrections de mon manuscrit malgré un planning très chargé en temps que responsable de notre pôle GEAPSI.

Je tiens également à remercier chaleureusement mon encadrante, Anne-Sophie VOISIN, pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé au cours des trois années de thèse. Je la remercie également pour toutes ses explications sur le fonctionnement du pois protéagineux, pour ses idées et réflexions sur les expérimentations, pour les longs moments passés à m'aider à analyser les données afin de pouvoir raconter notre histoire.

Je remercie les membres de mon jury de thèse : Jean-Christophe AVICE, Véronique BIARNES, François GASTAL, Christophe ROBIN et Daniel WIPF pour avoir accepté de relire et examiner mon manuscrit de thèse dans son ensemble, et tout particulièrement Jean-Christophe AVICE pour avoir attisé ma curiosité sur le fonctionnement des plantes au travers des cours de Physiologie Végétale à l'Université de Caen Basse-Normandie.

Je remercie également les membres de mon Comité de thèse : Gérard DUC, Alain GOJON, Giselle LAGUERRE, Bénédicte QUILOT-TURION, Lois PAGES et Céline RICHARD-MOLARD pour leur écoute attentive de mes diaporamas lors de nos rendez-vous, pour le temps qu'ils m'ont accordé en voyageant aux quatre coins de la France, et pour leurs nombreux conseils et réflexions sur l'avancée de ma thèse et l'analyse des résultats. Une pensée particulière pour les proches de Giselle LAGUERRE qui nous a quitté au cours de la thèse.

Je tiens à remercier l'INRA, le Conseil Général de Bourgogne, l'UNIP et l'uB-Filiale qui ont participé au financement de ma thèse. Sans eux, toutes ces expérimentations coûteuses, tout ce temps passé à ma thèse n'aurait pas été possible. Je n'aurai pas non plus eu le plaisir de présenter mes résultats lors du congrès qui s'est déroulé sur la côte magnifique de Porto Héli en Grèce.

Je remercie aussi Richard THOMPSON de m'avoir accueilli au sein de l'UMR LEG et Philippe LEMANCEAU pour l'accueil au sein de l'UMR Agroécologie qui l'a remplacé.

Richard ainsi que Sergio OCHATT ont pris un temps précieux pour relire mon manuscrit d'article, et leurs conseils pour en améliorer le contenu et l'anglais m'ont été d'une aide certaine.

Toute ma reconnaissance va à l'équipe Ecophysiologie en son intégralité : Patrick MATHEY, Vincent DUREY, Christian JEUDY, Anne-Lise SANTONI, Sylvie GIRODET, Marion PRUDENT et Annabelle LARMURE. Que dire de cette équipe ? Il y règne une

atmosphère chaleureuse, où il fait bon vivre. La solidarité, l'entraide et la disponibilité sont les maîtres mots de cette équipe. En périodes d'expérimentations où « points chauds » comme je les appelais, où le travail est chargé, tout le monde est disponible pour aider ... moyennant sa part obligatoire en croissants et pains au chocolat. Ensemble on a pesé, dénudé, compté, scanné, broyé, fait des milliers de boulettes de spectromètres,... Un grand merci à Christian d'être venu plusieurs fois le week-end spécialement pour mes marquages, et à Vincent venu me soutenir à 3h du matin pour faire des analyses de stress hydriques. Merci pour votre ingéniosité à tous digne parfois de MacGyver permettant aux expérimentations de fonctionner. Je remercie également Stephen MARLE et Charlotte OLLAGNIER qui ont été engagés et réengagés plusieurs fois pour aider sur nos fameux « points chauds » de manip sans jamais rechigner.

Je remercie vivement les collègues qui ont partagé brièvement ou sur la durée mon bureau. Merci ainsi à Anouk ZANCARINI en thèse avant moi pour son accueil dans ce qui fut son bureau avant la passation après sa soutenance. Anouk, malgré ses « piailllements » lors de ses moments de réflexion ou « ses cabrioles debout sur le bureau », a toujours été d'un très grand conseil avant même mon arrivée (par email), et ainsi qu'après son départ. Merci également à Arnaud FOURREY qui a pris sa suite et qui a pu m'aider tant en statistiques, qu'en informatique lors des caprices des ordinateurs. Merci à Mireille TOGNITE, voisine de bureau très discrète, et Antoine MIOSSEC, mon super stagiaire (un peu moins discret), qui je l'espère, ne touche plus à une imprimante (la nôtre continue de faire des traces un an et demi après son passage).

Je remercie également les collègues du bâtiment Mendel qui m'ont soutenu et encouragé pendant ces trois années. J'ai apprécié toutes nos conversations tant à propos de la thèse que de d'autres sujets. Leurs innombrables conseils sur le présent et le futur m'ont beaucoup apporté. Je remercie Dominique AMIOT, Dominique CLERC, Alexandre THOLE, Francine VIEREN et Corinne PERIER pour leur super travail au sein du secrétariat, nous permettant d'avoir rapidement nos commandes, nos ordres de mission, et nos réponses à toutes les petites questions du quotidien. Une pensée spéciale pour Corinne, avec qui je me suis trouvé un lien de cousinage par hasard et qui a farouchement défendu les erreurs de dossiers en début de thèse. Je remercie également Dominique MILLOT sans qui je n'aurai jamais réussi à obtenir un certain nombre d'articles. Un petit mot pour Anthony KLEIN et ses « ça avance la thèse » hebdomadaire et moqueurs... Et enfin à Mélanie NOGUERO pour nos discussions, mais également à toutes celles et tous ceux qui se reconnaîtront.

Je remercie grandement Céline BERNARD et tous les membres de l'équipe des Serres de l'INRA (Franck ZENK, Nouredine EL-MJIYAD, Arnaud BARTET, Karine PALAVIOUX, Jean-Luc ROUSSELET et Daniel MAITRE) d'avoir veillé sur mes expérimentations qui se sont déroulées en chambre de culture, de marquage ou en serre. Merci d'avoir préparé des centaines de litres de solution nutritive, d'avoir combattu avec vigueur les différents pathogènes qui se sont glissés sur les plantes, et d'être passé les surveiller plusieurs fois par jour, en semaine ou le week-end.

Merci également aux différentes personnes du centre INRA qui m'ont aussi apporté leur aide, d'une manière ou d'une autre, en répondant à mes questions, en nous prêtant du matériel (anciennement UMR BGA), des souches bactériennes (Cécile REVELLIN). Je remercie les thésards qui m'ont conseillé sur la création de mon premier poster et sur les petits conseils et discussions que l'on a pu avoir entre nous régulièrement.

Pour arriver jusqu'à la thèse, il a fallu faire un premier pas, puis encore un autre, et ainsi de suite. Je remercie alors M. VERGNE qui m'a fait aimer la biologie il y a bien des années au lycée de Honfleur. Je remercie Jean-Bernard CLIQUET qui m'a permis de faire mon premier stage en laboratoire au sein de l'INRA de Caen, et sans qui je n'aurais pas eu l'opportunité de trouver mes autres stages. Ainsi, grâce à lui, je peux également remercier Phil MURRAY, Chris HODGSON et Emma PILGRIM ainsi que tous les membres du North Wyke Research Center au Royaume-Uni. J'ai eu le plaisir de réaliser mes stages de Master 1 et Master 2 dans ce super laboratoire, ce qui m'a convaincu de commencer une thèse et d'en arriver là aujourd'hui.

Merci aussi aux personnes du domaine d'Epoisses, ainsi qu'aux personnes du bâtiment Mendel et de mon équipe pour le coup de main lors de ma multiplication de graines. Nos expérimentations seraient impossibles sans nos matières premières : les plantes !

J'en oublie sans doute, toutes mes excuses. Sachez que vous avez tout de même ma plus grande gratitude, vous tous qui avez contribué à ce rêve qu'est ma thèse.

Une pensée également pour tous mes amis que je n'ai pas vu autant que je l'aurais souhaité, mais qui me soutenait de partout en France et de l'étranger. Je remercie les élèves de mon association Country's Angels 21 qui ont prit régulièrement des nouvelles de l'avancée de mes travaux et m'ont pardonné les moments où j'ai privilégié la thèse.

Enfin, je remercie ma famille. A ma maman qui me soutient quoiqu'il advienne depuis des années dans mes études, et me pousse à continuer malgré toutes les étapes que nous avons du franchir toutes ces années. J'ai une pensée pour les êtres chers que nous avons perdu et qui n'auront pas vu ce projet aboutir. A la famille que je retrouve ces dernières années en métropole ou en Corse et qui me permettent de m'évader du labo. A ma belle famille qui me soutient également autant qu'elle le peut.

Mon dernier mot sera pour ma douce Angélique. Très compréhensive, tu as toujours été là pour moi, pour m'écouter parler de mon petit pois et de ses problèmes de stress. Tu as été ma force ces dernières années. Merci ! Je t'aime !

Et enfin je vous l'avais promis, le voici :

814 943

C'est le nombre de nodosités retirées à la pince et comptées une par une
au cours de cette thèse.

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	<u>1</u>
------------------------------------	----------

<u>Synthèse bibliographique</u>	<u>3</u>
---------------------------------------	----------

1. Structures liées au prélèvement d’N	4
1.1. Racines	4
1.1.1. Mise en place des racines au cours du temps	4
1.1.2. Modulation de la morphogénèse racinaire et de son activité.....	4
1.2. Nodosités.....	6
1.2.1. Symbiose avec la bactérie fixatrice <i>Rhizobium</i> et mise en place des nodosités	7
1.2.2. Autorégulation du nombre de nodosités (AON).....	9
1.3. Interaction entre la mise en place et la formation des nodosités et l’environnement (biotique et abiotique).....	14
1.3.1. Facteurs biotiques agissant sur les nodosités.....	14
1.3.2. Facteurs abiotiques agissant sur les nodosités	15
1.4. Modulation à l’échelle de la plante : relation de compétition entre les organes de la plante et conséquence sur la mise en place des racines et des nodosités	16
1.4.1. Coûts en assimilats carbonés liés à la nodulation.....	16
1.4.2. Interaction entre le métabolisme carboné et la mise en place des nodosités ..	17
2. Fonctions liées au prélèvement d’N : les voies d’acquisition d’N et leur régulation	19
2.1. Assimilation de l’azote minéral	19
2.1.1. Assimilation des nitrates.....	19
2.1.2. Régulation de l’assimilation des nitrates	20
2.2. Fixation de l’azote atmosphérique	21
2.2.1. Processus et fonction de fixation par l’intermédiaire des nodosités.....	21
2.2.2. Régulation de l’activité nitrogénase.....	22
2.2.3. Impact des facteurs environnementaux sur la fixation	22
2.2.4. Importance de la souche bactérienne utilisée dans la symbiose.....	24
2.2.5. Complémentarité des 2 voies dans l’acquisition de l’azote.....	25

3. Interactions entre les composantes structurales et les fonctionnelles responsables du prélèvement d'azote en condition de modification de l'environnement C ou N	28
3.1. Réactivité des 2 voies d'acquisition d'N en réponse à une modification de l'environnement N	28
3.1.1. Voie de l'absorption d'azote minéral	28
3.1.2. Voie de la fixation atmosphérique.....	29
3.2. Modification de l'environnement C.....	30
3.2.1. Effet d'un ajout d'assimilats carbonés sur l'acquisition d'N et la croissance des plantes.....	30
3.2.2. Effet d'une augmentation de la teneur en CO ₂ sur la croissance et l'acquisition d'N chez les plantes et chez les légumineuses	31
4. Les mutants hypernodulants	33
4.1. Caractéristiques.....	33
4.2. Réactivité à un stress.....	34
<u>Résultats</u>.....	<u>35</u>
<u>1. Problématique</u>.....	<u>35</u>
<u>2. Objectifs et démarche</u>.....	<u>38</u>
2.1 Traitements expérimentaux	38
2.1.1 Ablation des racines nodulées	38
2.1.2 Modification de la teneur en CO ₂	38
2.2 Démarche d'analyse des réponses adaptatives	39
<u>3. Matériel et Méthodes</u>.....	<u>43</u>
3.1 Matériel biologique	43
3.2 Conditions de croissance.....	43
3.2.1 Contraintes expérimentales	43
3.2.2 Déroulement des opérations de la germination aux traitements expérimentaux	43
3.3 Traitements expérimentaux	44
3.4 Marquage isotopique.....	44
3.5 Mesures	45
3.6 Calculs et statistiques	45

4. Réponse adaptative, à court terme et à teneur ambiante en CO₂, du pois protéagineux à une ablation d'une partie des racines nodulées48

5. Caractérisation de l'état initial des différents géotypes avant l'application des traitements et caractérisation des traitements ablation et CO₂ dans les 3 expériences.....66

- 5.1 Caractérisation de l'état initial des géotypes avant l'application des traitements dans les 3 expériences 66
- 5.2 Caractérisation du traitement ablation dans les 3 expériences..... 68
- 5.3 Caractérisation du traitement CO₂ dans les 3 expériences 68

6. Réponse adaptative des 4 géotypes de pois protéagineux à une modification de la teneur atmosphérique en CO₂.....70

- 6.1 Impact sur la nutrition Carbonée 71
 - 6.1.1 Impact sur l'activité photosynthétique et sur l'assimilation de C dans la biomasse..... 71
 - 6.1.2 Impact sur la répartition du C entre les organes et sur leurs forces de puits 73
 - 6.1.2.1 Répartition du C entre les parties aériennes et souterraines 73
 - 6.1.2.2 Répartition du C entre les nodosités et les autres organes souterrains 74
 - 6.1.2.3 Force de puits des différents compartiments 74
 - 6.1.2.4 Synthèse..... 75
- 6.2 Impact sur la Nutrition Azotée, en relation avec la croissance 76
 - 6.2.1 Impact sur la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante, en relation avec la croissance totale..... 77
 - 6.2.2 Impact sur l'activité spécifique de fixation symbiotique des nodosités, en relation avec la croissance des nodosités 79
 - 6.2.3 Synthèse 80
- 6.3 Synthèse des stratégies adaptatives des géotypes à des modifications de la teneur en CO₂..... 80
- 6.4 Conclusion..... 85

7. Réponse adaptative des 4 géotypes de pois protéagineux à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes. 87

7.1	Problématique et hypothèses.....	87
7.2	Impact sur la nutrition N en relation avec la croissance	89
7.2.1	Impact sur l'assimilation de C dans la biomasse.....	89
7.2.2	Impact sur la fixation symbiotique.....	90
7.2.3	Impact sur le statut N	91
7.2.4	Synthèse sur l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la nutrition azotée en relation avec la croissance.....	93
7.2.5	Discussion sur l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la nutrition N en relation avec la croissance.....	94
7.3	Impact sur la croissance	97
7.3.1	Impact sur la croissance des nodosités et des racines	97
7.3.2	Impact sur la croissance des parties aériennes	98
7.4	Impact sur la répartition du C entre les compartiments.....	99
7.4.1	Allocation du C entre parties aériennes et parties racinaires.....	99
7.4.2	Allocation du C entre racines et nodosités au sein des parties racinaires	100
7.4.3	Synthèse sur la croissance et l'allocation du C entre compartiments	100
7.5	Synthèse globale sur les réponses de la fixation symbiotique et de la croissance à l'ablation de la moitié des racines nodulées.....	102
7.5.1	Impact de la teneur en CO ₂ sur la réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées	102
7.5.2	Stratégies adaptatives des géotypes à l'ablation de la moitié des racines nodulées	103

Conclusion générale et perspectives 107

1.	Conclusion générale	107
2.	Perspectives de recherche.....	113
2.1.	Proposition de résolution des problèmes méthodologiques.....	113
2.1.1.	Effet multi-stress de l'ablation	113
2.1.2.	Caractérisation des plantes ayant subi l'ablation avant application des traitements	113
2.2.	Perspective de recherche à court et long terme.....	114

2.2.1. Analyse comparative de la réponse adaptative selon le mode de perturbation de la fixation	114
2.2.2. Analyse comparative de la réponse adaptative à l'ablation lors de l'utilisation de différentes souches bactériennes	114
2.2.3. Analyse de la réponse adaptative à une perturbation de la fixation symbiotique à long terme	115
2.2.4. Modélisation de la réponse adaptative à une perturbation de la fixation symbiotique	116
2.2.5. Etude moléculaire des gènes et des mécanismes affectés lors de l'ablation.....	116

Références bibliographiques.....117

Annexes.....130

INTRODUCTION
GENERALE

Introduction générale

Devant l'augmentation importante de la démographie mondiale, des recherches ont été menées au cours de ces dernières décennies afin d'augmenter le rendement des grandes cultures. Ainsi, des intrants (produits phytosanitaires, engrais, eau) ont été apportés et des variétés plus performantes en termes de rendements et de résistances ou tolérances ont été développées et sélectionnées (Tilman et al. 2002). Ces innovations ont permis de nourrir l'ensemble de la population mais ont cependant induit un coût environnemental important. En effet, la mise en place de ces nouveaux systèmes de cultures a eu un impact négatif sur l'environnement avec un accroissement de la pollution des sols résultant de l'apport important d'intrants de synthèse (nitrate, pesticides) (Tilman et al. 2002). De plus, la synthèse de ces intrants ainsi que leur épandage sur les sols a induit une augmentation de l'émission de gaz à effet de serre, contribuant au réchauffement climatique actuel, ainsi qu'à une consommation importante d'énergie fossile.

Le Grenelle de l'Environnement vise à mettre en place une agriculture durable, et plus respectueuse de l'environnement. C'est pourquoi il est nécessaire de diminuer l'utilisation d'intrants dans les systèmes de cultures, permettant de diminuer les coûts énergétiques des productions agricoles et l'impact de l'agriculture sur l'environnement. C'est dans ce contexte que les acteurs du monde agricole et du monde de la recherche se concertent et travaillent ensemble au développement de l'agroécologie. Cette discipline scientifique permet l'amélioration de la production et des rendements des grandes cultures tout en préservant l'environnement en alliant l'écologie et l'agronomie (Wezel et al. 2009). L'agroécologie vise à valoriser les interactions entre les végétaux et partenaires biotiques tels que par exemple les communautés microbiennes et fongiques de la rhizosphère. L'étude de ces différentes interactions constitue à l'heure actuelle un intérêt majeur pour améliorer le bilan environnemental et énergétique de la production agricole.

Pendant de longues années, les écologistes ont vu les micro-organismes du sol et les plantes comme étant relativement indépendants les uns des autres au sein de la rhizosphère (Bonkowski et al. 2000). Pourtant, cette zone du sol, se trouvant directement sous l'influence des racines, constitue une zone extrêmement dynamique permettant des interactions positives ou négatives entre les racines (Bais et al. 2006), les micro-organismes et les organismes invertébrés du sol (Nguyen, 2002).

Les interactions plantes-communautés microbiennes sont bidirectionnelles. D'une part la plante stimule la diversité et l'activité microbienne, via la sécrétion par ses racines dans leur environnement proche, de composés organiques appelés rhizodépôts (sucres, acides aminés, acides organiques, vitamines, et enzymes). Ces rhizodépôts fournissent une source d'énergie pour la flore microbienne du sol (Baker 1987; Boyetchko 1996). D'autre part, les communautés microbiennes peuvent avoir un impact direct ou indirect sur la croissance racinaire des plantes et *in fine* sur le développement et la croissance des plantes. La microflore du sol intervient dans les cycles d'éléments minéraux tels que l'azote, élément le plus limitant

pour la production végétale. La microflore est ainsi impliquée dans la minéralisation (Fontaine, 2002) de l'azote organique, ainsi que dans le processus de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique. En effet, lors de la symbiose entre les Légumineuses comme le pois (*Pisum sativum* L.) et les bactéries du genre *Rhizobium*, il y a formation d'un organe spécifique, la nodosité, au sein de laquelle le N₂ atmosphérique est fixé (Nap et Bisseling 1990).

Par leur capacité à prélever l'azote atmosphérique qui se trouve en quantité non limitante dans l'atmosphère, les légumineuses apportent une proportion importante de l'azote nécessaire dans les systèmes de culture, tout en induisant une réduction importante de l'utilisation des engrais azotés, permettant ainsi une diminution des coûts énergétiques des productions agricoles (Munier-Jolain et Carrouee 2003; Jensen et Hauggaard-Nielsen 2003; Crozat et Fustec 2006; Nemecek et al. 2008; Jensen et al. 2012) et une amélioration des impacts environnementaux des systèmes de cultures actuels. Les légumineuses produisent aussi des graines riches en protéines pouvant entrer dans l'alimentation animale et humaine (Santalla et al. 2001). Cependant les légumineuses ne sont implantées que dans 5 % des surfaces cultivées en France, contre 20 à 30% en Amérique du Nord et du Sud (Munier-Jolain et al. 2005).

Dans ce contexte, la valorisation des bénéfices que peuvent apporter l'utilisation des légumineuses dans les systèmes de culture est donc un enjeu majeur. Pour ce faire il est crucial de pouvoir améliorer l'état de nos connaissances sur le fonctionnement des légumineuses, notamment sur la manière dont les composantes de leur rendement sont produites et sur l'identification des étapes et processus limitant cette production, en quantité et en qualité.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

En dehors des agrosystèmes où l'ajout d'intrants (engrais azotés, eau...) permet de l'augmenter jusqu'à satisfaction des besoins des plantes, en conditions naturelles la disponibilité en azote est l'un des facteurs les plus limitants pour la croissance des plantes (Davidson et al. 2007), cet élément intervenant dans la biosynthèse des constituants cellulaires et de leur métabolisme. Dans le contexte du changement climatique, des stress abiotiques (sécheresse ou inondations, températures élevées) ou biotiques (présence de ravageurs, maladies) peuvent moduler la performance de la nutrition azotée des plantes et avoir des conséquences délétères sur leur rendement, car ils vont indirectement impacter l'acquisition ou l'utilisation d'azote par la plante. Ainsi, l'acquisition d'N reste fréquemment limitée spatialement ou temporellement, chez la plupart des plantes.

L'un des challenges majeurs de l'agriculture en Europe pour les prochaines années sera de composer d'une part avec la nécessaire réduction/optimisation des apports en engrais (à ressources finies telles que le phosphate) ou bien engendrant des coûts énergétiques importants (telles que l'azote), ceci afin de réduire les impacts environnementaux négatifs de l'agriculture, ceux sur le changement climatique auquel contribue et laquelle est soumise l'agriculture. Cette contrainte sur l'utilisation d'intrants est concomitante d'une nécessaire augmentation de la production agricole afin de nourrir une population humaine toujours croissante tout en préservant la biodiversité. L'une des manières de parvenir à concilier ces objectifs est de sélectionner/identifier des variétés ayant une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote. Les avantages agroécologiques des légumineuses sont ainsi évidents.

Chez les légumineuses comme le pois, l'acquisition de l'azote repose sur deux voies complémentaires pour une alimentation azotée optimale en conditions « potentielles »¹ :

- l'assimilation de l'azote minéral du sol par le système racinaire, voie commune à toutes les plantes,
- une seconde voie, spécifique des Légumineuses, qui permet par symbiose de la plante avec une bactérie du sol, au sein d'organes spécifiques, les nodosités, de fixer l'azote atmosphérique.

Quelle que soit la voie d'acquisition, on peut considérer le flux d'azote entrant dans la plante comme le produit, selon son origine (ie. tellurique ou atmosphérique), de la biomasse de la **structure** effectuant ce prélèvement/cette absorption (ie. les racines et/ou les nodosités) par leur **fonction**, c'est à dire l'activité spécifique de prélèvement (ie. la quantité d'azote absorbée/fixée par unité de biomasse de racine ou de nodosité). Chacune des voies d'acquisition est modulée, dans le développement ou la croissance des structures impliquées ou bien dans leur capacité et leur activité de prélèvement de l'azote par des facteurs endogènes et exogènes.

¹ Cad lorsqu'aucun facteur biotique ou abiotique n'impacte sur le processus

1. Structures liées au prélèvement d’N

L’acquisition d’azote repose sur le développement et la croissance des racines pour l’assimilation de l’N minéral du sol et des nodosités pour la fixation symbiotique du diazote atmosphérique. La formation de ces organes est alors régulée par des mécanismes spécifiques et peut par ailleurs entrer en interaction avec l’environnement.

1.1. Racines

Le pois possède un système racinaire de type pivotant, c’est-à-dire composé d’un pivot (racine principale permettant son ancrage dans le sol) sur lequel se forment des racines latérales primaires et secondaires.

1.1.1. Mise en place des racines au cours du temps

La mise en place des racines suit 3 phases comme le décrivent Mitchell et Russel (1971).

Dans un premier temps, au cours de la période végétative, le pivot est en phase d’élongation rapide. Selon Tricot et al. (1997), la vitesse d’élongation du pivot est maximale pendant la période de germination des graines, puis décroît au moment de l’épuisement des réserves provenant des graines. Enfin, les racines latérales de premier ordre se développent de manière horizontale et superficielle et peuvent atteindre un nombre de 100 racines (Voisin et al. 2002b).

La deuxième phase se déroule au cours de la floraison et de la formation des graines et se traduit par une augmentation rapide de la biomasse des racines. L’augmentation de la biomasse racinaire est linéaire du début du cycle jusqu’à fin floraison (Voisin et al. 2002b) et est principalement due au développement des racines latérales de second ordre (jusqu’à 200 racines) avec une pénétration en profondeur dans le sol. A la fin de la phase de floraison, les racines atteignent une profondeur maximale de l’ordre de 0.90m chez le pois (Vocanson et al. 2006) qui ne variera pratiquement plus, quelle que soit la compaction du sol ou le génotype de pois considéré.

La troisième phase a lieu pendant la phase de remplissage des graines et consiste en un ralentissement de l’accumulation de biomasse avec développement des dernières racines latérales jusqu’à maturité physiologique. Au cours de ce stade, la diminution finale de la biomasse des racines est attribuée à la senescence des tissus (Voisin et al. 2002b), probablement due à une remobilisation de l’N vers les graines en remplissage.

D’après Voisin et al. (2002b), les deux-tiers de la biomasse racinaire se trouvent dans les 20 premiers centimètres de sol quelle que soit la phase du cycle de la plante.

1.1.2. Modulation de la morphogénèse racinaire et de son activité

La modulation de la morphogénèse racinaire s’effectue par un ensemble de facteurs de nature endogène à la plante, ou exogène.

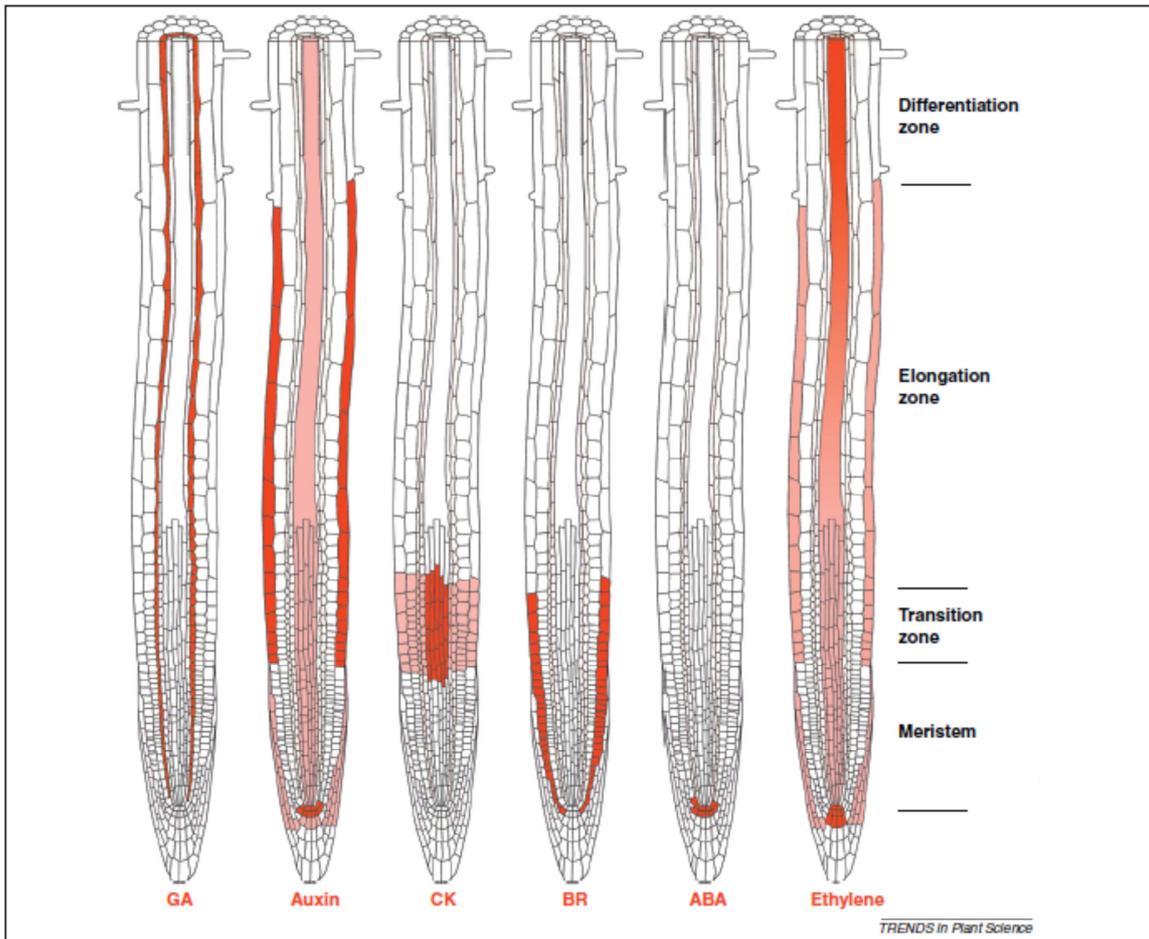


Figure 1. Schematic representation of hormone primary response tissues/regions in the *Arabidopsis* primary root. Red denotes tissues that are direct targets of designated hormone, whereas pink denotes indirect target tissues. From left to right, GA targets the endodermis as the primary response tissue that controls cell elongation and division [3,7]. Auxin targets elongating epidermal cells (red) during the gravitropic response [4] and also regulates cell division in the meristem and stem cell niche [54]. CK promotes vascular differentiation in the transition zone [5] and antagonises the effect of auxin on cell division in the transition zone to control root meristem size [26,55]. BR targets the epidermis [8] in the meristem, whereas ABA acts on QC and stem cells in order to regulate root meristem size [56]. Finally, ethylene regulates cell division in QC and auxin biosynthesis in columella cells. In the latter case, auxin is then transported to the epidermal elongating cells where it inhibits cell elongation and increases ethylene sensitivity [57–60].

Figure 0.1 Représentation schématique de la réponse des tissus et régions racinaires chez *Arabidopsis* à l'action de différentes hormones. Le rouge montre les tissus ciblés directement par les hormones et le rose les tissus ciblés indirectement. Tiré de Ubeda-Tomás et al. 2012.

Facteurs endogènes : Certains facteurs induisant des modifications de la croissance des racines sont issus de la plante elle-même.

- **Disponibilité en carbone**: La disponibilité en C peut varier lors de la modification de la photosynthèse, celle-ci pouvant subvenir lorsque la teneur en CO₂ atmosphérique est supérieure ou inférieure à la teneur naturelle de 380ppm. A forte teneur en CO₂, l'augmentation de la photosynthèse induit une augmentation de l'acquisition du C et de son allocation vers les racines. L'analyse des effets d'une augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ sur la croissance des plantes et notamment des racines a reçu beaucoup d'attention au cours des 2 dernières décennies. A forte teneur en CO₂, la croissance des racines augmente généralement par accroissement de la longueur des racines ainsi que de leur diamètre (Pritchard et al. 1999). La production de racines latérales est également stimulée à forte teneur en CO₂, résultant en des racines fortement ramifiées (Pritchard et Rogers 2000).

- **Régulation hormonale** : De récentes recherches effectuées chez *Arabidopsis thaliana* montrent que différentes hormones contrôlent la croissance racinaire en régulant des processus comme la prolifération, la différenciation cellulaire et l'expansion de divers tissus. Les phytohormones comme l'auxine, les cytokinines et les gibbérélines jouent un rôle crucial dans la croissance racinaire (Ubeda-Tomás et al. 2008; Moubayidin et al. 2009). D'autres hormones comme l'acide abscissique, les brassinostéroïdes ou l'éthylène peuvent également être impliquées dans la croissance et le développement, notamment racinaire (Ubeda-Tomás et al. 2012) (Figure 0.1).

Facteurs exogènes : Des facteurs exogènes de nature abiotique ou biotique peuvent aussi moduler la morphogénèse racinaire.

Environnement abiotique :

- **Propriétés du sol (tassement, propriétés physicochimiques)**: le sol doit posséder certaines propriétés permettant l'ancrage des plantes via l'élongation de leurs racines. Des sols fortement compactés/peu poreux peuvent limiter la croissance racinaire d'une part en provoquant une forte résistance à leur progression, d'autre part en limitant l'accessibilité à l'eau et l'oxygène des racines. Un contenu du sol en eau trop important limite l'apport en oxygène pour la respiration racinaire et génère une concentration toxique en CO₂, alors que trop peu d'eau réduirait la croissance racinaire et augmenterait le phénomène de compaction (Gregory 2006). Enfin, les propriétés physico-chimiques du sol peuvent être un facteur modulant la croissance des racines. Ainsi, la salinité des sols peut affecter la croissance des racines, mais dans une proportion moindre que les feuilles. Un faible pH peut conduire également à des effets négatifs sur la croissance des racines et des plantes, à cause de la toxicité engendré par les ions H⁺, Aluminium et Manganèse, ou par la déficience en Calcium ou Molybdène. Les racines, atteintes en premier au sein de la plante, sont ainsi plus courtes et gonflées et il y a inhibition de la croissance des racines latérales.
- **Environnement hydrique** : La disponibilité en eau affecte la croissance racinaire en plusieurs points. Tout d'abord, Schenk et Jackson (2002) ont montré que la profondeur d'enracinement d'une plante était fortement corrélée aux précipitations

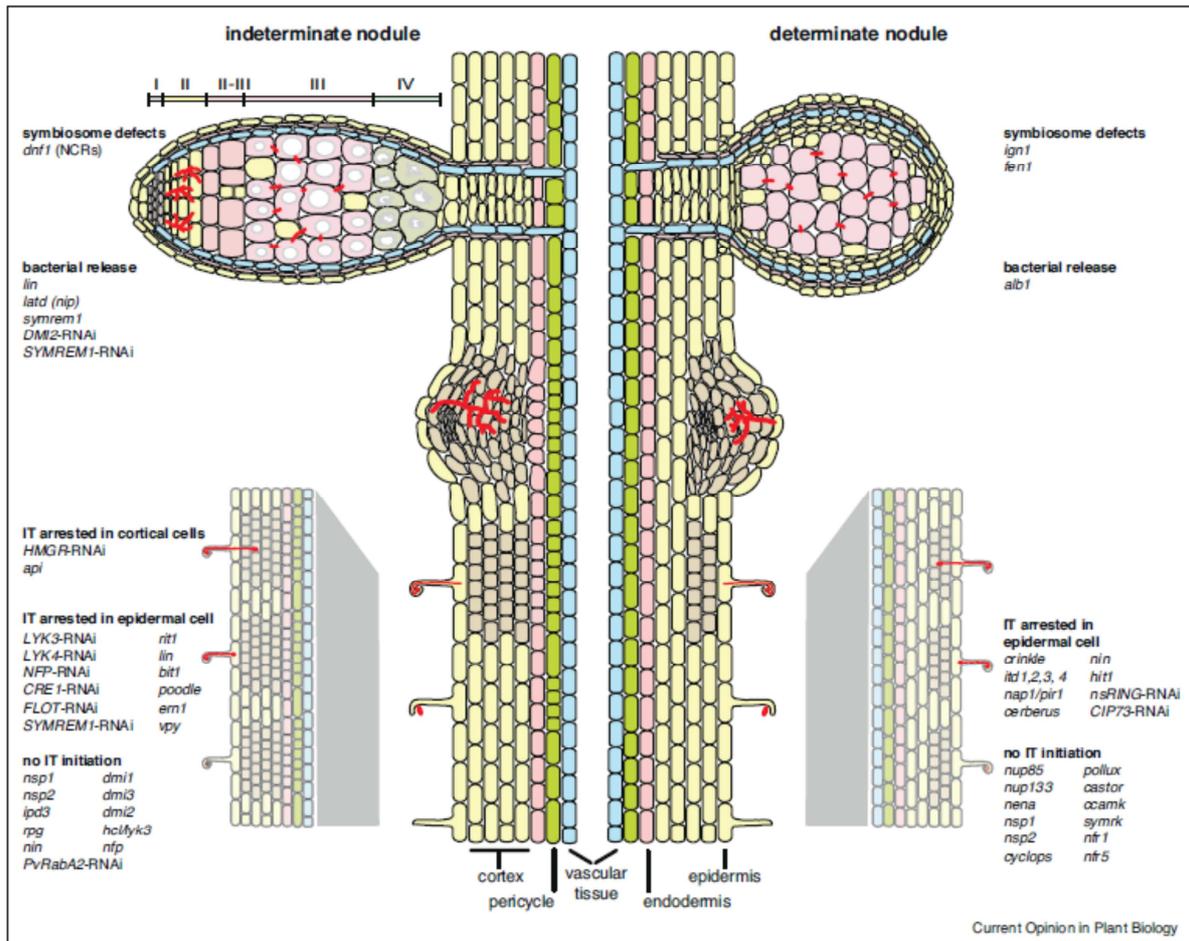
annuelles. Cette relation étant probablement liée à une restriction de la profondeur d'infiltration de l'eau limitant la profondeur d'enracinement. De plus, une limitation en eau aurait pour conséquence d'affecter la morphologie du système racinaire et ses ramifications. Ainsi, lors d'un accroissement de la sécheresse, il y aurait une augmentation de la longueur des racines latérales d'un facteur 3 à 5 (Jupp et Newman 1987).

- Température : L'expansion des racines est affectée par la température au travers de modifications du développement et de la croissance. Comme les parties aériennes, il existe une gamme de température où la croissance est optimale (Gregory 2006). Chez le pois, la gamme de température permettant l'expansion racinaire se situe entre 9°C et 33°C (Klepper 1990). Cependant, à partir de 25°C, on peut commencer à parler de contrainte thermique pour le pois. Il apparaît enfin qu'une modification des températures peut affecter le développement des racines latérales, notamment chez le pois (Gladish et Rost 1993).

Environnement biotique : La rhizosphère constitue une zone extrêmement dynamique permettant des interactions positives et négatives entre les racines, les micro-organismes (rhizobactéries, champignons pathogéniques ou mycorhiziens) et les invertébrés du sol. De nombreuses études énumèrent les interactions entre les plantes et les diverses communautés de la rhizosphère (Mathesius 2003; Bais et al. 2006; Lambers et al. 2009). Les nématodes seraient des vecteurs pour la symbiose mais également des herbivores racinaires. D'autres types de ravageurs racinaires existent comme les animaux, les insectes (Sitones). Certains se nourrissent des parties aériennes induisant une diminution de l'allocation des assimilats carbonés vers les racines et réduisant leur croissance. Certaines bactéries peuvent synthétiser des composés phytotoxiques, de mêmes que certains champignons. La symbiose entre des bactéries, et les légumineuses comme le pois, permet au sein de structures spécifiques formées sur les racines (les nodosités) d'assimiler l'azote atmosphérique. Des bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) permettent une meilleure croissance et un meilleur développement racinaire. Les bactéries rhizobiennes, les champignons mycorhiziens et les nématodes affectent la formation des racines latérales (Mathesius 2003) par modification des niveaux d'auxine dans les racines (longueur des racines latérales, nombre et longueur des poils racinaires).

1.2.Nodosités

Les bactéries fixatrices du genre *Rhizobium* (famille des Rhizobiacées) induisent la formation d'un organe spécifique sur les racines : les nodosités. A l'intérieur de celles-ci, les bactéries réduisent le diazote atmosphérique en ammonium par l'intermédiaire de l'enzyme bactérienne nitrogénase. Cet ammonium est utilisé pour la synthèse des acides aminés entrant dans la composition des protéines. En échange de cette capacité à fournir de l'azote à la plante, les plantes alimentent les bactéries en assimilats carbonés qui permettent de former les structures (ie. nodosités) et d'alimenter en malate les bactéries pour leur fonctionnement entrant dans la composition de squelettes carbonés et en subvenant aux besoins en énergie.



Development of determinate and indeterminate root nodules and phenotypic stages associated with genes involved in rhizobial infection. In legumes that develop indeterminate nodules, Nod Factor perception induces periclinal cell divisions in the pericycle followed by inner cortical cell proliferation during rhizobial infection. Development of a nodule primordium is accompanied by the presence of a persistent meristem leading to a zonation of an indeterminate nodule with the meristem (zone I), the infection zone (II), an interzone (II-III), the fixation zone (III) and the senescence zone (IV). By contrast, determinate nodules derive from cell divisions in the outer root cortex where meristematic activity is lost in mature nodules. A number of mutants in *M. truncatula* (indeterminate) and *L. japonicus* (determinate) have been identified that are impaired in perception of Nod Factors (NFs), rhizobial infection, bacterial release from infection threads (IT; red) or symbiosome formation. The early phase of infection before nodule primordium formation have been further subdivided. Since different phenotypic stages of NF receptor and common *SYM* gene mutants have already been described [24] these stages were all summarised under 'no IT initiation' in this figure. For several mutants or during RNA interference (RNAi)-mediated silencing of genes different phenotypic stage have been described. Here, the most prominent stage is indicated. Gain-of-function mutants (e.g. in the cytokinin receptors) that exhibit spontaneous formation of nodules are not indicated here but are briefly discussed in the text and have recently been reviewed. *Pv*: *Phaseolus vulgaris*. References for all genes can be found in the Supplemental Table 1.

Figure 0.2 Représentation schématique du développement des nodosités de type déterminé ou indéterminé et des stades phénotypiques impliqués dans l'infection bactérienne avec les gènes qui y sont associés. Tiré de Popp et al. 2011.

1.2.1. Symbiose avec la bactérie fixatrice *Rhizobium* et mise en place des nodosités

1.2.1.1. Attraction des bactéries dans la rhizosphère

Les bactéries de la famille des Rhizobiacées vivent de manière saprophyte dans le sol. Elles migrent en direction de la rhizosphère (zone du sol sous l'influence directe des racines) où les plantes relarguent des rhizodépôts composés de glucides, d'acides carboxyliques, d'acides aminés et de flavonoïdes, ces derniers ayant un effet attractif sur les bactéries.

La mise en place de la symbiose fait intervenir des mécanismes de reconnaissance spécifique des partenaires impliqués. Dans un premier temps, les bactéries sont attirées par les flavonoïdes, premiers signaux relargués par la plante hôte. Ces molécules ont une action sur la transcription des gènes Nod chez la bactérie, induisant la production des facteurs Nod, molécules lipochitoooligosaccharidiques (Denarie et al. 1996). Ces molécules se lient à des récepteurs de type lectines situés sur l'épiderme racinaire et conditionnent la spécificité d'hôte.

1.2.1.2. Infection et nodulation de la plante hôte

Les bactéries entrent dans la plante par l'intermédiaire d'un cordon d'infection bactérien en direction du cortex racinaire. La zone d'entrée des bactéries se situe à l'extrémité des poils absorbants, probablement en raison d'une paroi cellulaire plus fine. Simultanément, les cellules du cortex entrent en phase de dédifférenciation afin de former le méristème nodulaire. Les bactéries, libérées du filament d'infection, se transforment en leurs formes actives et différenciées, les bactéroïdes et sont intégrées dans le cytoplasme des cellules végétales par endocytose. Elles sont encerclées par une membrane péri-bactéroïdienne (membrane de type plasmique). L'ensemble composé des bactéroïdes et de la membrane forment le symbiosome. Il peut y avoir jusqu'à plusieurs milliers de symbiosomes par cellule racinaire infectée. Le début de déformation des poils absorbants a lieu de 6 à 18h après inoculation bactérienne, dépendant de l'hôte (Figure 0.2).

Sur la racine, la formation des nodosités a lieu entre la zone d'élongation racinaire et la zone présentant des poils racinaires en cours de développement (à moins de 10cm de la zone en croissance de la racine). A l'échelle du système racinaire, l'apparition des nodosités est maximale sur la base du pivot et sur les premières racines latérales. Le nombre de nodosités décroît en direction de la zone apicale du pivot jusqu'à présenter une zone sans nodosité. Les nodosités sont donc localisées sur la partie supérieure du système racinaire ce qui correspond à la zone labourée d'un sol (jusqu'à 40 cm environ) (Tricot et al. 1997). Tricot et al. observaient en 1997 que la probabilité d'apparition d'une nodosité sur un segment racinaire était positivement corrélée avec la vitesse de croissance de ce segment (Figure 0.3). Ceci impliquerait que l'apparition et le placement des nodosités sur les racines sont tous deux dépendants de la disponibilité en assimilats azotés et carbonés. Une augmentation de la disponibilité en C par utilisation d'une forte teneur en CO₂ est associée à la formation d'un plus grand nombre de nodosités (Murphy 1986).

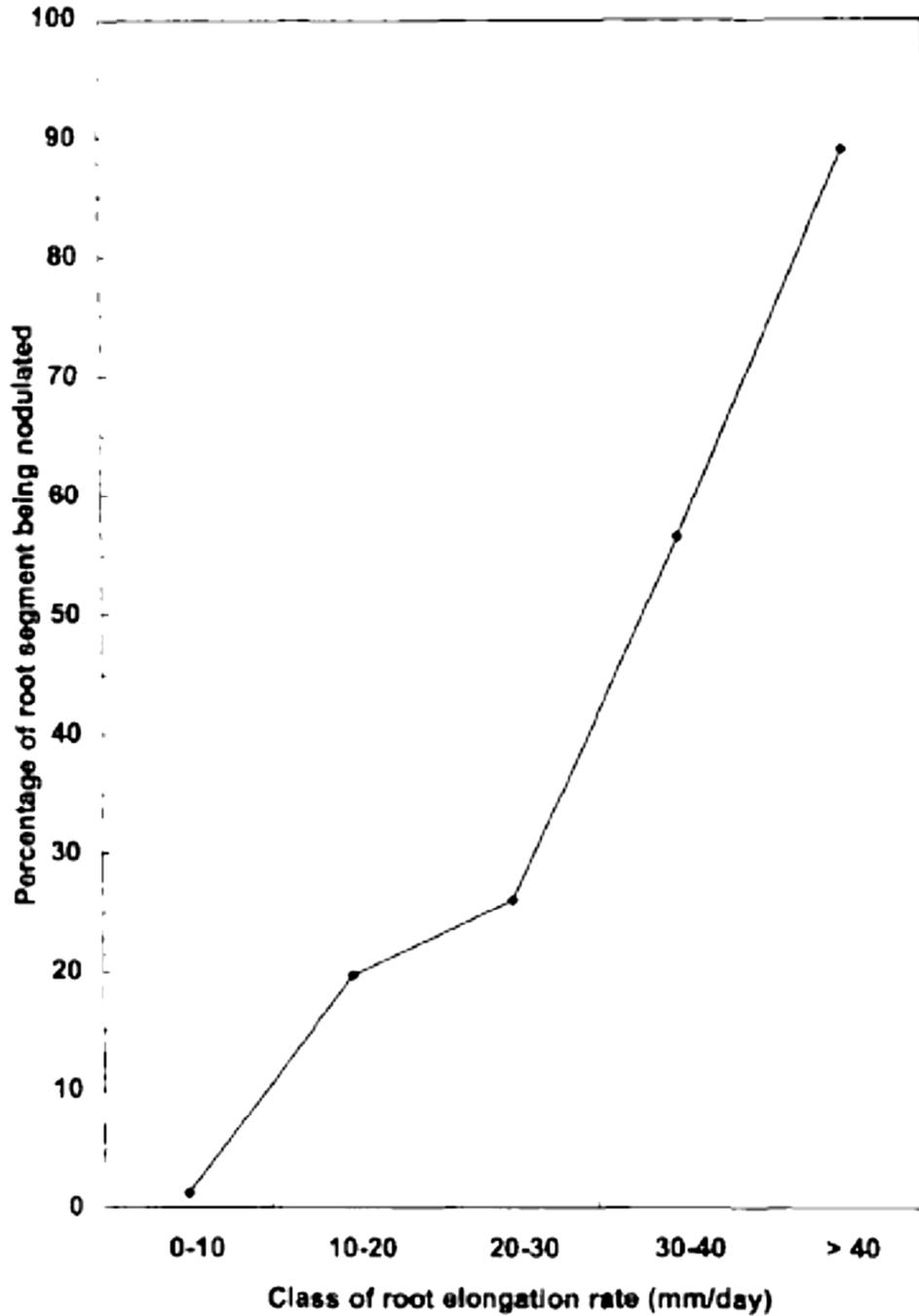


Figure 0.3 Pourcentage de segments racinaires portant des nodosités en fonction de la vitesse d'élongation des racines. Tiré de Tricot et al. 1997.

1.2.1.3. Structure d'une nodosité

Suivant la zone pédoclimatique d'origine des légumineuses, 2 types de structures différentes existent (Figure 0.2):

Les nodosités de type déterminé, présentes généralement chez les Légumineuses tropicales comme celles des genres *Glycine* ou *Phaseolus*. Ces nodosités sont sphériques et possèdent un méristème à durée de vie limitée. Les cellules des nodosités déterminées sont d'âge sensiblement égal.

Les nodosités de type indéterminé concernent les légumineuses tempérées correspondant aux genres *Pisum*, *Vicia* ou *Medicago*. Elles possèdent une forme allongée ainsi qu'une activité méristématique continue. A maturité, les tissus sont d'âges différents les uns des autres.

Les nodosités sont composées de 2 tissus différents:

- un tissu central qui sera la zone fixatrice et le siège de l'expression des gènes bactériens permettant la fixation du N_2 au sein des bactéroïdes. Chez les nodosités de type déterminé cette zone centrale est homogène tandis que chez les nodosités de type indéterminé, le tissu central est divisé en 4 zones. La première correspond à la zone méristématique (ou distale) qui constitue un méristème apical persistant. La seconde zone est la zone d'infection où se trouvent les cordons d'infection permettant l'entrée des bactéries dans les couches plus profondes. La troisième est la zone fixatrice. C'est cette zone qui contient les cellules infectées par les bactéries ainsi que des cellules saines. Entre la seconde et la troisième zone se trouve une zone dite intermédiaire dont les cellules contiennent des bactéries et des amyloplastés (organe des cellules végétales spécialisé dans le stockage de molécules énergétiques : l'amidon). La dernière zone est une zone proximale dite de sénescence.

- le second tissu est le cortex qui entoure le tissu central. Il est constitué d'une succession de couches concentriques de cellules. Un système vasculaire le parcourt permettant de le connecter à celui du cylindre central de la racine, et ainsi de réaliser les échanges entre la plante et les bactéries.

1.2.1.4. Cycle de vie des nodosités

Le cycle de vie des nodosités comporte trois phases principales : la phase de mise en place des nodosités, la phase de croissance rapide et la phase de sénescence.

La phase de mise en place des nodosités décrite précédemment a lieu, à l'échelle de la plante, dès l'apparition des premières feuilles. A l'échelle de la plante, elle se déroule en vagues successives de nodulation chacune caractérisée par l'initiation des nodosités, leur apparition, leur croissance puis la fixation du N_2 (Voisin et al. 2010). En l'absence d'N dans le milieu, l'apparition des nodosités de la première vague de nodulation a lieu au même moment que la chute brutale des teneurs en azote (Voisin et al. 2010). Elle est étroitement corrélée au taux de croissance de la plante la semaine suivant l'initiation des nodosités.

La phase de croissance des nodosités débute 2 à 4 jours après leur initiation et est caractérisée par une augmentation exponentielle de la biomasse des nodosités ainsi que de leur volume jusqu'au stade 9 feuilles (Syono et al. 1976; Voisin et al. 2010). C'est après 3 à 7 jours de croissance que les nodosités commencent à fixer le N_2 (Voisin et al. 2010).

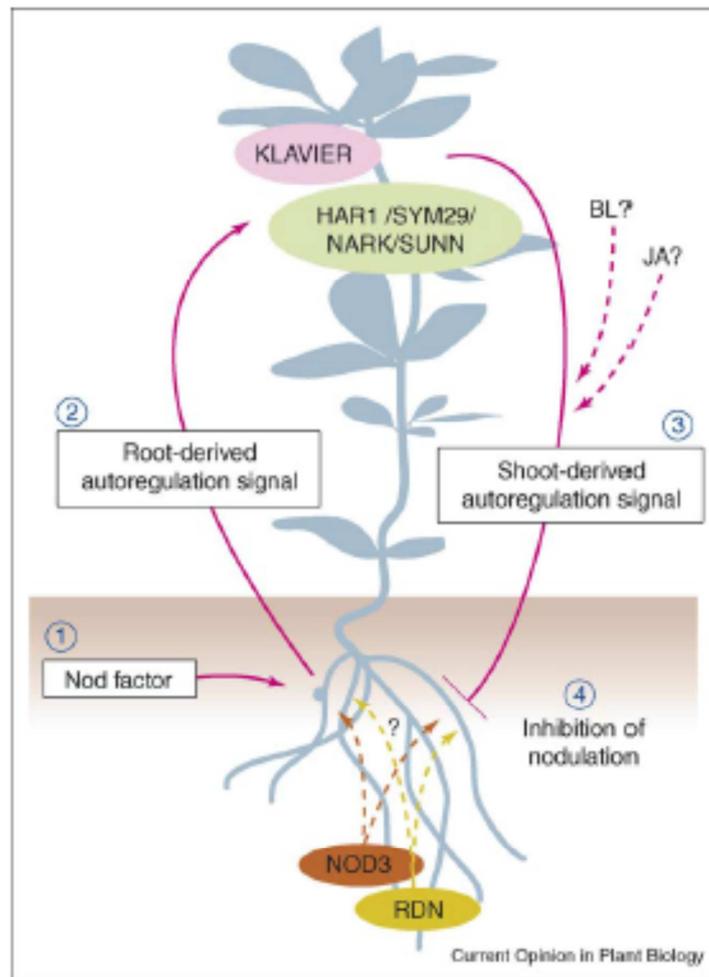


Figure 0.4 Signaux longue-distance de l'autorégulation du nombre de nodosités. 1) perception du facteur Nod bactérien. 2) signal dérivé des racines, transporté jusqu'aux parties aériennes. 3) signal dérivé des parties aériennes. 4) inhibition de la nodulation. HAR1 / SYM29 / NARK / SUNN et KLAIVIER sont des gènes au sein des parties aériennes. NOD3 et RDN sont des gènes des racines possédant un rôle dans la transmission du signal dérivé des racines ou dans la perception du signal dérivé des parties aériennes. Tiré de Oka-kira et Kawaguchi 2006.

Après cette phase, les nodosités possèdent une forte efficacité de fixation. Puis la biomasse des nodosités décroît lentement jusqu'au stade limite d'avortement des graines puis chute fortement en fin de cycle (Pate 1958). La durée de vie d'une nodosité chez le pois est de quelques semaines uniquement (Syono et al. 1976).

La phase de sénescence correspond à une désorganisation du tissu central chez les nodosités de type déterminé, et à une augmentation de la quatrième zone, dite de sénescence, chez les nodosités de type indéterminé. Elle s'exprime par une chute importante de la biomasse des nodosités et à l'arrêt de l'activité de fixation d'azote. Vance et al. (1986) ont montré l'existence d'une activité protéolytique croissante avec l'âge des nodosités. La membrane péribactérienne entourant les bactéries dans le symbiosome se désorganise entraînant la lyse des bactéroïdes. Cette désorganisation est associée à une lyse des protéines solubles comme la Leghémoglobine (protéine qui fixe et véhicule les molécules d'O₂ dans les nodosités, apparentée à l'Hémoglobine humaine ou animale). Cette lyse des protéines entraîne un arrêt de la fixation de l'azote atmosphérique. Le phénomène de sénescence des nodosités apparaît comme une rupture de la symbiose entre le partenaire bactérien et la plante hôte ou comme le résultat de mécanismes liés à l'âge des structures.

1.2.2. Autorégulation du nombre de nodosités (AON)

L'Autorégulation du nombre de nodosités (AON) correspond à des mécanismes régulateurs intrinsèques limitant le nombre de nodosités formées par la plante hôte.

Chez les légumineuses, le mécanisme d'autorégulation serait sous contrôle génétique et physiologique. Il intervient au cours des stades précoces de formation des nodosités et a pour conséquence d'inhiber la nodulation sur les jeunes tissus racinaires (Bauer 1981; Pierce et Bauer 1983; Kossalak et Bohlool 1984; Caetanoanollés et Gresshoff 1991). La régulation de la nodulation consiste en un phénomène de rétroaction systémique négative (Kossalak et Bohlool 1984). En effet, des signaux sont échangés entre la bactérie et la plante conduisant à l'émission d'un premier messenger systémique (« root synthesized inducer ») synthétisé au sein des racines. Il en résulte une cascade de signalisation aboutissant à la synthèse d'un second messenger systémique inhibiteur au sein des parties aériennes (« shoot derived inhibitor ») qui conduira, par rétrocontrôle négatif, à l'arrêt du développement des nodosités ou de leur initiation (Figure 0.4) (Caetanoanollés et Gresshoff 1991; Francisco et Harper 1995; Harper et al. 1997). Des études ont montré que de jeunes nodosités en développement, précédant la mise en place de la fixation d'azote, supprimaient un développement supplémentaire de nodosités sur les jeunes racines. Ceci indique que l'initiation des signaux de l'AON commence avant la fixation de l'azote atmosphérique par les nodosités (Kossalak et Bohlool 1984; Caetanoanollés et Gresshoff 1990).

La nature des signaux mis en jeu dans l'autorégulation du nombre de nodosités reste mal identifiée aujourd'hui. Des études indiquent que ces signaux pourraient être des phytohormones (auxine, éthylène, gibbérélines) (Hirsch 1992), des acides aminés liés à la disponibilité en assimilats carbonés et azotés ou encore des facteurs moléculaires (cmiRNA etc).

1.2.2.1. Autorégulation du nombre de nodosités par un signal de nature phytohormonale

De nombreuses études réalisées ces dernières décennies rapportent que des phytohormones pourraient être à l'origine du signal d'autorégulation au niveau des parties aériennes et agiraient comme des signaux secondaires (Stougaard 2000).

Ces phytohormones sont des hormones de régulation et de développement des plantes comme l'acide jasmonique, des hormones induites en condition de stress (biotique ou abiotique) comme l'éthylène (Stearns et Glick 2003). Les cytokinines ont des propriétés dans la division cellulaire. Lors de la nodulation, les phytohormones peuvent se comporter comme des inhibiteurs de la nodulation, ou à l'inverse, s'avérer indispensables au bon déroulement de la nodulation.

L'éthylène, l'acide abscissique et l'acide jasmonique régulent négativement la nodulation. Lorsque les niveaux d'éthylène sont faibles par exemple, les plantes et les bactéries du genre *Rhizobium* interagissent ensemble afin de former des nodosités. A l'inverse, lorsque le niveau d'éthylène est élevé, celui-ci agit comme un régulateur négatif, la nodulation est alors inhibée au stade initiation des nodosités, mais également au niveau de la maintenance de l'infection (CaetanoAnolles 1997). Des études menées par Penmetsa et Cook (1997) montrent que des mutants de *Medicago truncatula* devenus insensibles à l'éthylène présentaient un phénotype hypernodulant avec un nombre de nodosités dix fois plus élevé qu'un sauvage. Comme l'éthylène, l'acide jasmonique régule négativement la possibilité qu'a la plante de former des nodosités et permet de supprimer l'expression des gènes de la plante associés avec les stades précoces de la nodulation (Sun et al. 2006). Possédant un rôle dans la défense de la plante à une infection, l'acide jasmonique inhibe l'expression des gènes RIP1 et ENOD11 de réponses précoces à *Rhizobium* chez *Medicago truncatula* (Sun et al. 2006). A l'aide de mutants hypernodulants *skl* de *Medicago truncatula*, Sun et al. 2006 montrent la présence d'interactions à la fois synergiques (inhibition de la nodulation) et antagonistes (sensibilité aux facteurs Nod) des voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique. Il semblerait donc que ce dernier puisse être inhibé par l'éthylène.

A l'inverse des précédents, les cytokinines et les gibbérélines ont un rôle positif sur la nodulation. Lorteau et al. (2001) montraient qu'un faible ajout de cytokinine auprès de racines de pois conduisait à un accroissement de la nodulation induite par la bactérie *Rhizobium*. A l'inverse, une suppression de l'expression du récepteur pour la cytokinine réduit la nodulation chez la luzerne *Medicago truncatula* (Gonzalez-Rizzo et al. 2006). Les acides gibbérélines (comme les GA1), formes actives des gibbérélines, sont également requises afin d'obtenir une nodulation normale chez le pois (Ferguson et al. 2005). Des lignées de pois déficientes en GA1 présentent toutes un nombre et une taille de nodosités inférieures au sauvage (Ferguson et al. 2005; 2010).

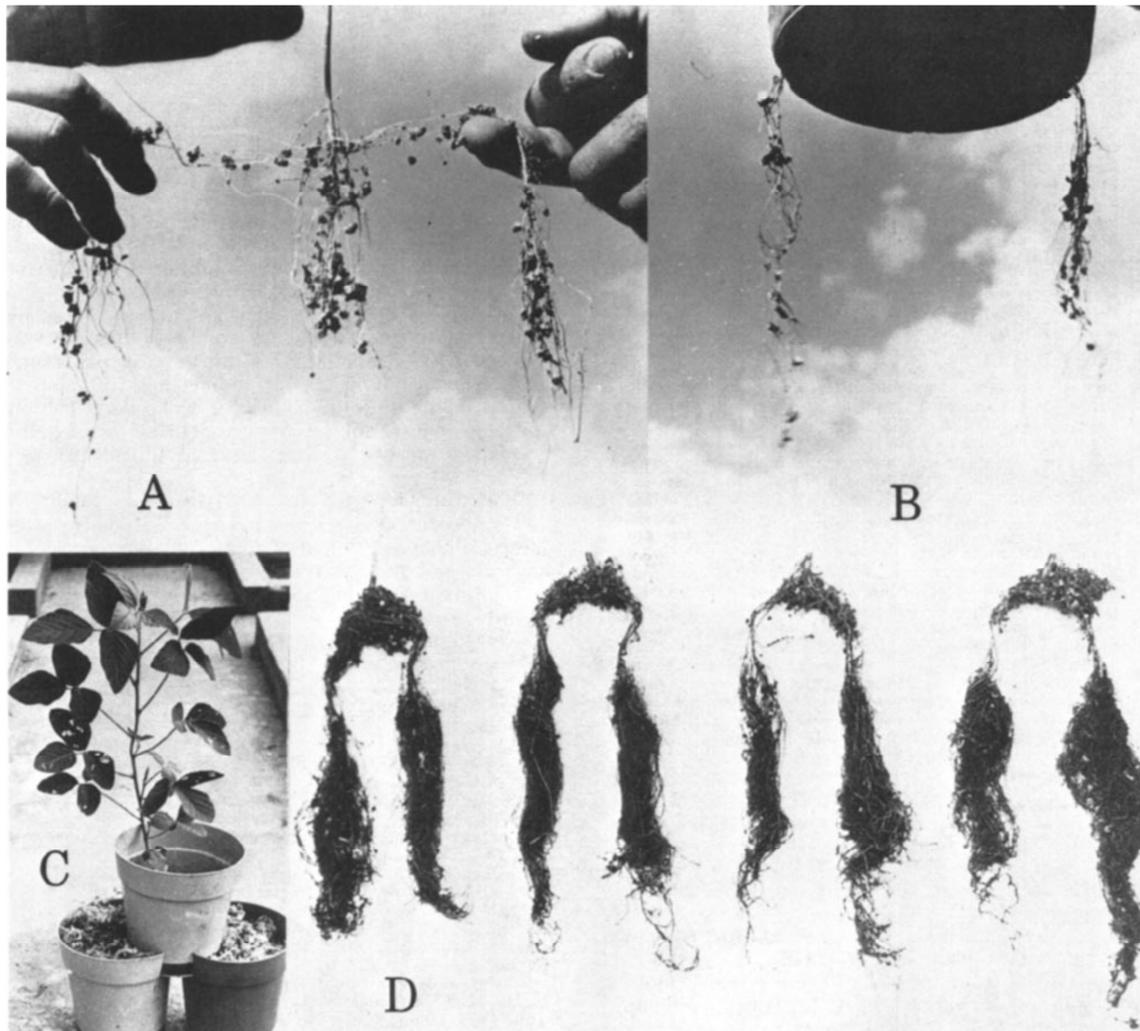


Figure 0.5 Dispositif du split-root, décrit et utilisé par Hinson (1975). A. Développement des racines chez des plantes de 17 jours, lorsque le pivot a été coupé 7 jours auparavant. Des particules de Vermiculite adhèrent aux racines. Aucune nodosité n'est formée à ce stade. B. Racines latérales sortant de 2 extrémités opposées de 15cm d'un pot. C. Dispositif du split-root chez des plantes de 44 jours. D. Système racinaire amendé avec 0, 30, 60 et 120 ppm d'azote de gauche à droite. Les racines traitées avec de l'azote se trouvent sur la moitié droite de chaque système racinaire.

Enfin, il semblerait également que les 2 phytohormones éthylène et gibbérélines pourraient se co-réguler. En effet, Ferguson et al. (2011) ont observé qu'un mutant déficient en gibbérélines a une teneur en éthylène deux fois supérieures à celle d'un sauvage non muté sur la voie de synthèse des gibbérélines. En absence de gibbérélines, 2 gènes codant pour des enzymes responsables de la synthèse de l'éthylène ont une expression augmentée d'un facteur 5 à 10 dans les parties aériennes. L'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse d'éthylène chez ces mutants déficients en gibbérélines aboutit à la formation de nodosités.

1.2.2.2. Autorégulation du nombre de nodosités par le statut azoté

Hinson (1975) a utilisé chez le soja un système permettant de séparer les racines d'une plante en 2 groupes distincts, appelé split-root (Figure 0.5). L'objectif était de définir les effets de l'application d'N sur une partie des racines uniquement. Le premier groupe de racines n'était pas alimenté en azote alors que pour le second groupe, différentes concentrations de nitrate d'ammonium ont été ajoutées. Dans le pot amendé en azote, Hinson observait une diminution du nombre et de la biomasse des nodosités. Ces résultats démontraient l'effet inhibiteur du nitrate sur le développement des nodosités. Voisin et al. (2002a, 2002b) ont réalisé des expériences en champ mettant en place une situation de disponibilité en azote minéral (NH_4NO_3) variable chez *Pisum sativum* var. Baccara. Ils ont confirmé que la nodulation ne se déroulait que lorsque la disponibilité en nitrate était faible.

Ruffel et al. (2008) ont également utilisé la technique du split-root chez *Medicago truncatula*, afin d'étudier le mécanisme de contrôle des 3 voies d'acquisition d'azote : l'assimilation de nitrate, d'ammonium, et la fixation de N_2 . Pour chaque voie d'acquisition d'N, les plantes sont séparées en un groupe alimenté normalement en N, et un autre groupe dont la moitié des racines sont plongées dans un compartiment privé d'N. Ils ont observé que chacune des 3 voies d'acquisition est contrôlée par un signal systémique de rétrocontrôle négatif lié au statut azoté de la plante. Suite à une privation de N_2 sur une partie des racines, les auteurs ont observé une augmentation de la biomasse et du nombre de nodosités sur le groupe de racines normalement alimenté en N. Ces résultats suggèrent une réponse au stress des plantes à la fois locale et systémique. Des analyses transcriptomiques effectuées sur les racines des plantes limitées en azote ont permis de mettre en évidence plus de 200 transcrits associés aux nodosités. Ceux-ci seraient surexprimés chez les plantes normalement alimentées en azote comparées aux limitées, impliquant que l'appareil fixateur d'azote serait la cible principale du signal systémique lié au statut azoté (Ruffel et al. 2008). Certains des transcrits seraient connus pour être impliqués dans la structure des nodosités, et dans les stades précoces de la nodulation. Ces résultats suggèrent que la régulation exercée par le statut N de la plante pourrait cibler l'ensemble des processus de développement des nodosités (Ruffel et al. 2008).

Jeudy et al. (2010) ont également utilisé un dispositif en split-root chez *Medicago truncatula*, permettant de caractériser la réponse adaptative de mutants hypernodulants à une privation locale et temporaire en N. Les auteurs ont montré que, chez *Medicago*, les mécanismes de régulation locaux et systémiques liés au statut N des plantes contrôlaient le développement des nodosités. Chez *Medicago truncatula*, le gène *SUNN* était alors requis pour la régulation systémique de la nodulation. En revanche, Jeudy et al. (2010) ont observé

que la stimulation de la nodulation (par augmentation de la biomasse des nodosités puis du nombre de nodosités) déclenchée par le signal systémique lié au statut N n'impliquait pas le gène *SUNN*. Ces résultats suggèrent un mécanisme de signalisation du gène *SUNN* indépendant du signal lié au statut N.

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, et de comprendre quelle est l'implication de chacune des 2 voies de régulation, Voisin et al. (2010) ont réalisé une expérimentation en hydroponie utilisant *Pisum sativum* var. Baccara et 3 mutants hypernodulants. Cette expérimentation permettait de faire varier la nutrition azotée par utilisation de différents teneurs en N dans la solution nutritive. Voisin et al. ont tout d'abord montré que des plantes cultivées en absence de nitrate avait une soudaine diminution en concentration en N. Celle-ci était due à l'épuisement des ressources de la graine coïncidant avec la première vague de nodulation. La diminution en N s'arrêtait lorsque la vague de nodulation était terminée. Chez les hypernodulants, dont l'autorégulation de la nodulation est défectueuse, la vague de nodulation continuait malgré l'arrêt de la diminution de la teneur en N. Le nombre excessif de nodosités dû à l'hypernodulation permettant d'équilibrer la demande en azote. Chez les hypernodulants, à l'opposé d'un sauvage, la nodulation excessive se déroule en permanence, que ce soit en présence ou en absence de nitrate (Voisin et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats tend à suggérer que la régulation du nombre de nodosités implique à la fois l'autorégulation du nombre de nodosités (AON) et le signal systémique lié au statut N, ces 2 voies pouvant être partiellement interconnectées.

1.2.2.3. Gènes impliqués dans l'Autorégulation de la Nodulation

En condition d'absence d'azote, les légumineuses ajustent étroitement leur nombre de nodosités à la demande en N pour la croissance par l'intermédiaire de l'AON. La création de lignées mutantes ayant une modification dans la capacité de former les nodosités a permis de mettre en évidence un contrôle génétique de l'AON. L'utilisation de ces lignées mutantes a permis d'étudier un certain nombre de gènes contrôlant la nodulation et la fixation chez les légumineuses (Verma 1989).

Chez différentes légumineuses comme le pois, le soja, le haricot, l'utilisation d'Ethyl Méthyl Sulfonate (EMS) permet l'obtention de mutants dont l'analyse génétique a montré que certains loci présents chez ces plantes sont impliqués dans le contrôle de la nodulation. Les mutations permettent d'aboutir à la formation de mutants ne formant pas de nodosités : les mutants non nodulants, ou des mutants hypernodulants (Caetanoanollés et Gresshoff 1991).

Des éléments suggèrent que l'autorégulation du nombre de nodosités est un processus systémique. En effet, l'utilisation des mutants hypernodulants montre que certains hypernodulants contrôlent la formation de nodosités par l'intermédiaire des parties aériennes. Des greffes entre des parties aériennes d'un mutant hypernodulant et des racines d'un sauvage chez la glycine ou le soja conduit à une hypernodulation (Delves et al. 1986; Delves et al. 1988). La greffe de parties aériennes « sauvage » sur des racines de plantes « mutées » présentait quant à elle un nombre de nodosités normal.

L'autorégulation du nombre de nodosités consisterait donc en un signal longue-distance échangé entre les parties aériennes et souterraines comme le suggère Oka-Kira et

Kawaguchi (2006) (Figure 0.4). Le signal est encore mal compris aujourd'hui, mais il semblerait que la perception des facteurs Nod bactériens au sein des parties souterraines en soit le début. Il s'ensuivrait alors un signal court systémique (« root synthesized inducer ») allant des parties racinaires vers les parties aériennes, appelé aussi signal d'infection. Ce signal agirait sur des gènes orthologues présents dans les parties aériennes comme *Sunn* chez *Medicago* (Super Numeric Nodules) ou *SYM28* et *SYM29* (Symbiosis28 ou 29) chez le pois (Oka-Kira et Kawaguchi 2006). A la suite d'une cascade de signalisation, un signal long de rétroaction (« shoot derived inhibitor ») serait alors transmis des parties aériennes vers les parties souterraines afin d'inhiber la nodulation. Un autre groupe de gènes, *Rdn* chez *Medicago* (Root-Determined Nodulation) ou *NOD3* chez le pois (Nodulation3), agirait au sein des racines afin soit de percevoir le signal émanant des parties aériennes, soit dans la transmission du signal issus des racines (Oka-Kira et Kawaguchi 2006).

Chez le pois, une mutation provoquée sur un des 3 gènes impliqués dans l'AON (*NOD3*, *SYM28* et *SYM29*), conduit à la formation d'hypernodulants.

Jacobsen et Fenster (1984) mettaient en évidence un mutant, *NOD3*, ayant la capacité de noduler en présence de nitrate. Sagan et Duc (1996) confirment par des expérimentations de greffe que le phénotype hypernodulant du mutant *NOD3* est bien contrôlé au sein des racines comme l'avait démontré Postma et al. (1988). Ce mutant *NOD3* était issu de *Pisum sativum* var. Rondo et possédait la capacité de former un nombre de nodosités supérieur à un sauvage, que ce soit sur un milieu avec ou sans nitrate. La biomasse des nodosités était également bien supérieure chez le mutant que chez le sauvage (Jacobsen et Fenster 1984). La présence de nitrate entraînait toutefois un effet sur le mutant puisque celui-ci formait moins de nodosités sur les extrémités des racines comparé au sauvage. Il semblerait également que le mutant possédait plus de racines latérales et tertiaires, alors que le sauvage en possédait des plus longues (Jacobsen et Fenster 1984).

Duc et Messenger (1989) présentent un nouvel hypernodulant issu d'une mutation de *Pisum sativum* var. Frisson, ayant l'autorégulation stoppée au niveau du gène *SYM28*. Muté par utilisation d'Ethyl Méthyl Sulfonate, P64 présente également une modification du système aérien. En effet, les tiges de *SYM28* ont une croissance réduite et faciée avec des entrenœuds plus courts avant les boutons floraux (Duc et Messenger 1989).

Sagan et Duc (1996) introduisent le mutant P118 muté au niveau du gène *SYM29* issus de *Pisum sativum* var. Frisson. Dans leur étude utilisant des hypernodulants mutés sur un des deux gènes *SYM28* et *SYM29*, ils démontrent une différence significative dans le nombre de nodosités entre les mutants et le sauvage. Ils montrent également que les hypernodulants possèdent une partie aérienne dont la biomasse est significativement plus faible que le sauvage (Sagan et Duc 1996), cette caractéristique pouvant être due au génotype hypernodulant ou à la présence ou non de nitrate. Des expérimentations de greffes entre les mutants et le sauvage montrent que les gènes *SYM28* et *SYM29* agissent au sein des parties aériennes, à la différence du gène *NOD3* précédent (Duc et Messenger 1989; Sagan et Duc 1996). Il semblerait que la nodulation en présence de nitrate de ces mutants soit le fait d'un caractère Nts (nodulation tolérante au nitrate) suggérant un mécanisme commun de régulation entre l'autorégulation du nombre de nodosité (AON) et l'inhibition de la nodulation en présence de nitrate (Jacobsen et Fenster 1984; Duc et Messenger 1989).

L'hypernodulant confère aux mutants des modifications structurales comparées à un sauvage. La mise en place des nodosités chez les hypernodulants s'effectue plus tôt que chez un génotype sauvage avec une durée de vie des nodosités plus longue (Bourion et al. 2007). La formation excessive de nodosités associée à une activité de fixation d'azote plus faible qu'un sauvage entraîne une fixation d'azote équivalente entre un sauvage et un mutant hypernodulant (Carroll et al. 1985; Schuller et al. 1988; Voisin et al. 2007). En revanche, l'hypernodulation entraîne un plus faible développement des racines comparé à celui chez un sauvage (Bourion et al. 2007).

1.3. Interaction entre la mise en place et la formation des nodosités et l'environnement (biotique et abiotique)

Un certain nombre de facteurs environnementaux peuvent avoir des effets sur la mise en place des structures nécessaires à la fixation de l'azote atmosphérique. Ces facteurs peuvent être de nature biotique (liés à des organismes vivants) ou abiotique (variation de température, de la disponibilité en eau ou en nutriments ...).

1.3.1. Facteurs biotiques agissant sur les nodosités

Bais et al. (2006) expliquent dans leur synthèse bibliographique les interactions positives ou négatives qui peuvent se produire au sein de la rhizosphère.

Interactions positives : Une interaction entre une plante et une protéobactérie du genre *Rhizobium* permet de mettre en place les nodosités responsables de la fixation de l'azote atmosphérique chez les légumineuses (2001). Une interaction avec une autre bactérie comme *Azospirillum brasilense* permettrait une élongation des racines primaires et une augmentation du nombre de racines secondaires (Fibach-Paldi et al. 2012). D'autres bactéries peuvent également synthétiser un film protecteur sur les racines d'*Arabidopsis* agissant contre les pathogènes (Bais 2004). Des nématodes (*Caenorhabditis elegans*) peuvent également interagir positivement avec les plantes du genre *Medicago* et les bactéries du genre *Rhizobium Sinorhizobium meliloti* en permettant à ces dernières de pénétrer plus facilement dans les racines afin de former les nodosités (Horiuchi et al. 2005).

Interactions négatives : A l'inverse, certains facteurs biotiques ont un effet négatif sur la mise en place des structures. Ainsi, la sitone du pois (*Sitona lineatus* L.) est considérée comme un ravageur occasionnant de sévères dégâts sur les cultures, affectant ainsi les rendements. Mis à part les dégâts provoqués sur les parties aériennes par les sitones adultes, les larves provoquent une altération des parties souterraines (racines et nodosités) (Dore et Meynard 1995). Les champignons et les bactéries peuvent également avoir des effets délétères sur les racines nodulées. C'est le cas par exemple du champignon *Aphanomyces*, décrit par Labrousse (1933) qui provoque une pourriture du système racinaire et peut engendrer des pertes de rendement allant jusqu'à 80% (Gaulin et al. 2007). Il existe également des phénomènes d'allélopathie entre plantes au cours desquelles une plante excrétera des composés allélopathiques ayant des propriétés phytotoxiques sur les racines des plantes

voisines, altérant ainsi leur croissance (Weir et al. 2004).

1.3.2. Facteurs abiotiques agissant sur les nodosités

A l'instar des facteurs biotiques, il existe des facteurs abiotiques qui ont un impact sur la mise en place des structures souterraines ou leur capacité à être maintenues.

Le nitrate : C'est le facteur abiotique ayant le plus d'impact sur les nodosités. Il permet une modulation du ratio racines/nodosités. A l'échelle des nodosités, la présence de nitrate induit une limitation de l'apparition des nodosités par modification de la synthèse de flavonoïdes ou en empêchant l'infection des poils racinaires par la bactérie rhizobienne (Bandyopadhyay et al. 1996; Dazzo et Brill 1978). Cependant, chez certaines espèces de *Rhizobium*, la présence de nitrate n'affecte pas négativement l'infection des racines par la bactérie (Lucinski et al. 2002) laissant la symbiose entre les plantes et la bactérie possible.

Les nodosités représentent un organe coûteux en énergie pour la plante (C issus des assimilats carbonés) (Voisin et al. 2003). Le C est nécessaire à la fois pour la formation, l'entretien et le fonctionnement des nodosités. Ainsi, en présence de nitrate dans le sol, l'assimilation de l'azote minéral par les racines (moins coûteuse en énergie) s'effectue prioritairement sur la fixation. En présence de nitrate, il y a une diminution de la biomasse et du nombre des nodosités déjà formées (Streeter, 1988, Naudin et al. 2011) alors que l'activité de fixation est moins affectée. Cependant, lorsque le nitrate est retiré, la croissance des nodosités reprend (Naudin et al. 2011; Ohyama et al. 2011).

Le déficit hydrique : C'est le deuxième facteur ayant le plus d'impact sur les structures souterraines. D'après Hungria et Vargas (2000), le stress hydrique peut également avoir un effet sur la croissance des bactéries rhizobiennes, leur survie et la structure des populations pouvant alors entraîner un échec de la nodulation. De plus, en condition de stress hydrique, la teneur en azote et la biomasse des racines et des nodosités du pois *Pisum sativum* est réduite de respectivement 30% et 65% avec un impact plus important au stade floraison (Mahieu et al. 2009).

La température : La gamme de température pendant laquelle se déroule la croissance des plantes peut avoir un impact sur la mise en place et le maintien des structures. Hungria and Vargas (2000) expliquent que de fortes températures diminuent les capacités de survie des rhizobactéries, rendant plus difficile le processus de nodulation. Une température supérieure à 25°C entraîne une baisse de la photosynthèse et est donc dommageable pour le pois (Guilioni et al. 2003). Une diminution de la photosynthèse entraîne une diminution de l'apport en assimilats carbonés aux structures souterraines. A l'inverse, des températures trop basses entraîneraient un retard dans la nodulation (Pan et Smith 1998). Pour le pois, la nodulation est la plus rapide à une température au niveau des racines de 20°C, des températures supérieures ou inférieures la retardant (Lira Junior et al. 2005).

L'état structural du sol : Il est rapporté par Vocanson et al. (2006) qu'un sol fortement compacté impacte négativement sur la profondeur de sol explorée par les racines d'une culture

de pois. La compaction entraîne une diminution de la taille des macropores dans le sol (Stepniewski et al. 1994), ce qui limite l'aération et empêche la croissance des racines. Eavis (1972) a démontré que, chez le pois, la longueur, la biomasse et l'élongation des racines sont touchées par le manque d'oxygène dans un sol compacté. De plus, la compaction influe directement et négativement sur la nodulation (Tricot 1993). En effet, sur le pivot du pois, le nombre de nodosités diminue dans un sol compacté et se trouve essentiellement sur la partie basale de celui-ci. Cependant, cette diminution est compensée par une augmentation du nombre de nodosités sur les racines latérales plus en surface.

1.4. Modulation à l'échelle de la plante : relation de compétition entre les organes de la plante et conséquences sur la mise en place des racines et des nodosités

Les deux voies d'acquisition d'N (l'assimilation de l'azote minéral et la fixation de l'N atmosphérique) sont complémentaires pour l'N mais sont antagonistes pour les assimilats carbonés. En effet, chacun de ces 2 processus requiert des structures associées à une fonction, nécessitant de l'énergie sous forme d'assimilats carbonés. Ces photoassimilats proviennent de la photosynthèse foliaire et sont sous forme d'amidon, saccharose, maltose, glucose et fructose (Halford et al. 2011). Il existe cependant une compétition entre les organes pour le carbone disponible entraînant des priorités dans les règles d'allocation des photoassimilats.

1.4.1. Coûts en assimilats carbonés liés à la nodulation

L'initiation de la formation des nodosités a lieu en absence de nitrate, et pour la première vague de nodosités, lorsque les réserves de la graine sont épuisées. Cependant, une semaine est nécessaire entre l'initiation de la formation des nodosités et le début de la fixation symbiotique par les nodosités. Cela provoque une déficience en N mais également une diminution de la croissance des plantes. Les besoins importants en C nécessaire à la formation des nodosités accroissent l'importance de la transition entre l'hétérotrophie des jeunes plantules (éléments apportés par la graine) et l'autotrophie (le C est apporté par la photosynthèse foliaire) (Voisin et al. 2010).

De tous les organes, les nodosités représentent le puits en carbone le plus important pour la plante entraînant un coût élevé en carbone lors de la nodulation. Le carbone est utilisé pour la mise en place et la croissance des nodosités, la réduction du N₂ et l'exportation des produits de réactions, et enfin la maintenance de composants moléculaires nécessaires à différents processus biochimiques (enzymes, protéines) (Warembourg 1983). En effet, la photosynthèse brute se décompose en la photosynthèse nette représentant l'assimilation du C dans la biomasse, et le C perdu par respiration. La respiration représente le coût en C nécessaire à la croissance, l'entretien et le maintien des structures. Le coût en C nécessaire lors du processus de respiration des nodosités est élevé. En effet, au stade végétatif, 31% du carbone issu de la photosynthèse nette est perdu en respiration par les racines nodulées ce qui correspond à plus de 60% du carbone qui leur est alloué (Voisin et al. 2003a).

Chez les mutants hypernodulants, la formation des nodosités est excessive, entraînant un coût plus élevé en C que chez un génotype sauvage, ce qui induit une croissance déprimée des parties aériennes et des racines (Salon et al. 2001; Voisin et al. 2007; 2013).

1.4.2. Interaction entre le métabolisme carboné et la mise en place des nodosités

Au cours de sa croissance, une plante passe par 3 phases majeures qui impliquent des besoins différents en carbone au sein des différents organes qui la composent. Il est à noter que quel que soit le stade du cycle de la plante, une augmentation de la photosynthèse entraîne une augmentation du carbone alloué aux racines nodulées. Ceci implique que la demande en carbone des parties souterraines est limitée par la disponibilité en carbone (Voisin et al. 2003a).

La première phase est la phase végétative pendant laquelle on observe une forte croissance des parties aériennes (tige et feuille) et souterraines (racines et nodosités). Il y a alors compétition pour le carbone entre les parties aériennes et les parties souterraines. Approximativement 45% des produits issus de la photosynthèse sont à destination des parties souterraines (Voisin et al. 2003a). Chez le pois, il y a une corrélation linéaire entre l'assimilation du carbone dans la biomasse des racines et des nodosités et les biomasses de celles-ci. Autrement dit, plus l'assimilation du C des parties souterraines augmente et plus la biomasse de celles-ci augmente (Voisin et al. 2003b). La force de puits pour le C représente la quantité de carbone assimilé dans un compartiment par unité de biomasse de celui-ci. Au sein des parties souterraines, Voisin et al. (2003b) ont émis l'hypothèse que les racines étaient un puits secondaire pour les assimilats carbonés provenant de la photosynthèse. Leur croissance est alors limitée par celle des nodosités représentant le puits majoritaire des assimilats au sein des parties souterraines. Ceci vient en contradiction avec les éléments montrés par Tricot et al. (1997) qui suggéraient que l'élongation racinaire serait prioritaire en condition de disponibilité des assimilats limitante sur la formation et le développement des nodosités. Au sein des nodosités elles-mêmes, il semblerait que le développement de nouvelles nodosités serait un fort puits en assimilats carbonés et se fasse aux dépens des nodosités issues d'une précédente vague de nodulation (Hacin et al. 1997).

La seconde phase est la phase de floraison où apparaissent les organes reproducteurs de la plante. Au fur et à mesure de l'apparition de ceux-ci, les priorités au sein de la plante pour les assimilats carbonés changent, les organes reproducteurs devenant plus compétitifs que les parties souterraines. L'allocation dans ces dernières des composés carbonés issus de la photosynthèse n'est que plus que de 20 à 30% au cours de cette phase (Voisin et al. 2003a). Les organes reproducteurs sont un puits de carbone élevé et leur apparition entraîne un coût en carbone pour la plante. Les parties souterraines deviennent plus limitées en apport carboné, cependant les nodosités restent le puits en carbone le plus important en valeur relative au sein des parties souterraines (Voisin et al. 2003b). La croissance des nodosités et leur coût de maintien se font alors aux dépens des racines. La croissance des nodosités diminuerait la disponibilité du carbone nécessaire à la croissance des racines. D'autre part, de la même manière qu'au stade végétatif, plus l'assimilation de carbone dans la biomasse des parties

souterraines augmente, et plus la biomasse des parties souterraines augmente. Cependant il semblerait qu'à partir de la floraison, la photosynthèse nette n'affecte plus la force de puits des racines ou des nodosités, indiquant que la photosynthèse n'est à ce stade pas responsable de la variabilité ou de la limitation de la croissance des racines et des nodosités (Voisin et al. 2003b).

La troisième phase est la phase de remplissage des graines où l'on observe que ces dernières représentent le puits prioritaire de carbone pour la plante. En effet, moins de 7% du C issu de la photosynthèse nette est à destination des racines nodulées, les parties aériennes et souterraines devenant alors équivalentes en terme de priorité pour le C (Voisin et al. 2003a). Lors du remplissage des graines, le C alloué aux racines et aux nodosités n'est plus corrélé à leur biomasse. Ceci indique que le carbone est principalement utilisé pour la maintenance des racines et des nodosités mais plus pour leur croissance (Voisin et al. 2003b). En effet, pendant le stade de remplissage des graines, la croissance des racines et des nodosités est terminée. Cependant, Voisin et al. (2003b) ont pu montrer que le C était prioritairement alloué aux racines ou aux nodosités selon la voie d'acquisition de l'N. En effet, un système assimilateur de nitrate verra une allocation de carbone principalement destinée aux racines, alors que ce seront les nodosités sur un système fixateur de N₂. A la fin du cycle, la forte demande en assimilats nécessaires au remplissage des graines et la faible force de puits des racines nodulées se traduira par la sénescence plus ou moins rapide des racines et des nodosités.

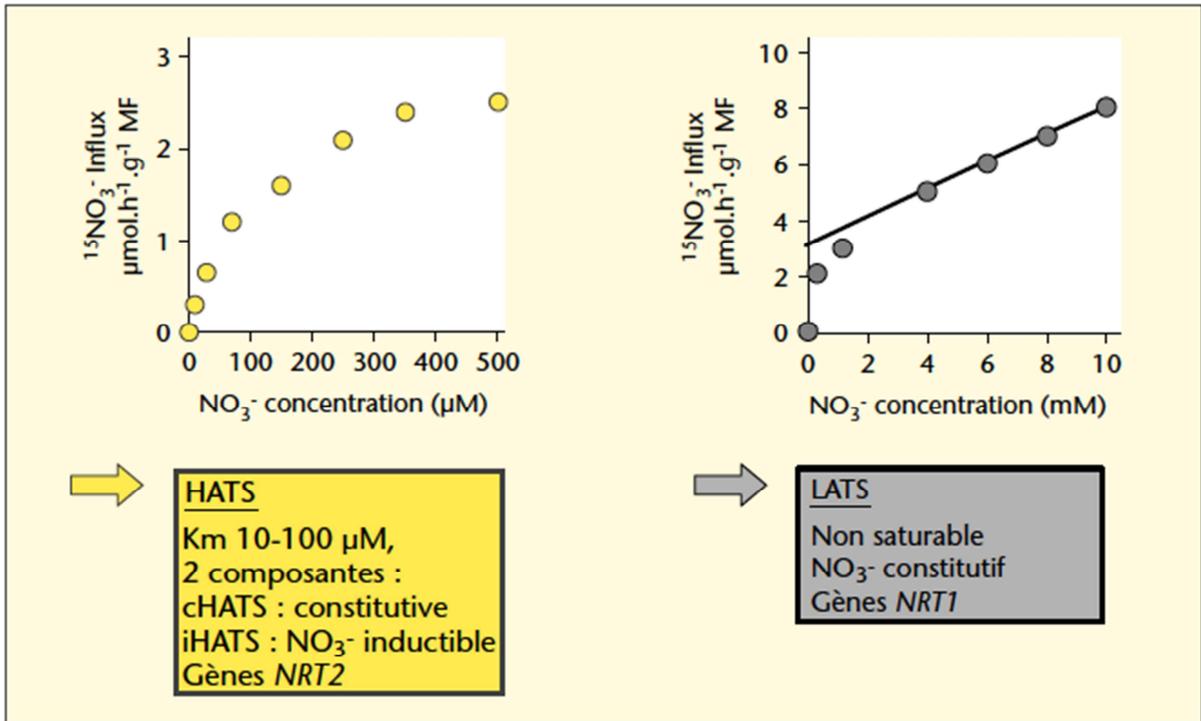


Figure 0.6 Cinétique d'assimilation du nitrate : système à haute affinité (HATS), constitutif et inducible, système à basse affinité (LATS) constitutif et inducible. Tiré de Morot-Gaudry et al. 2006

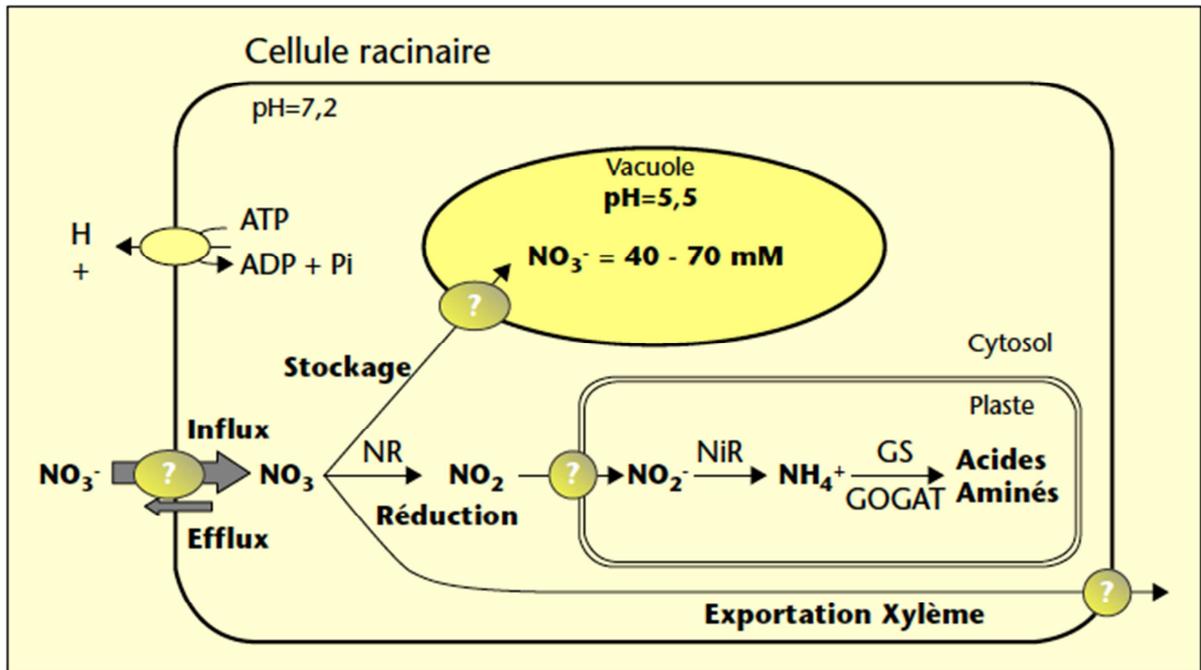


Figure 0.7 Schéma d'assimilation de l'azote chez les plantes : absorption racinaire du nitrate, stockage vacuolaire et réduction en nitrite et ammonium, synthèse des acides aminés et exportation; GOGAT, glutamate synthase ; GS glutamine synthétase ; NiR, nitrite réductase ; NR, nitrate réductase. Tiré de Morot-Gaudry et al. 2006

2. Fonctions liées au prélèvement d’N : les voies d’acquisition d’N et leur régulation

2.1. Assimilation de l’azote minéral

Bien qu’elles aient la faculté d’assimiler le diazote atmosphérique par le biais de la symbiose avec *Rhizobium*, les légumineuses, comme toutes les plantes, peuvent aussi acquérir l’azote minéral présent dans le sol par leurs racines. La forme essentiellement assimilée est le nitrate, bien que ces plantes puissent absorber également du nitrite et de l’ammonium (Nightingale 1937).

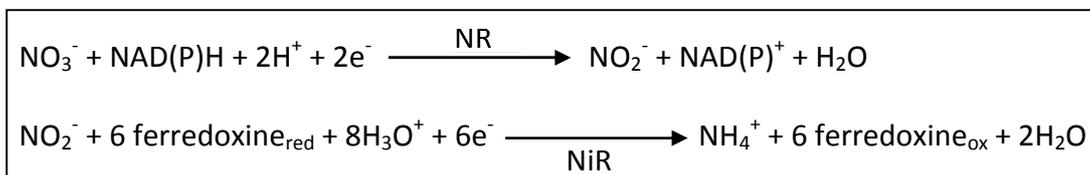
2.1.1. Assimilation des nitrates

La concentration en NO_3^- dans le sol est très variable, allant de quelques micromolaires à quelques millimolaires. Afin de s’adapter à ces gammes de concentrations contrastées, les plantes ont développé des transporteurs adaptés : il existe ainsi 2 systèmes de transports différents pour le NO_3^- : un système de transport à haute affinité (HATS), et un système de transport à basse affinité (LATS) (Morot-Gaudry et al. 2006).

Pour les faibles concentrations de NO_3^- dans le sol, de l’ordre de 0.2 à 500 μM , l’assimilation des NO_3^- est réalisée par les transporteurs à haute affinité HATS qui sont saturables au-delà de 200 μM de NO_3^- . Ils possèdent la particularité d’avoir une composante inductible en présence de NO_3^- et une composante constitutive qui fonctionne constamment. La composante inductible permet de multiplier par 50 la capacité de transport du NO_3^- .

Lorsque la concentration en nitrate dans le sol excède 200 μM et ce jusqu’à 50mM, les transporteurs utilisés par la plante sont les transporteurs à faibles affinités LATS qui sont non saturables. Ces transporteurs, majoritairement présent dès 1mM de NO_3^- , possèdent également une composante constitutive (Morot-Gaudry et al. 2006) (Figure 0.6) et inductible.

Le NO_3^- absorbé par la racine peut être 1) soit stocké transitoirement dans la vacuole, 2) soit exporté par le xylème vers les parties aériennes, ou encore 3) être réduit au sein des racines en ammonium NH_4^+ . Cette réduction s’effectue en 2 étapes catalysées par la nitrate réductase (NR) et la nitrite réductase (NiR) selon les réactions suivantes :



La première réaction catalysée par la NR est cytosolique. Une fois le NO_3^- réduit en NO_2^- , ce dernier sera transporté dans le plaste pour être réduit en NH_4^+ . Le NH_4^+ synthétisé pourra alors être utilisé dans la synthèse des acides aminés par l’intermédiaire de la réaction catalysée par les enzymes GS / GOGAT (Figure 0.7).

2.1.2. Régulation de l'assimilation des nitrates

2.1.2.1. Par l'intermédiaire de ses transporteurs

L'assimilation de NO_3^- peut être modulée via la régulation des gènes codant pour les transporteurs HATS et LATS de nitrate. Les gènes de la famille Nrt2 codant pour les transporteurs HATS et ceux de la famille Nrt1 codant pour les LATS sont soumis à des mécanismes de rétrocontrôles (Okamoto et al. 2003). 3 catégories de gènes ont été mises en lumière par Okamoto et al. (2003 ; 2006).

- Okamoto et al. (2003 ; 2006) chez *Arabidopsis thaliana* montre qu'une exposition à du NO_3^- induit une forte induction dans les racines des gènes Nrt 2.1, Nrt 2.2 et Nrt. 3.1 pour les HATS et Nrt 1.1 pour les LATS. Le gène Nrt2.1 chez *Arabidopsis thaliana* (Gansel et al. 2001) serait principalement responsable de l'activité des transporteurs HATS inductibles (Lejay et al. 1999; Zhuo et al. 1999). Morot-Gaudry et al. en 2006 mentionnent également le fait qu'en présence de NO_3^- , l'induction des HATS impliquerait la synthèse de nouveaux transporteurs protéiques.
- La deuxième catégorie de gènes est réprimée par la présence de NO_3^- . Ainsi, la transcription des gènes Nrt2.5 et Nrt1.3 est réduite de 25 à 50% lors d'une alimentation par du NO_3^- (Okamoto et al. 2003).
- Enfin, la troisième catégorie de gènes regroupe ceux qui sont constitutifs. Leur transcription se révèle être indépendante d'une limitation ou d'une exposition à du NO_3^- . Cette catégorie regroupe les gènes Nrt 2.6, Nrt 2.7, Nrt. 3.2 et Nrt 1.2 (Okamoto et al. 2003).

Il semblerait également que le NH_4^+ , produit de la réduction du NO_3^- , inhibe rapidement et réversiblement les transporteurs de type HATS lorsqu'il se trouve à forte concentration (Morot-Gaudry et al. 2006). C'est également le cas lorsque des acides aminés, comme la glutamine, sont présents dans le phloème (Beuve et al. 2004). En effet, en présence de glutamine, l'entrée de NO_3^- et l'expression des gènes Nrt2 codants pour les HATS diminuent.

2.1.2.2. Par modification de la synthèse et de l'activité des enzymes Nitrate Reductase et Nitrite Reductase

La Nitrate Reductase (NR) et la Nitrite Reductase (NiR) sont régulées par des composés véhiculés au sein des sèves ou bien accumulés dans les tissus, tels que les hormones comme les cytokinines ou bien le NO_3^- ainsi que par différents facteurs abiotiques tels que la lumière. Le nitrate est le principal facteur induisant l'expression de la NR (Faure et al. 1991; Stitt 1999; Orea et al. 2005). La lumière induit un effet important sur les enzymes responsables de la réduction des NO_3^- . En effet, Faure et al. ont montré en 1991 que les ARNm des enzymes NR et NiR disparaissaient totalement lorsque les plantes étaient maintenues à l'obscurité pendant 60h. Un cycle de 24h composé de la photopériode et de la nuit suivante permet de restaurer un niveau d'ARNm normal. Les auteurs mentionnent que la lumière est requise pour l'expression des gènes codant pour les enzymes, même en présence de NO_3^- dans la solution.

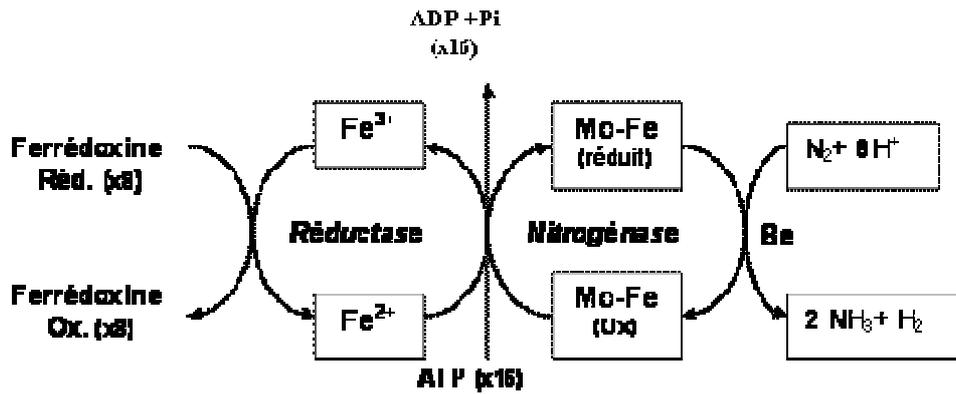


Figure 0.8 Fixation biologique de l'azote par le complexe *Nitrogénase/Hydrogénase*. Pour chaque électron fourni par l'intermédiaire de la réductase à la *nitrogénase* pour la réduction de l'azote il y a consommation de 2 liaisons phosphates riches en énergie (2 ATP). Une molécule de H₂ est formée en même temps que celle de l'ammoniac.

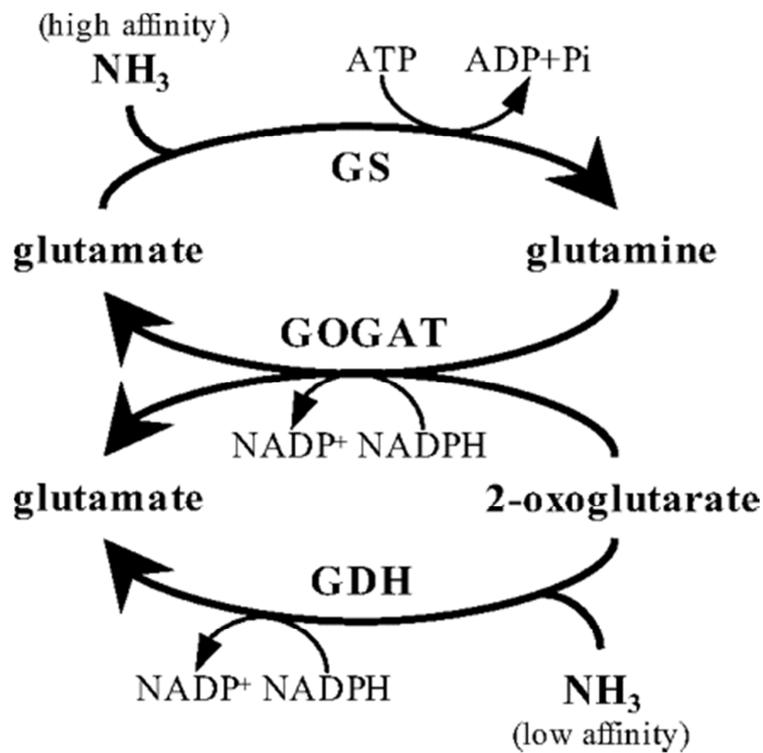


Figure 0.9 Le circuit du métabolisme central de l'azote chez les bactéries entériques. La réaction faisant appel à 3 enzymes permet l'assimilation du NH₄⁺ et la production de la Glutamine et du Glutamate. La GS catalyse la synthèse de la Glutamine. Le glutamate peut être synthétisé par l'action soit de la GS/GOGAT, soit de la GDH, respectivement avec une forte ou faible affinité pour le NH₄. Tiré de Yan 2007.

2.1.2.3. En relation avec la nutrition C

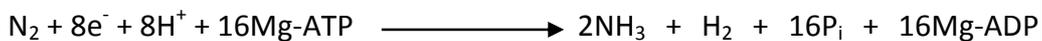
Des études ont montré le fait que la disponibilité en C provenant de la photosynthèse foliaire pouvait agir comme messenger secondaire dans la régulation du prélèvement des nutriments par les racines (azote, phosphate, potassium) (Hermans et al. 2006; Liu et al. 2009). Ainsi, l'expression des transporteurs de nitrate (NRT1.1 et NRT2.1) et d'ammonium (Amt1.1, Amt1.2, Amt1.3) dans les racines d'*Arabidopsis* est régulée et stimulée par le saccharose, indiquant l'importance des assimilats carbonés dans la régulation des systèmes de transports racinaires (Lejay et al. 2003). Plus récemment, une corrélation a été découverte entre l'expression des 2 transporteurs de nitrate induit par le saccharose et la quantité de Glucose-6-P dans les racines (Lejay et al. 2008).

2.2. Fixation de l'azote atmosphérique

2.2.1. Processus et fonction de fixation par l'intermédiaire des nodosités

La fixation symbiotique d'azote atmosphérique est le processus par lequel les nodosités réduisent le N₂ atmosphérique en NH₃. Cette réduction s'effectue grâce à la nitrogénase, enzyme bactérienne présente au sein des bactéroïdes présents dans les nodosités (Mylona et al. 1995).

L'enzyme bactérienne nitrogénase catalyse la réaction suivante :



La nitrogénase existe sous plusieurs formes dont la plus commune est la nitrogénase dépendante du Molybdène. C'est un complexe enzymatique comprenant 2 composés métalloprotéiques : la protéine Fer (dinitrogénase reductase) et la protéine Fer-Molybdène (dinitrogénase) (Figure 0.8) (Mylona et al. 1995; Seefeldt et al. 2009). La nitrogénase catalyse aussi la réduction d'autres substrats que le N₂ comme l'acétylène, l'azide, le cyanide ou encore l'hydrazine (Hu et Ribbe 2011).

Lors de la réaction, le NH₃ produit peut réagir avec un proton H⁺ et former du NH₄⁺. Celui-ci sera alors assimilé dans le cytoplasme des nodosités par les enzymes GS/GOGAT afin de former les acides aminés, comme le glutamate (Figure 0.9) (Mylona et al. 1995; Yan 2007). Le glutamate sera ensuite métabolisé en une forme azotée de transport qui peut varier en fonction des plantes. Ce seront des amides chez les plantes tempérées alors que ce seront des uréides chez les plantes tropicales (Mylona et al. 1995). Ces formes azotées seront ensuite exportées par le xylème au sein de la plante afin d'entrer dans la synthèse des acides aminés et des protéines.

2.2.2. Régulation de l'activité nitrogénase

La fixation symbiotique d'azote est un processus induisant d'importants coûts en C lors de la respiration des nodosités (Day et Copeland 1991; Hartwig 1998). De nombreuses études se sont portées sur les glucides et l'O₂, tous deux substrats de la respiration et possédant un impact sur la nitrogénase. La nitrogénase est une enzyme sensible à l'oxygène et nécessitant des conditions microaérobiques pour son expression et son fonctionnement (Mylona et al. 1995). La nitrogénase peut être dénaturée par la présence d'O₂ (Shah and Brill 1977; Mylona et al. 1995). Or, paradoxalement, l'énergie nécessaire à la réaction catalysée par la nitrogénase provient de processus oxydatifs impliquant une forte demande en O₂. Ces conditions impliquent la présence, au sein des nodosités, d'une barrière de diffusion de l'O₂ permettant une entrée et une disponibilité en O₂ finement régulée au sein des nodosités.

Une faible concentration en O₂ au sein des nodosités active la protéine transmembranaire bactérienne Fix L sensible à l'oxygène, qui induit la transcription des gènes *nif A* et *fix K* intervenant dans la régulation de l'activité nitrogénase. Les protéines NifA et FixK issues de la transcription de ces gènes induisent la transcription d'une série d'autres gènes des familles *nif* et *fix*, codant pour des protéines impliquées dans la structure de la nitrogénase et dans la fixation d'azote (Mylona et al. 1995).

Compte tenu de la forte sensibilité de la nitrogénase à l'O₂, celui-ci est transporté jusqu'aux bactéroïdes par l'intermédiaire d'une hémoprotéine de la famille des nodulines, la leghémoglobine, exprimée exclusivement dans les cellules des plantes infectées par les bactéries fixatrices.

2.2.3. Impact des facteurs environnementaux sur la fixation

De la même manière que les facteurs environnementaux ont un impact sur la mise en place des structures, ils possèdent également des impacts positifs ou négatifs sur les fonctions d'assimilation de l'azote minéral et sur la fixation du N₂ atmosphérique.

2.2.3.1. Impact des facteurs biotiques sur la fixation

Compétition avec les adventices: les légumineuses comme le pois sont connues pour être négativement impactées par la présence des mauvaises herbes (moutarde sauvage *Sinapis arvensis* L. par exemple). Le pois est connu pour être un mauvais compétiteur pour les ressources du sol et lorsqu'il est en concurrence avec les adventices, celles-ci sont plus compétitive pour prélever l'N minéral du sol (Wall et al. 1991; Townleysmith et Wright 1994; Corre-Hellou et Crozat 2005). En conséquence, en présence d'adventices, le pourcentage d'N provenant de la fixation symbiotique d'azote augmente chez le pois afin de subvenir à ses besoins azotés (Corre-Hellou et Crozat 2005).

Microorganismes : les bactéries PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) permettent d'améliorer la croissance racinaire ce qui par le prélèvement de P permettra d'améliorer la symbiose et donc la fixation d'azote. En effet, Zafar et al. (2012) montrent que des lentilles inoculées avec ces bactéries ont une meilleure croissance, et donc un meilleur prélèvement des nutriments comme le P. Il en résulte alors une meilleure fixation d'azote et

une teneur en N des plantes plus importante. D'autres études ont également montré qu'une inoculation mixte comprenant des PGPR, mais également des PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria), responsables d'une meilleure disponibilité du P dans le sol, permet d'obtenir une fixation de N₂ et un apport en P nettement amélioré (Kumar et Chandra 2008).

Ravageurs : la présence dans l'environnement des feuilles ou des racines-nodulées de ravageurs comme les sitones (*Sitona lineatus* L.) occasionne des dégâts sur ces structures. Ces dégâts induisent ainsi une diminution de la fixation symbiotique d'azote chez les plantes. En effet, Doré et Meynard (1995) ont montré une forte corrélation entre la biomasse des nodosités et la fixation symbiotique d'azote : plus la proportion de nodosités au sein du système racinaire est réduite par les sitones et plus la fixation symbiotique d'azote diminue. D'autres études montrent que la diminution de la biomasse foliaire induite par les sitones induit une diminution de la fixation de N₂ (Corre-Hellou et Crozat 2005).

2.2.3.2. Impact des facteurs abiotiques sur la fixation

2.2.3.2.1. Impact du nitrate

Les NO₃⁻ constituent un des principaux facteurs limitants de la fixation d'azote en impactant la nodulation. Streeter (1985a ; b) mentionne que le NO₃⁻ entraîne une suppression de l'activité de fixation d'azote par les racines nodulées chez le soja, le pois et le haricot. Streeter (1988) précise que l'activité de la nitrogénase permettant la fixation d'azote par les nodosités peut être limitée pendant plusieurs jours en présence de NO₃⁻. Waterer et Vessey (1993) confirment cette étude chez le pois en indiquant qu'une application constante de NO₃⁻ à une concentration de 0,2 mol/m³ entraîne une diminution drastique de la fixation d'azote. L'étude réalisée par Kage (1995) précise que des concentrations en NO₃⁻ dans la solution nutritive de 1 mol/m³ et 5 mol/m³ chez *Vicia faba* avaient entraîné une diminution de la fixation d'azote jusqu'à des valeurs respectivement de 1% et 16% par rapport à un contrôle (n'ayant pas reçu de NO₃⁻). Voisin et al. en 2002 confirment ces résultats chez le pois en utilisant différentes concentrations en NO₃⁻ en champ. Ils ont ainsi observé que la part d'azote acquise par la fixation symbiotique était diminuée lorsque la teneur en NO₃⁻ était augmentée alors que la quantité totale d'N acquise (fixation et assimilation) ne varie pas (Voisin et al. 2002a). Les auteurs montraient que l'inhibition de la fixation d'azote par le NO₃⁻ résulterait en un décalage de la mise en place de la fixation symbiotique. Ainsi, cette dernière ne serait mise en place qu'au moment où la concentration en NO₃⁻ serait suffisamment faible et serait l'unique facteur limitant de la fixation symbiotique (Voisin et al. 2002a).

Luciński et al. (2002) indiquent dans leur review que le NO₃⁻ induit une limitation de l'apport en assimilats carbonés aux nodosités en faveur des racines et des parties aériennes afin de participer au métabolisme de réduction des NO₃⁻. Cette limitation en assimilats carbonés agirait alors directement ou indirectement sur la barrière de diffusion des gaz du cortex des nodosités en augmentant sa résistance. Celle-ci bloque l'entrée de N₂ et d'O₂ au sein des nodosités et induit une baisse de la fixation symbiotique d'azote et permet une augmentation de la réduction des NO₃⁻ (Lucinski et al. 2002). La présence de nitrate pourrait également provoquer des changements dans la composition de la sève phloémienne (teneur en

glutamine), perturbant ainsi la diffusion de l'O₂ dans les nodosités et l'activité de la nitrogénase (Neo et Layzell 1997).

Naudin et al. (2011) indiquent qu'une courte exposition des nodosités déjà en place au NO₃⁻ induit une chute brutale de l'activité de fixation symbiotique d'azote chez le pois, quel que soit le stade de développement de la plante au cours duquel le NO₃⁻ est appliqué. Cependant, la chute de la fixation symbiotique s'avère plus forte lorsque l'exposition a lieu pendant le remplissage des graines.

2.2.3.2.2. Impact des facteurs abiotiques autres que les nitrates

D'autres facteurs biotiques, différents du NO₃⁻, possèdent un effet sur les fonctions responsables du prélèvement d'N.

La disponibilité en eau impacte la fixation symbiotique lorsque cette ressource se trouve en déficit, provoquant un état de sécheresse, ou en excès. Guérin et al. (1990) expliquent qu'en condition de déficit important en eau, la fixation symbiotique d'azote chez le haricot décroît fortement. Une privation continue en eau pendant 8 jours inhibe totalement la fixation symbiotique d'azote. Le déficit hydrique conduit à une baisse de la turgescence cellulaire dans les nodosités limitant la diffusion de l'O₂ dans les tissus ce qui induit une diminution de la fixation symbiotique (Guérin et al. 1990). En condition de faible disponibilité en eau, la croissance des plantes et des bactéries est réduite, entraînant une faible fixation symbiotique d'azote (Hungria et Vargas 2000). Un stress hydrique réduit également la synthèse de la leghémoglobine, protéine permettant le transport de l'O₂ (Hungria et Vargas 2000).

La gamme de température dans laquelle les nodosités se développent peut également avoir un impact sur la fixation symbiotique d'azote. Ainsi, de fortes températures possèdent des effets négatifs sur le métabolisme de la plante et sur la fixation symbiotique d'azote en entraînant une chute brutale de l'activité nitrogénase (Hungria et Vargas 2000). De basses températures ont pour effet de retarder ou de diminuer l'activité de fixation symbiotique des nodosités chez *Phaseolus vulgaris* (Rennie et Kemp 1981).

Le pH des sols ou des solutions nutritives doit être compris dans une gamme allant de 6.0 à 7.0 afin d'être optimal pour les bactéries symbiotiques (Hungria et Vargas 2000). Un faible pH est associé à une augmentation de la toxicité causée par l'aluminium et le manganèse, et une baisse de l'apport en calcium, phosphore et molybdène nécessaire à la nitrogénase. Un fort pH entraîne une teneur trop forte en bicarbonate, lequel diminue l'activité nitrogénase (Abdel-Mawly et El-Sayed 1999).

2.2.4. Importance de la souche bactérienne utilisée dans la symbiose

Il existe des variations génétiques pouvant avoir un impact sur la fixation symbiotique entre espèces et entre génotypes de plantes cultivées, mais également en termes de souches bactériennes utilisées lors de la symbiose plante-bactérie.

Laguerre et al. ont étudié en 2007 l'interaction entre deux génotypes de pois avec une quarantaine de souches bactériennes différentes. Les auteurs ont observé un effet fortement significatif des différentes souches bactériennes sur un ensemble de paramètres comme la biomasse ou le nombre de nodosité. Il semble que le génotype végétal utilisé ait également un effet significatif sur la biomasse des nodosités, de la même manière que l'effet conjugué de la souche avec le génotype. Enfin, Laguerre et al. (2007) ont déterminé que certaines souches bactériennes pouvaient entraîner une variation dans la quantité d'N accumulée dans les parties aériennes. Prévost et al. (2009) ont étudié l'effet de différentes souches bactériennes lors de la symbiose avec le soja (*Glycine max*). Ils ont pour cela inoculé du soja avec 2 souches provenant de sol ainsi qu'avec la souche de référence. Des différences en termes de nombre de nodosités, mais également au niveau de la taille des nodosités ont été observées entre les différentes souches employées. Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives dans l'acquisition d'N lorsque l'expérience se déroule à une concentration ambiante en CO₂, une teneur en CO₂ plus élevée provoque chez la souche de référence une acquisition d'N supérieure (Prévost et al. 2009).

Enfin, Laguerre et al. (2012) confirment les résultats précédents en utilisant une collection de 9 souches différentes de la bactérie *Sinorhizobium* sur un génotype de *Medicago truncatula*. Ils ont observé que l'activité de fixation symbiotique d'azote variait en fonction de la souche bactérienne utilisée et l'efficacité de celles-ci dans la fixation symbiotique du N₂.

2.2.5. Complémentarité des 2 voies dans l'acquisition de l'azote

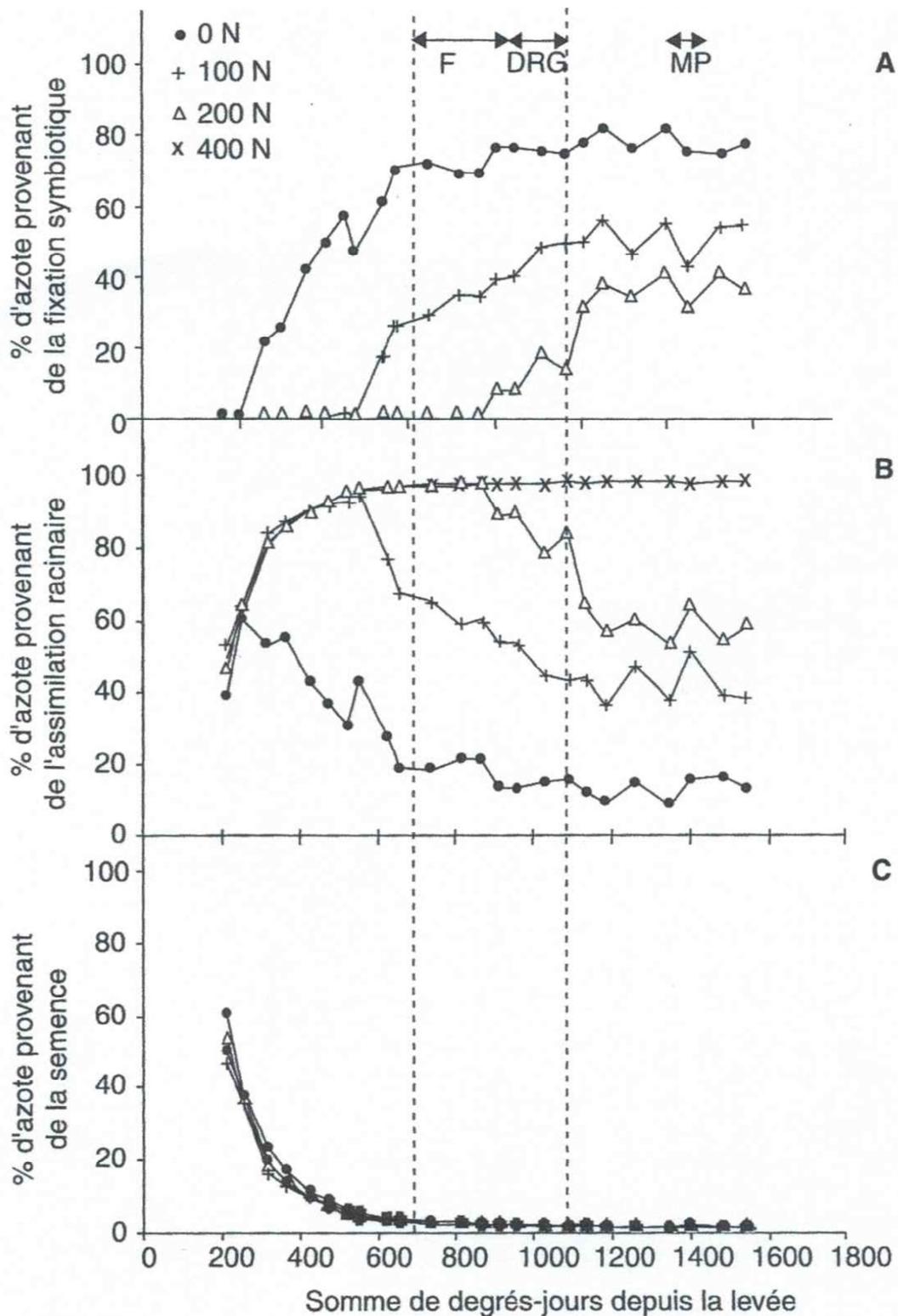
2.2.5.1. Relation entre l'acquisition d'N et la croissance : notion de courbe de dilution de l'azote dans la biomasse

La teneur en N des parties aériennes d'une plante varie en fonction de son stade de développement. L'analyse de ces variations de teneurs chez des graminées fourragères au cours de leur croissance a permis de formuler une loi de dilution de l'N dans la matière sèche (Salette et Lemaire 1981). Selon cette loi de dilution, la teneur en azote est corrélée négativement à la production de biomasse et s'écrit selon l'équation suivante :

$$\%N = \alpha \cdot (MS)^{-\beta}$$

Où %N représente la teneur en azote des parties aériennes de la plante, et MS la biomasse sèche des parties aériennes. Les coefficients α et β sont des paramètres variant entre les espèces végétales.

Cette relation, d'abord mise en évidence chez les graminées dont les céréales (Salette et Lemaire 1981), a été transposée chez les légumineuses à graines dont le pois (Ney et al. 1997). Pour le pois, les coefficients sont $\alpha=5.08$ et $\beta=0.32$. Lemaire et Salette (1984) ont mis en évidence une relation allométrique lorsque la nutrition azotée est non limitante, s'établissant entre la croissance d'une plante et sa teneur en azote totale. Chez une plantule, la teneur en N est élevée dans les différents compartiments. Au cours de la croissance de la plante, la biomasse augmente mais la teneur en azote total diminue résultant en une



dilution de l'N dans les compartiments. Chez le pois, lors du stade de remplissage des graines, en fin de cycle, l'accumulation d'N devient proportionnelle à la croissance, visible par un plateau sur la courbe de dilution de l'azote (Ney et al. 1997; Salon et al. 2001). On dit alors que le phénomène de dilution de l'N au sein de la biomasse ne se fait plus.

La courbe de dilution critique définit une courbe optimum de la nutrition azotée d'une plante en fonction de sa croissance au cours du temps. Lorsqu'une teneur en N se trouve au-dessus de cette courbe de dilution, il est dit que la nutrition N est supra-optimale (consommation de luxe) signifiant que la plante acquiert plus d'N qu'il ne lui est nécessaire. En revanche, si la teneur en N se situe sous la courbe de dilution, la nutrition azotée est sub-optimale, la plante se trouve en situation de carence en N et celui-ci est un facteur limitant de la croissance.

2.2.5.2. Complémentarité des 2 voies au cours du temps

Comme cela a été présenté précédemment, les légumineuses ont la particularité de posséder deux voies d'acquisition d'N : l'assimilation de l'N minéral et la fixation symbiotique. La contribution de chacune des 2 voies varie au cours du temps en fonction du développement de la plante, de la mise en place des organes et de la disponibilité en N minéral comme les NO_3^- dans le sol. En effet, lorsque la disponibilité en N minéral dans les sols est suffisante, l'assimilation de l'N minéral devient majoritaire, et remplace ainsi la fixation symbiotique (Voisin et al. 2002a; Voisin et Salon 2005).

- Au tout début de son cycle, la plantule possède une croissance basée essentiellement sur les réserves protéiques provenant de la graine (60%) ainsi que sur l'assimilation de l'N minéral du sol (40%). Dans le cas où la disponibilité en N minéral dans le sol est faible (inférieure à $\sim 60 \text{ kg N.ha}^{-1}$) ou nulle (culture sans N minéral apporté), l'acquisition de l'N est réalisée par l'intermédiaire de la fixation symbiotique.

- Ensuite, la contribution de la fixation symbiotique devient majoritaire, et représente jusqu'à 80% de l'apport en N en fin de phase végétative. Elle se réalise en défaveur de l'assimilation de l'N minéral qui ne représente plus que 20%. Le système est cependant réversible. En effet, en cas d'ajout d'N minéral dans le sol, la contribution de l'assimilation de l'N minéral devient prépondérante, inversant les proportions de chacune des voies de nutrition N (Voisin et Salon 2005). Lorsque la disponibilité en N minéral est supérieure à 380 kg N.ha^{-1} , la fixation de l'N atmosphérique est totalement inhibée, et l'assimilation de l'N minéral devient la seule voie de nutrition N (Figure 0.10) (Voisin et al. 2002a).

Après floraison, l'acquisition de l'N diminue du fait de la compétition pour le carbone qui s'opère entre les parties aériennes et les 2 voies de nutrition azotée. La fixation symbiotique étant très sensible aux facteurs environnementaux, celle-ci peut diminuer au cours du cycle, en faveur de l'assimilation d'N minéral.

Jusqu'au début de la phase de remplissage des graines, les plantes reposant sur des modes de nutrition azotés différents ont des niveaux de photosynthèse, une croissance et un prélèvement d'N peu différents (Voisin et Salon 2005).

Lors de la phase de remplissage des graines, en fin de cycle, le prélèvement d'N devient plus faible. En condition de faible disponibilité en N minéral, l'absorption de celui-ci diminue, alors que la fixation d'azote se stabilise. Cependant, la fixation est moins performante que l'absorption des NO_3^- , cette dernière étant associée à une photosynthèse plus élevée. Ainsi, en condition de disponibilité en NO_3^- suffisante, la contribution de l'absorption des NO_3^- serait majoritaire, permettant ainsi un retard de la sénescence foliaire et une durée de remplissage des graines plus élevés (Salon et al. 2001). La forte compétition pour les assimilats au cours du remplissage des graines décroît sévèrement l'activité des nodosités. Suite à la demande importante en N lors du remplissage des graines, on observe une remobilisation de l'N des feuilles. En effet, la Rubisco (enzyme responsable de la photosynthèse) représente 30 à 60% des protéines disponibles au sein de la plante. Cependant, la sénescence de la plante entraîne la remobilisation de l'N des feuilles, et la diminution de la photosynthèse due à la dégradation de la Rubisco. Ainsi, l'échelonnement des contributions de l'absorption des NO_3^- et de la fixation d'azote au cours du cycle de la plante montre que ces dernières sont complémentaires pour l'acquisition de l'N.

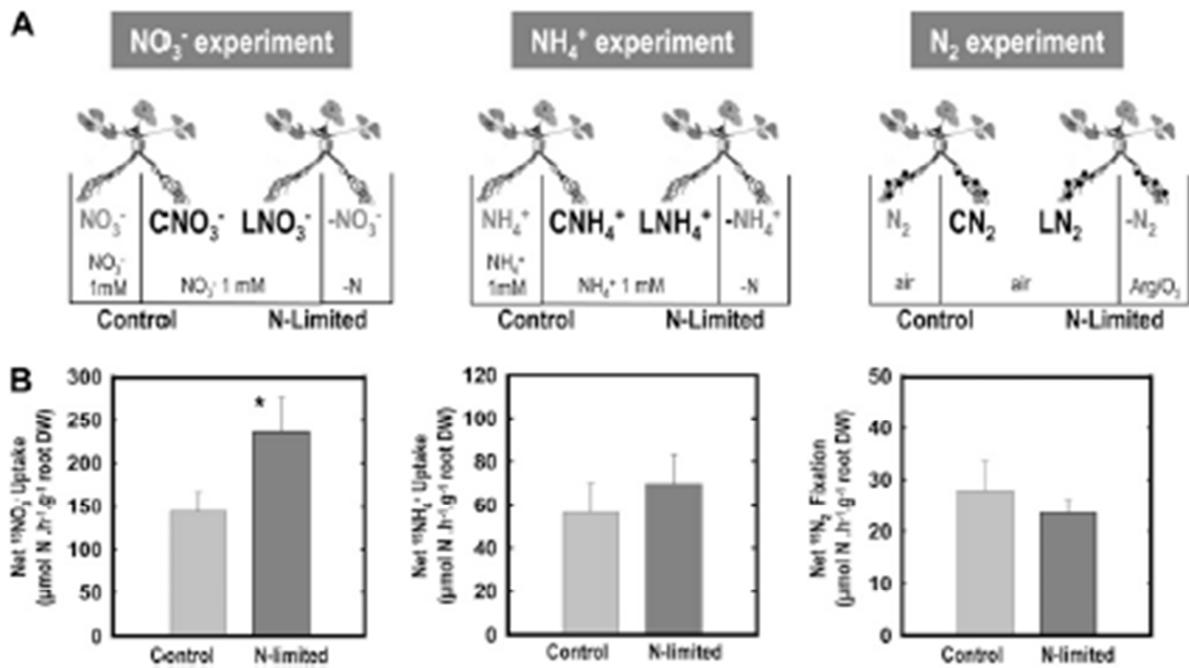


Figure 0.11 A. Dispositif split-root décrit et utilisé par Ruffel et al. 2008 pour analyser la réactivité des différentes voies d'acquisition de l'azote (NO₃⁻, NH₄⁺ et N₂) suite à une limitation en N pendant 4 jours chez des plantes cultivées en hydroponie. La limitation en N a été provoquée en transférant une partie du système racinaire dans une solution sans azote (voie d'acquisition de l'azote : NO₃⁻, NH₄⁺) ou en supprimant le N₂ disponible dans l'atmosphère racinaire par utilisation d'Argon/O₂ (voie d'acquisition de l'N : N₂). B. Acquisition de NO₃⁻, NH₄⁺ et N₂ chez les plantes contrôles et traitées après 4 jours de traitement.

3. Interactions entre les composantes structurales et fonctionnelles responsables du prélèvement d'azote en condition de modification de l'environnement C ou N

Différents facteurs biotiques ou abiotiques, entraînant soit une raréfaction d'un élément, la destruction d'un organe ou bien une modification du métabolisme ou des fonctions de prélèvement de la plante peuvent moduler la disponibilité en carbone via la photosynthèse ou bien la disponibilité en azote pour les plantes. Un grand nombre de recherches ont visé à étudier l'effet de ces modifications de l'environnement sur les végétaux et à comprendre comment la plante s'adapte à ces nouvelles conditions et quelles réponses elle met en place.

3.1. Réactivité des 2 voies d'acquisition d'N en réponse à une modification de l'environnement N

Lorsque l'N devient limitant dans l'environnement des racines, la plante développe des réponses adaptatives lui permettant de modifier l'activité de prélèvement de l'N par le reste de son système racinaire. Ruffel et al. (2008) et Jeudy et al. (2010) ont mis en place sur *Medicago truncatula* des expérimentations utilisant des dispositifs split-root, permettant de séparer les racines en 2 parties (Figure 0.11). Ces dispositifs permettent d'induire une perturbation locale sur l'une des parties du système racinaire, par exemple de réduire la disponibilité azotée ou bien de moduler d'autres facteurs environnementaux abiotiques ou biotiques. Ils sont ainsi un outil de choix pour étudier de quelle manière la plante perçoit une contrainte au niveau tellurique, comment elle réagit (de manière systémique ou localisée) et quelle stratégie adaptative elle met en place.

En condition de limitation dans l'acquisition d'N minéral par les racines, la réponse de la plante diffère selon la source d'N après seulement 4 jours de perturbation N (Ruffel et al. 2008).

3.1.1. Voie de l'absorption d'azote minéral

Lorsque la source d'N est le NO_3^- , il y a compensation par la plante pour l'acquisition d'N en réponse à la perturbation (Figure 0.11). Celle-ci acquiert significativement plus de NO_3^- par les racines de la plante n'ayant pas subi de privation, comparé au contrôle, ce qui n'est pas le cas avec le NH_4^+ . La plante est capable d'un rétrocontrôle positif sur la régulation. Ces résultats sont en accord avec les recherches effectuées chez *Arabidopsis thaliana* (Gansel et al. 2001). Cette compensation des plantes pour restaurer leur statut azoté s'expliquerait par la régulation rapide des transporteurs de NO_3^- (Ruffel et al. 2008).

Jeudy et al. (2010) ont poursuivi cette analyse en montrant qu'après 14 jours de limitation en N, les plantes qui reposent sur le NO_3^- comme seule source d'azote continuent de compenser la perturbation liée à une limitation localisée en azote en augmentant l'acquisition de NO_3^- et la biomasse des racines de la partie du système racinaire non limité en NO_3^- .

3.1.2. Voie de la fixation atmosphérique

Ruffel et al. (2008) ont observé une réponse différente des plantes comparées à celle avec du NO_3^- lorsque la source d'N est le N_2 atmosphérique (Figure 0.11). En situation de limitation en N_2 , les plantes reposant pour leur alimentation en azote uniquement sur le N_2 ne restaurent pas leur statut azoté après 4 jours de traitement. En effet, la fixation symbiotique du N_2 reste similaire à celle des plantes contrôle pour les plantes soumises à la perturbation. Les résultats de Ruffel et al. (2008) suggèrent que l'activité spécifique de la fixation symbiotique du N_2 ne pourrait être augmentée chez les plantes contrôle, expliquant l'impossibilité des plantes soumises à la limitation en N de compenser celle-ci par une augmentation de leur fixation. L'hypothèse avancée est alors que l'activité spécifique de fixation symbiotique fonctionne à un niveau maximum chez un sauvage limité en N (Ruffel et al. 2008). Ainsi, le coût en carbone de la nodulation, ainsi que le flux de carbone alloué aux nodosités pouvaient être des facteurs limitant l'activité spécifique de fixation d'N ainsi que son accumulation (Bacanawo et Harper 1997; Salon et al. 2001; Bourion et al. 2007). Voisin et al ont montré en 2007 que l'acquisition d'N était étroitement liée à la croissance de la plante. Lorsque l'apport en N est inférieur à la demande, la croissance des parties aériennes ralentit, permettant un meilleur apport en carbone aux parties souterraines (Voisin et al. 2003). Ceci permettra d'induire une augmentation de la croissance et de l'activité des racines et des nodosités afin d'améliorer l'acquisition d'N et de subvenir aux besoins azotés (Voisin et al. 2007).

De la même manière que pour le NO_3^- , Jeudy et al. (2010) ont analysé la réponse des plantes fixatrice du N_2 à long terme, soit après 14 jours de traitement. Lorsqu'une partie du système racinaire est privé de N_2 , remplacé par de l'argon, la biomasse et la teneur totale en N de la plante sont réduits de 20%. Après 14 jours de traitement, Jeudy et al. (2010) observent une augmentation de la fixation symbiotique de $^{15}\text{N}_2$ de l'ordre de 70% par rapport au contrôle. Ceci démontre l'existence d'un système de compensation de la fixation symbiotique du N_2 par les racines chez des plantes fixatrices limitées en N bien que plus tardive que celle des plantes assimilant le NO_3^- . Afin de savoir si cette régulation à long terme faisait intervenir une modification structurale (formation ou croissance des nodosités) ou fonctionnelle (variation de l'activité spécifique de fixation du N_2), les auteurs ont mesuré l'activité de fixation symbiotique de N_2 par unité de biomasse de nodosité. Leurs résultats montrent que l'activité spécifique de fixation symbiotique ne varie pas entre le contrôle et les plantes subissant la privation en N. La réponse des plantes à la privation en N induit une augmentation de la croissance des nodosités (Jeudy et al. 2010) qui résulte dans un premier temps d'une augmentation de la biomasse des nodosités pré-existantes (issues d'une précédente vague de nodulation), puis de l'initiation et du développement d'une nouvelle vague de nodosités (Jeudy et al. 2010).

Des recherches ont été réalisées chez *Medicago truncatula* afin d'étudier l'impact de différentes souches bactériennes sur la réponse des plantes à une limitation de la capacité à fixer l'N. Laguerre et al. (2012) ont pour cela utilisé le système de split-root semblable à celui de Ruffel et al. (2008) et Jeudy et al. (2010). Les auteurs ont mis en place une limitation en N pendant 4 jours par remplacement du N₂ de l'environnement racinaire par de l'Argon sur la moitié du système racinaire. Sur l'autre moitié des racines, les auteurs ont comparé l'impact de 2 souches fixatrices sur la réponse des plantes à la limitation en N: la souche bactérienne de référence RCR2011 et une souche plus efficiente md4. Ils ont ainsi observé qu'en condition limitante en N ou contrôle, il y avait un effet positif significatif de la souche bactérienne sur le niveau d'activité de fixation symbiotique d'azote par les nodosités, l'acquisition d'N par les plantes, et la biomasse de nodosités. A court terme, l'acquisition totale d'N diminue de 54% et 41% respectivement pour la souche de référence RCR2011 et la souche md4. Quelle que soit la souche bactérienne utilisée, aucune variation de l'activité spécifique de fixation n'a été observée suite à la limitation en N, ne permettant pas de compenser celle-ci. Cependant, les auteurs ont observé une légère augmentation du poids moyen d'une nodosité uniquement chez les plantes inoculées avec la souche md4. Les auteurs ont aussi réalisé une étude à long terme de la réponse des plantes à une limitation de l'N par utilisation d'une souche bactérienne appliquée de manière localisée sur une partie des racines, souche nod+fix- (permettant la formation de nodosités mais pas la fixation symbiotique). Sur l'autre moitié des racines, les auteurs ont utilisé 2 souches bactériennes différentes pleinement fixatrices. On observe alors une compensation de la limitation en N, provoquée par l'utilisation de la souche bactérienne non fixatrice, induite par une augmentation de plus de 60% de la fixation symbiotique d'azote par rapport au contrôle sur la moitié des nodosités en présence des bactéries normalement fixatrices. L'augmentation de la fixation symbiotique d'azote était uniquement due à une augmentation du nombre de nodosités et du poids moyen d'une nodosité. Les auteurs ont montré que la réponse à la limitation en N était plus importante lors de l'utilisation d'une des souches comparée à la seconde. Ainsi, bien que les 2 souches bactériennes utilisées soient qualitativement similaires, ces résultats montrent l'importance du choix de la souche bactérienne afin d'obtenir une réponse adaptative optimale des plantes face à une limitation en N.

3.2.Modification de l'environnement C

3.2.1. Effet d'un ajout d'assimilats carbonés sur l'acquisition d'N et la croissance des plantes

Le fait que l'activité spécifique des nodosités ne peut être augmentée en cas de déficit azoté a conduit Ruffel et al. (2008) à émettre l'hypothèse que ceci pourrait résulter d'une limitation par la disponibilité en carbone. D'une part l'N absorbé puis réduit au niveau du système racinaire nodulé sous forme de NH₄⁺ est ensuite associé à des squelettes carbonés pour synthétiser les acides aminés. D'autre part la formation des nodosités et leur

fonctionnement représentent le puits le plus important pour le C (Voisin et al. 2003b, 2003c). Une plus grande disponibilité en C pourrait permettre une amélioration de l'acquisition d'N par augmentation de la croissance des racines et/ou des nodosités ainsi que leur activité (Voisin et al. 2007), des degrés de priorité importants pour ces organes ayant été démontrés en début de cycle en comparaison des parties aériennes. Une augmentation de la disponibilité en C par ajout de saccharose entraîne une augmentation de la quantité d'assimilats carbonés au sein des racines, majoritairement sous forme de glucose. Cependant, cet apport de saccharose et d'assimilats carbonés n'entraîne pas d'augmentation de l'assimilation de NH_4^+ par les racines (Ruffel et al. 2008). Par contre, en condition de limitation en N, les nodosités demeurent le puits le plus important de C au sein de la plante et l'allocation du C varie afin de privilégier les racines nodulées toujours apte à acquérir l'N (Jeudy et al. 2010).

3.2.2. Effet d'une augmentation de la teneur en CO_2 sur la croissance et l'acquisition d'N chez les plantes et chez les légumineuses

La disponibilité en assimilats carbonés au sein de la plante dépend de la photosynthèse, qui permet la conversion du CO_2 fixé en composés utilisés pour la synthèse des acides aminés. Par ailleurs, la photosynthèse dépend de la lumière et de la concentration en CO_2 . Il est donc possible qu'une modification de l'un de ces facteurs (et non la quantité d'assimilats carbonés au sein des parties souterraines) modulant ainsi la photosynthèse, impacterait directement l'acquisition d'azote.

De nombreuses études se sont portées sur l'impact d'une augmentation de la concentration en CO_2 sur l'acquisition d'azote, et notamment sur la fixation symbiotique du N_2 . Il semblerait qu'une augmentation de la concentration en CO_2 pendant 6 jours pourrait provoquer une augmentation de 18% de l'activité nitrogénase (Cen et Layzell 2004) et donc de la fixation symbiotique d'azote (Rogers et al. 2009). Ces résultats ont été confirmés par Das et al. (2010) qui ont de plus montré une interaction entre la concentration en CO_2 et la température. Lam et al. (2012) montrent pour la première fois en champ qu'une augmentation de la concentration en CO_2 chez le soja, induisait une augmentation de la teneur en azote provenant de la fixation symbiotique.

Cependant, les résultats montrent le fait que cette augmentation de la fixation symbiotique d'azote serait due à une augmentation de la biomasse des structures des nodosités et non à une augmentation de l'activité de fixation symbiotique des nodosités (Hartwig 1998; Zanetti et al. 1998; Cen et Layzell 2004; Rogers et al. 2009).

L'augmentation de la concentration en CO_2 n'a pas d'effet sur la biomasse des parties aériennes du haricot *Phaseolus vulgaris*, ou sur celle des racines au cours de la germination (Haase et al. 2007). Cependant on observe une légère augmentation de ces biomasses entre 12 et 21 jours après le semis. L'accroissement de la concentration en CO_2 peut conduire à une diminution de la concentration totale en N de la plante, et plus précisément dans les racines et dans les parties aériennes. La concentration totale de composés phénoliques, qui permettent d'initier la nodulation se trouvant dans les exsudats racinaires augmente de 167% lorsque la concentration en CO_2 est doublée comparée à la concentration en CO_2 ambiante (Haase et al. 2007). Chez le soja, une élévation de la concentration en CO_2 d'un facteur 2 accroît de 63%

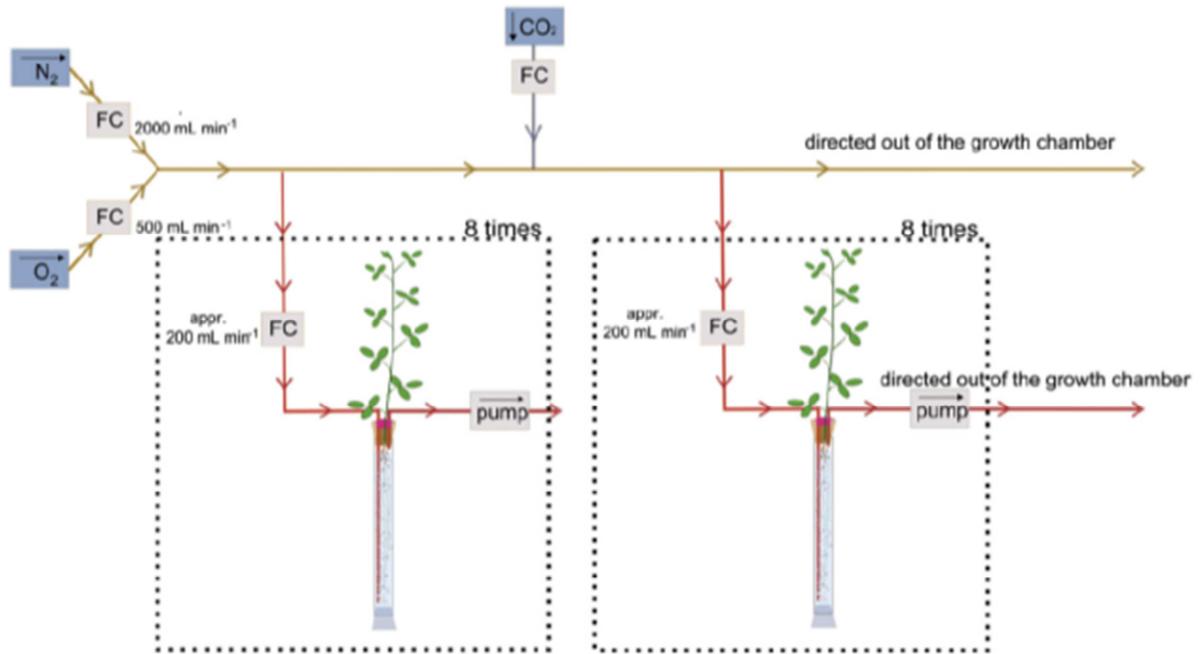


Figure 0.12 Dispositif expérimental décrit et utilisé par Fischinger et al. 2010 pour l'application à long terme aux racines nodulées d'un mélange N_2/O_2 (80/20 ; v/v) à différentes concentrations de CO_2 . La partie dans l'encadré en pointillées a été répétée 8 fois. L'entrée de gaz provient de bouteilles de gaz sous pression. Les gaz N_2 et O_2 sont sans CO_2 ou H_2 . FC : contrôleur de flux.

la biomasse des nodosités et de 50% leur nombre comparé à la concentration ambiante en CO₂. La biomasse des parties aériennes augmente de 30%, et l'acquisition de C des parties aériennes de 33%. Cependant, Prévost et al. (2009) observent chez le soja une augmentation de la concentration en N de 78% dans les parties aériennes, quand Haase et al. (2007) en observaient une diminution.

Chez la luzerne *Medicago sativa* Fischinger et al. (2010) ont isolé le compartiment souterrain pour y faire varier la concentration en CO₂ (Figure 0.12). Les auteurs ont utilisé un traitement consistant en l'utilisation d'une teneur en CO₂ ambiante, et d'une teneur en CO₂ enrichi (7 fois la concentration ambiante en CO₂). Après seulement 3 semaines de traitement, la teneur en N des nodosités, l'activité de fixation symbiotique d'azote, et la croissance des nodosités augmentent dans le traitement enrichi en CO₂. Il semble également que la concentration en acides aminés (asparagine) et en acides organiques augmentent au sein des nodosités et dans la sève xylémienne à destination des parties aériennes (Fischinger et al. 2010). Les auteurs montrent en revanche que chez des plantes mutées, possédant des nodosités inefficaces, l'ajout de CO₂ dans le milieu n'a aucun effet (Fischinger et al. 2010). Ces résultats suggèrent que la fixation du CO₂ par les nodosités est essentielle pour avoir une fixation symbiotique d'azote efficace.

Kirschbaum en 2011 publie une revue synthétisant l'ensemble des effets connus d'une augmentation de la photosynthèse sur la croissance des plantes. En améliorant la photosynthèse, on améliore la disponibilité en carbone ce qui permet en moyenne d'augmenter le taux de croissance relative des plantes d'environ 10%. Cette augmentation de la croissance peut se révéler plus importante lors des phases exponentielles de croissance du début de cycle d'une plante et lorsque les plantes sont non limitées en nutriments. Cependant même lorsque la disponibilité en assimilats carbonés est plus élevée, la croissance des plantes, peut être limitée par d'autres facteurs comme la disponibilité en nutriments en exacerbant par exemple les limitations provoquées par le manque de nutriments (Kirschbaum 2011).

A forte teneur en CO₂, les auteurs s'accordent sur la possibilité d'augmenter la fixation symbiotique d'azote, mais essentiellement par un développement des structures (augmentation de la biomasse des nodosités, de leur nombre). En revanche, peu d'études ont permis de montrer un impact d'une forte teneur en CO₂ sur l'activité de fixation symbiotique d'azote. Enfin, la fixation symbiotique est très sensible aux stress environnementaux, pouvant résulter en une déficience dans l'acquisition de l'azote. Lorsqu'un des nutriments indispensables à la croissance de la plante vient à manquer (azote, phosphore, potassium), une augmentation de la teneur en CO₂ aggraverait les symptômes et l'état de carence au sein des plantes.

4. Les mutants hypernodulants

De nombreux mutants hypernodulants ont pu être induits par exposition à l'Ethyl Méthyl Sulfonate, mutation impactant l'un des gènes intervenant dans l'Autorégulation de la Formation des Nodosités (AON) comme décrit précédemment. Chez le pois, ces gènes sont *SYM28*, *SYM29* et *NOD3*.

4.1. Caractéristiques

Hypernodulation et coût important en C pour la formation des nodosités: un mutant hypernodulant possède une quantité de 5 à 10 fois plus importante de nodosités par rapport au sauvage et ses nodosités sont de petites tailles (Duc et Messenger 1989; Sagan et Duc 1996). Etant donné que la formation et le fonctionnement des nodosités entraînent un coût en carbone très important, qui se fait en compétition avec les racines et les parties aériennes (Hacin et al. 1997; Voisin et al. 2003a; Voisin et al. 2007), l'hypernodulation peut induire des coûts en C supérieurs à ceux chez un sauvage.

Ceci explique les croissances déprimées des parties aériennes et des racines observables chez les mutants hypernodulants (Sagan et al. 1993; Sagan et Duc 1996; Wopereis et al. 2000; Voisin et al. 2003b; Bourion et al. 2007; Voisin et al. 2007; Novak 2010; Voisin et al. 2013). La croissance des racines de mutants hypernodulants de pois sont réduites de 60 à 80% comparé au sauvage (Voisin et al. 2013). Alors que les racines et les nodosités peuvent être complémentaires pour l'acquisition d'azote, ces structures sont antagonistes pour l'utilisation du carbone : plus la biomasse des nodosités augmente, et plus celle des racines devient faible.

Fasciation chez *SYM28* (P64) : Les mutants hypernodulants mutés sur le gène *SYM28* intervenant dans l'AON, montrent une croissance de la tige fasciée, réduite avec de courts entrenœuds entre les nœuds florifères et la déformation de la tige (Duc et Messenger 1989; Sagan et Duc 1996; Krusell et al. 2011).

Tolérance au Nitrate : La formation des nodosités et l'activité de fixation symbiotique sont inhibées par le nitrate (Streeter 1985a, 1985b; 1988; Waterer et Vessey 1993; Kage 1995; Voisin et al. 2002a). Cependant les mutants hypernodulants possèdent le caractère Nts (Nitrate-Tolerant Nodulation) permettant la formation de nodosités en présence de nitrate (Jacobsen et Feenstra 1984; Carroll et al. 1985; Duc et Messenger 1989; Sagan et Duc 1996). Cela suggère que la régulation de la formation des nodosités par l'AON et par le nitrate partagent un mécanisme commun.

Fixation symbiotique d'azote : Les mutants hypernodulants ont une activité spécifique de fixation symbiotique inférieure à celle d'un sauvage comme l'ont montré Carroll et al. (1985) chez le soja ou Jeudy et al. (2010) chez *Medicago*. Cela pourrait être dû à une compétition pour le C entre la formation en excès des nodosités induisant un coût en C important et l'activité spécifique de fixation symbiotique (Voisin et al. 2007).

Voisin et al. (2007) et Bourion et al. (2007) ont étudié chez le pois les effets de la variabilité génétique sur la fixation symbiotique et l'accumulation d'azote en comparant 5 génotypes différents de *Pisum sativum*, dont 2 mutants hypernodulants. Les auteurs montrent

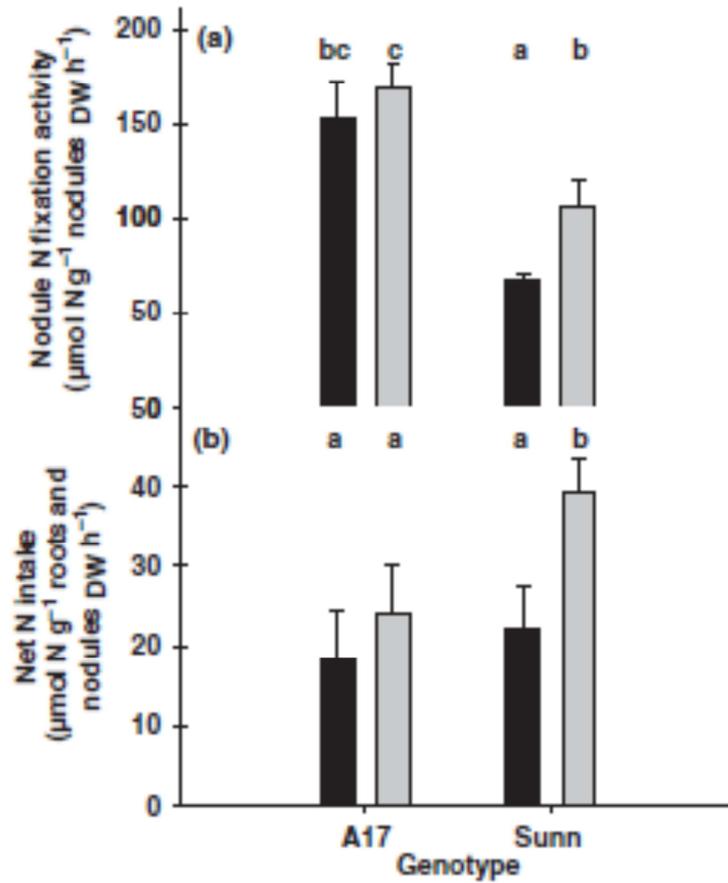


Figure 0.13 Impact d'une limitation en azote provoquée par l'utilisation d'Argon/O₂ au sein d'un dispositif en split-root sur a) l'activité spécifique de fixation du N₂ et b) sur l'acquisition d'azote chez un génotype sauvage de *Medicago truncatula* A17 (noir) et un mutant hypernodulant *SUNN* (gris). Tiré de Jeudy et al. 2010.

une différence du nombre de nodosités et d'accumulation d'N entre génotypes. Des génotypes hypernodulants ont une acquisition d'N inférieure à celles de génotypes sauvages malgré une plus forte nodulation, se déroulant plus précocement dans le cycle de la plante. Cependant, chez *Medicago*, une plus faible activité de fixation symbiotique associée à une biomasse de nodosités plus importante que chez le sauvage permet une fixation symbiotique d'azote similaire entre un mutant hypernodulant et le sauvage (Jeudy et al. 2010).

4.2. Réactivité à un stress

Jeudy et al (2010) ont réalisé une série d'expériences chez *Medicago truncatula*, visant à caractériser la réponse d'un hypernodulant à une privation temporaire et/ou localisée de ressource azotée. Confirmant les résultats de Carroll et al. (1985) et Schuller et al. (1988), Jeudy et al. ont pu montrer qu'après 4 jours de privation en N, un hypernodulant *SUNN-2* (orthologue de *SYM29*) augmentait significativement la quantité d'N fixée symbiotiquement comparé à un hypernodulant non limité (Figure 0.13). Chez le génotype sauvage, la privation d'azote n'engendre pas d'augmentation significative de la quantité d'N fixée comparée au non carencé. De plus, la quantité d'N accumulée d'un hypernodulant carencé est supérieure à celle du sauvage également carencé. Jeudy et al. (2010) ont également montré qu'un hypernodulant limité en azote pouvait augmenter significativement son activité fixatrice de N₂ comparé à un hypernodulant non limité bien que restant inférieure à celle d'un sauvage limitée en azote.

Ces résultats indiquent que le mutant hypernodulant possède potentiellement une réactivité plus grande à une modification du statut N de la plante qu'un sauvage chez lequel l'activité spécifique de fixation pourrait fonctionner à un niveau maximum. Afin de tester l'hypothèse où l'activité spécifique de fixation serait limitée par la disponibilité en C (Ruffel et al. 2008), cette dernière pourrait être augmentée par l'utilisation d'une teneur élevée en CO₂ permettant d'augmenter la photosynthèse foliaire. L'utilisation des mutants hypernodulants pour vérifier cette hypothèse représenterait un outil intéressant. Leur réactivité au stress pourrait être alors améliorée en situation de forte disponibilité en C. On pourrait observer une plus forte augmentation de l'activité de fixation symbiotique chez un hypernodulant en condition de carence en N, atteignant un niveau similaire à celui d'un génotype sauvage. Associée à une biomasse de nodosité fortement supérieure chez un hypernodulant comparé à un sauvage, la fixation symbiotique du mutant pourrait alors être supérieure à celle du sauvage.

RESULTATS

1 Problématique

Par leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique (N_2), les légumineuses présentent la particularité de produire des graines riches en protéines, en l'absence de fertilisants azotés. Ces cultures présentent de ce fait un intérêt environnemental fort dans les systèmes de culture. Chez les légumineuses, le prélèvement de l'N se produit par deux voies d'assimilation avec d'une part l'assimilation de l'N minéral par l'intermédiaire de racines, ayant une activité de prélèvement des NO_3^- ; d'autre part, par fixation du N_2 atmosphérique par l'intermédiaire d'une symbiose avec la bactérie fixatrice du sol du genre *Rhizobium*. Cette symbiose induit la formation d'organes spécifiques, les nodosités, dans lesquelles a lieu la fixation du N_2 . Les deux voies d'acquisition de N sont complémentaires pour l'acquisition de l'N, la fixation du N_2 étant remplacée par l'assimilation de l'N minéral en présence de NO_3^- (Voisin et al. 2002b; Lucinski et al. 2002; Bollman et Vessey 2006). Néanmoins, ces 2 voies sont antagonistes pour l'utilisation du C ; la formation et le fonctionnement de ces nodosités nécessite en effet un apport d'assimilats carbonés provenant de la photosynthèse (Layzell et al. 1981; Walsh et al. 1987; Vance et Heichel 1991; Hacin et al. 1997; Voisin et al. 2003a; 2007), apport entrant en compétition avec celui qui est nécessaire au développement, la croissance et le fonctionnement du système racinaire (Voisin et al. 2002a). A l'échelle de la plante, le nombre de nodosités est régulé par un processus d'"autorégulation de la nodulation" (Reid et al. 2011; Mortier et al. 2012) et ajusté aux besoins en N pour la croissance (Voisin et al. 2010).

Malgré la présence de ces 2 voies complémentaires pour l'acquisition d'azote par la plante, la nutrition azotée demeure aujourd'hui un facteur limitant du rendement et de la teneur en protéines du pois. Ceci résulte d'une part du fait que la fixation symbiotique du diazote atmosphérique au sein des nodosités est plus sensible aux facteurs environnementaux que l'assimilation de l'azote minéral du sol par les racines. Ainsi, la fixation symbiotique peut être limitée par des stress biotiques (maladies, ravageurs) ou abiotiques (stress hydrique, baisse des teneurs en O_2 lors des compactations du sol) et induire une carence en N temporaire et/ou localisée, en l'absence d'azote minéral dans le milieu.

Les Sitones, *Sitona lineatus* L. ou le champignon *Aphanomyces euteiches*, conduisant à la pourriture des racines, sont les ravageurs majeurs du pois protéagineux (Dore et Meynard 1995; Corre-Hellou et Crozat 2005; Mathesius 2009). Ces stress biotiques induisent des dommages sur les racines et/ou les nodosités, pouvant probablement réduire leur capacité de fixation (Gerard 2002). De nombreuses études ont ainsi montré que la fixation symbiotique d'azote diminue lors d'une attaque de sitones (Murray et al. 1996; Corre-Hellou et Crozat 2005; Lohaus et Vidal 2010). Cependant, l'impact d'une perte d'une partie du système racinaire sur la fixation d'azote et la croissance des plantes en réponse à ce stress ont été relativement peu étudiés et demeurent inconnus.

De récentes études ont analysé la réponse adaptative des légumineuses à une carence en N temporaire et/ou localisée. Ruffel et al. (2008) et Jeudy et al. (2010) ont utilisé la technique du « split-root » chez *Medicago truncatula* permettant la séparation du système racinaire en 2 groupes distincts, et la mise en place d'une perturbation locale et/ou temporaire

sur l'un des 2 groupes racinaires. Les auteurs ont ainsi induit, par utilisation d'un milieu sans N_2 , une perte de fixation des nodosités d'une partie du système racinaire (Jeudy et al. 2010).

Les nodosités présentes sur le reste du système racinaire, bien qu'efficaces, ne montrent pas d'augmentation de l'activité spécifique de fixation des nodosités (prélèvement d'N par unité de biomasse), ne permettant pas de compenser l'absence de fixation d'une partie des racines nodulées. La fixation de N_2 décroît ainsi chez les plantes stressées en comparaison aux plantes contrôles. Ces résultats sont différents de ce qui a été observé lors de l'utilisation du NO_3^- comme ressource azotée. L'utilisation d'un milieu sans NO_3^- dans l'environnement d'une partie du système racinaire a induit des phénomènes de compensation à court terme sur l'autre partie du système souterrain (Ruffel et al. 2008). En effet, Ruffel et al. (2008) avaient observé une augmentation de l'activité d'assimilation de l'azote minéral dans les premiers jours suivant l'utilisation du milieu sans N minéral. L'activité spécifique de fixation étant dépendante du carbone alloué aux parties racinaires (Voisin et al. 2003), Ruffel et al. (2008) avaient fait l'hypothèse que l'absence de variation de l'activité de fixation suite à ce stress pouvait être due à une limitation de l'activité spécifique de fixation par la disponibilité en C. Cette limitation pourrait être levée en situation de stress azoté localisé du fait d'une modification de l'allocation du C aux nodosités.

Les mutants hypernodulants ont un mécanisme défectueux d'autorégulation de la formation des nodosités, entraînant un nombre excessif de nodosités. Chez le pois, 3 gènes ont été identifiés comme intervenant dans la régulation du nombre de nodosités. Un gène (*NOD3*) à déterminisme racinaire, les 2 autres gènes (*SYM28* et *SYM29*) étant à déterminisme aérien. Chez les hypernodulants mutés sur l'un de ces gènes, la dérégulation du nombre des nodosités induit la formation de nodosités en excès ce qui entraîne un coût en C supérieur pour le mutant comparé au génotype sauvage. Ainsi, comme chez le pois l'utilisation du carbone pour la formation des nodosités a lieu au détriment des autres organes (Voisin et al. 2003), chez les hypernodulants de pois, on observe une croissance déprimée des parties racinaires et aériennes par rapport au génotype sauvage (Voisin et al. 2007 ; 2013). Par ailleurs, des études chez cette espèce ont montré que les génotypes hypernodulants possèdent une activité spécifique de fixation inférieure à celle d'un sauvage (Voisin et al. 2007). Des expériences en split-root sur *Medicago truncatula* ont induit des stress racinaires localisés entraînant la perte de la fonction de fixation sur une partie du système racinaire. Contrairement au sauvage, chez les hypernodulants soumis à un stress racinaire localisé, l'activité spécifique de fixation symbiotique des nodosités peut augmenter afin que la plante restaure son statut azoté. Dans ce cas, le niveau d'activité spécifique de fixation symbiotique demeure cependant inférieur à celui d'une plante sauvage (Jeudy et al. 2010). Comparé au génotype sauvage, cette meilleure réactivité des hypernodulants face à une perturbation de leur activité de fixation symbiotique suggère l'implication d'une modification de l'allocation du carbone entre organes.

Dans ce contexte, notre étude a été focalisée autour de l'analyse de la réponse adaptative du pois à une ablation d'une partie du système racinaire, afin de vérifier si les mutants hypernodulants peuvent compenser plus efficacement leur acquisition d'azote qu'un génotype sauvage suite à la perte d'une partie du système racinaire nodulé. Dans cet objectif,

afin de tester si la disponibilité en C est un facteur limitant de l'activité spécifique de fixation, nous avons mené une comparaison de la réponse de génotypes sauvages et de mutants hypernodulants à une ablation d'une partie du système racinaire dans des conditions d'alimentation en carbone variées.

2 Objectifs et démarche

Les objectifs de notre expérimentation étaient d'analyser la réponse adaptative du pois à une **ablation** partielle de son système racinaire, en considérant l'effet de l'ablation d'une part sur la fixation symbiotique d'azote par les nodosités et d'autre part sur la croissance de la plante. Dans ce cadre conceptuel, nous avons de plus évalué l'effet d'une **variation de la disponibilité en carbone** sur la réponse adaptative de la plante de 2 façons : i) par variation de la photosynthèse en utilisant 3 teneurs en CO₂ atmosphériques contrastées et ii) par variation génétique de la répartition des assimilats carbonés intra-plante, via l'utilisation du génotype de pois Frisson (variété sauvage) et de 3 génotypes hypernodulants, ces génotypes ayant une répartition différente de la biomasse entre parties aériennes, racines et nodosités.

2.1 Traitements expérimentaux

Les 2 traitements (ablation racinaire et modification de la teneur en CO₂) ont été appliqués à la fin de la phase végétative, date à laquelle le système racinaire est mis en place. Alors que durant les stades reproducteurs, la majorité des assimilats C est allouée aux graines en formation puis en remplissage, une part importante du C est allouée aux parties racinaires durant les stades végétatifs, suggérant à ce stade la possibilité d'une adaptation à des modifications de l'environnement et/ou à l'ablation des racines via une modification des flux de carbone. Ainsi, à ce stade, il devait être possible d'observer des variations des flux de C entre compartiments en réponse aux traitements expérimentaux.

L'analyse de la réponse adaptative des plantes a été mesurée au bout de 8 jours afin d'étudier la réponse à court terme aux traitements expérimentaux.

2.1.1 Ablation des racines nodulées

Nous avons réalisé une ablation d'environ la moitié des racines nodulées ayant abouti à une suppression à la fois des racines et des nodosités.

2.1.2 Modification de la teneur en CO₂

Au sein de 3 expérimentations successives, différentes teneurs en CO₂ ont été utilisées et appliquées simultanément au traitement racinaire: une teneur de référence à 380 ppm, une teneur basse à 150 ppm (diminuant la photosynthèse de 50 %), une teneur élevée à 750 ppm (augmentant la photosynthèse de 30 %). Ces teneurs ont été appliquées juste après l'ablation des racines nodulées, puis maintenues 8 jours jusqu'au prélèvement des plantes pour la réalisation des mesures décrites ci-après.

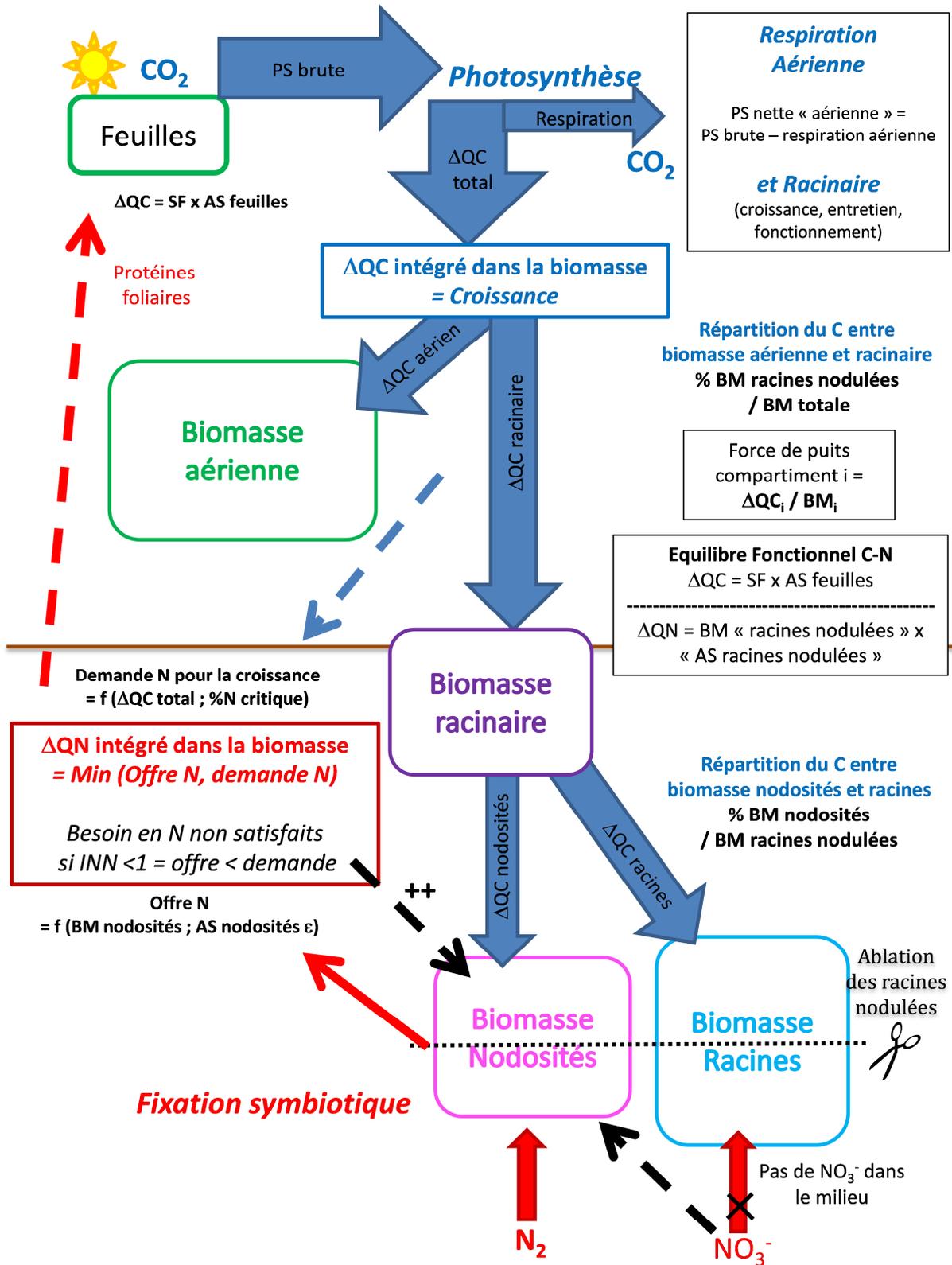


Figure 2.1 Cadre conceptuel décrivant les relations entre la fonction symbiotique de fixation du N_2 , les flux de C dans la plante et la croissance.

2.2 Démarche d'analyse des réponses adaptatives

L'analyse des composantes de la plasticité de la fixation de l'azote atmosphérique suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées a été réalisée en considérant les composantes structurales et fonctionnelles de cette réponse : la réponse structurale de l'appareil fixateur a été étudiée en mesurant les variations du nombre et de la biomasse des nodosités suite à l'application du traitement, en comparaison aux plantes témoins dont le système racinaire est resté intact ; la réponse fonctionnelle des nodosités a été évaluée via d'éventuelles modifications de l'activité spécifique de la fixation de N_2 des nodosités.

La modification de croissance de la plante suite à l'ablation des racines a été mesurée via la modification des flux de carbone pour la croissance des compartiments de la plante : « parties aériennes », racines et nodosités.

Plus précisément, l'analyse de la réponse adaptative des géotypes de pois à l'ablation d'une partie du système racinaire sous différents régimes de teneur en CO_2 de l'atmosphère a été réalisée en suivant le cadre conceptuel suivant. Ce cadre conceptuel décrit les relations entre la fixation symbiotique de N_2 , les flux de C dans la plante et la croissance (Figure 2.1).

1. La symbiose fixatrice de N_2 , une association à bénéfices réciproques impliquant les flux de C et de N entre les partenaires symbiotiques : L'azote acquis par fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries symbiotiques permet la synthèse des acides aminés et des protéines nécessaires à la formation et la croissance des structures de la plante. Il permet entre autres la formation des parties aériennes et la synthèse de l'enzyme Rubisco nécessaire à la photosynthèse. En retour, la plante fournit aux bactéries symbiotiques le carbone et l'énergie nécessaires à la formation des organes hôtes, les nodosités, et au fonctionnement relatif à la fixation de N_2 via l'enzyme bactérienne : la nitrogénase. Ces ressources carbonées proviennent de la photosynthèse.

2. Fixation symbiotique de N_2 par les nodosités. En absence d'azote minéral dans le milieu, la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique est la seule voie d'acquisition de N par la plante. Elle est proportionnelle à la biomasse des nodosités.

Dans notre étude, le prélèvement de l'N par la fixation a été décomposé en considérant que la quantité de N fixé par la plante et par unité de temps est le produit de la biomasse des nodosités (Structure) par leur activité spécifique de prélèvement d'N (Fonction : par unité de biomasse de nodosités et par jour).

3. Flux de C dans la plante et croissance : La photosynthèse permet l'acquisition de C par fixation du CO_2 atmosphérique par les feuilles. Une partie de ce C est respiré par les organes aériens et souterrains. La photosynthèse nette des parties aériennes correspond à la photosynthèse brute moins la respiration. Une partie de ce C est perdu par la respiration lors des dépenses énergétiques nécessaires à la synthèse, à l'entretien et au fonctionnement des structures de la plante. L'autre partie du C acquis par la photosynthèse est incorporée dans la biomasse des différents compartiments de la plante lors de leur croissance (réparti à l'échelle

de la plante entre parties aériennes et souterraines, et au sein des parties souterraines, entre racines et nodosités).

Dans notre étude, la chambre phytotronique utilisée pour les marquages isotopiques a permis de mesurer la photosynthèse nette des parties aériennes de l'ensemble des plantes présentes (correspondant à la photosynthèse brute moins la respiration aérienne). Un marquage isotopique au $^{13}\text{CO}_2$ de l'atmosphère a permis de mesurer pour chaque plante la quantité de carbone photosynthétique assimilé dans la biomasse. Cette quantité a été décomposée comme le produit de la surface des feuilles par leur activité photosynthétique.

Les flux de carbone pour la croissance des différents organes ont été analysés par la mesure de l'allocation du C nouvellement photosynthétisé entre les organes des plantes.

La force de puits pour le carbone de chacun des compartiments a été calculée comme le rapport entre la quantité de C allouée à ce compartiment et la biomasse de celui-ci.

4. Relations entre fixation symbiotique et croissance : de façon générale, quelle que soit la source de N, le prélèvement de l'N nécessaire à la croissance des plantes est fonction de la disponibilité en N dans le milieu et de la capacité de la plante à prélever cet azote. L'« offre en N » potentielle pour la plante provenant des parties racinaires est le produit de la quantité de structures responsables du prélèvement d'azote (biomasse des racines ou des nodosités) par leur niveau d'activité spécifique potentiel (activité par unité de biomasse). Toutefois, même en conditions où l'élément N n'est pas limitant dans le milieu, la plante ne peut pas accumuler une quantité « infinie » d'azote : le prélèvement de N est alors régulé par la plante pour répondre aux besoins liés à sa croissance, via un rétrocontrôle des parties aériennes sur le prélèvement de N, probablement par le biais des composés N circulant dans le phloème. Les besoins en N pour la croissance peuvent être qualifiés de « demande en N ». La quantité de N prélevée est donc limitée soit par l'offre en N, soit par la demande en N. Lorsque l'offre en N est non limitante, c'est la demande en N pour la croissance qui régit l'acquisition réelle de N par la plante (ΔQN ici). Dans le cas d'une offre en N limitante, les plantes sont en état de carence N.

Dans notre étude, dans laquelle la fixation symbiotique est la seule voie d'acquisition de l'azote, nous avons considéré que l'acquisition d'N par la plante pouvait être limitée

- *soit par l'offre en N symbiotique dépendant ici de la biomasse des nodosités, et de leur niveau d'activité spécifique, ces deux composantes étant a priori variable selon le génotype et éventuellement modifiées suite à l'ablation des racines nodulées*
- *soit par la demande en N pour la croissance, qui varie sous l'influence de la modification de la teneur en CO_2 de l'atmosphère.*

Afin de diagnostiquer l'état de nutrition N et d'identifier le processus limitant de l'acquisition de N (offre en N ou demande en N), nous avons utilisé l'Indice de Nutrition Azotée (INN), calculé comme le rapport entre la teneur en N des plantes la teneur en N

donnée par la courbe critique de dilution de N dans la biomasse (Salette and Lemaire 1981; Ney et al. 1997). Cet indice caractérise le niveau de satisfaction des besoins en N pour la croissance : un indice est inférieur à 1 indique un état de carence azotée, et donc une limitation de la croissance par l'azote. Dans le cas de notre étude, dans cette situation, l'offre en N est le facteur limitant du prélèvement de N ; lorsque l'INN est égal à 1, les besoins en N pour la croissance, sont satisfaits, et le prélèvement en N est défini par la demande en N. L'indice de nutrition azoté peut être légèrement supérieur à 1, indiquant une consommation de N excédentaire (dite de luxe), n'entraînant pas d'augmentation de la croissance.

5. Relations entre fixation symbiotique et carence en N : Chez les légumineuses pois et *Medicago truncatula*, il a été montré que la réponse à une carence N implique uniquement une réponse structurale, via l'accélération de la croissance des nodosités présentes, et la mise en place de nouvelles nodosités. Contrairement à la réponse des racines à une carence en nitrates, aucune augmentation de l'activité spécifique des nodosités n'a été observée en réponse à une carence. Toutefois, des variations génétiques peuvent moduler ces résultats

Ainsi, dans notre étude, l'ablation d'une partie des nodosités est susceptible d'induire une réponse adaptative de l'appareil fixateur via une augmentation de la croissance des nodosités, en réponse à une carence en N. Or les mutants hypernodulants, caractérisés par une dérégulation de l'Autorégulation de la formation des nodosités (AON), présentent une nodulation indépendante de la disponibilité en nitrates dans le milieu et donc indépendante du statut N de la plante (contrairement aux plantes sauvages). La réponse adaptative des mutants hypernodulants à une ablation d'une partie des nodosités pourrait donc différer de celle du sauvage.

6. Modifications de la répartition des assimilats entre compartiments, sous l'influence de modifications de l'environnement C et/ou N :

La théorie de l'équilibre fonctionnel (Brouwer 1983; Wilson 1988) indique que la modification du rapport entre biomasse aérienne et biomasse racinaire est une composante majeure de l'adaptation des plantes à des modifications de leur environnement, de façon à maintenir un équilibre fonctionnel entre prélèvement d'N et de C.

Par exemple, les plantes répondront à une diminution des ressources carbonées (CO₂) des parties aériennes par une augmentation du C investi dans la croissance de celles-ci, pour augmenter le prélèvement des ressources via une augmentation de la quantité de structures impliquées dans le prélèvement de la ressource (les feuilles). A l'inverse, lors d'une diminution de la disponibilité en ressources N des parties souterraines, on observera une augmentation du C alloué aux parties souterraines, pour augmenter leur croissance et *in fine* le prélèvement de N. De même, le modèle de Thornley (1972) prévoit un ajustement de l'allocation du C et de l'N entre les différents organes de la plante en fonction des variations environnementales : toute augmentation de la concentration en C dans la plante favorisant la croissance des racines, et toute augmentation de la concentration en N favorisant la croissance des tiges (Wilson 1988).

Dans notre étude, l'ablation de la moitié des racines nodulées impliquera un déséquilibre fonctionnel entre parties racinaires et aériennes. De plus l'équilibre fonctionnel sera modifié par des variations environnementales de la teneur en CO₂ des parties aériennes. Nous faisons donc l'hypothèse que la restauration de l'équilibre fonctionnel à ces perturbations pourrait faire intervenir une modification de l'allocation des assimilats vers les structures impliquées dans le prélèvement en élément « déficitaire », en plus d'une éventuelle réponse adaptative de leur activité spécifique de prélèvement de cet élément.

Par ailleurs, au sein des parties souterraines, l'acquisition de l'N s'effectue par l'intermédiaire des racines (assimilation de l'N minéral) et/ou des nodosités (fixation de l'N atmosphérique). L'allocation du C entre les racines et les nodosités varie selon le mode de nutrition azotée. En condition assimilatrice de l'N minéral (présence de nitrates dans le sol), les racines seront prioritaires pour l'utilisation du carbone au sein des parties racinaires. En condition fixatrice (absence d'N minéral), ce sont les nodosités qui seront prioritaires pour les assimilats carbonés, par rapport aux racines.

Dans notre étude conduite en absence d'azote minéral, la réponse à l'ablation des racines nodulées pourrait favoriser la croissance des nodosités par rapport à celle des racines, pour rétablir l'équilibre fonctionnel C-N. Toutefois, la mise en place éventuelle de nouvelles nodosités en réponse à une carence azotée est liée à la croissance racinaire, car elle a lieu sur les pointes racinaires en croissance. Par conséquent, l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la répartition du carbone entre la biomasse des racines et des nodosités n'est pas évident a priori.

Enfin, le rapport de biomasse entre parties aériennes et parties racinaires d'une part, et entre racines et nodosités d'autre part, peuvent présenter des variations entre génotypes. Par ailleurs, l'équilibre fonctionnel peut également être modifié par des mutations.

Ainsi, dans notre étude, les mutants hypernodulants sont caractérisés par une dérégulation de l'Autorégulation de la formation des nodosités (AON) entraînant une formation excessive de nodosités par rapport aux génotypes sauvages, avec de ce fait une dépense de C supplémentaire nécessaire à la formation des nodosités, aux dépens des racines et/ou des parties aériennes. Ainsi, en réponse à l'ablation d'une partie du système racinaire nodulé, les mutants hypernodulants pourraient de ce fait présenter une réponse adaptative de la croissance différente de celle des génotypes sauvages.

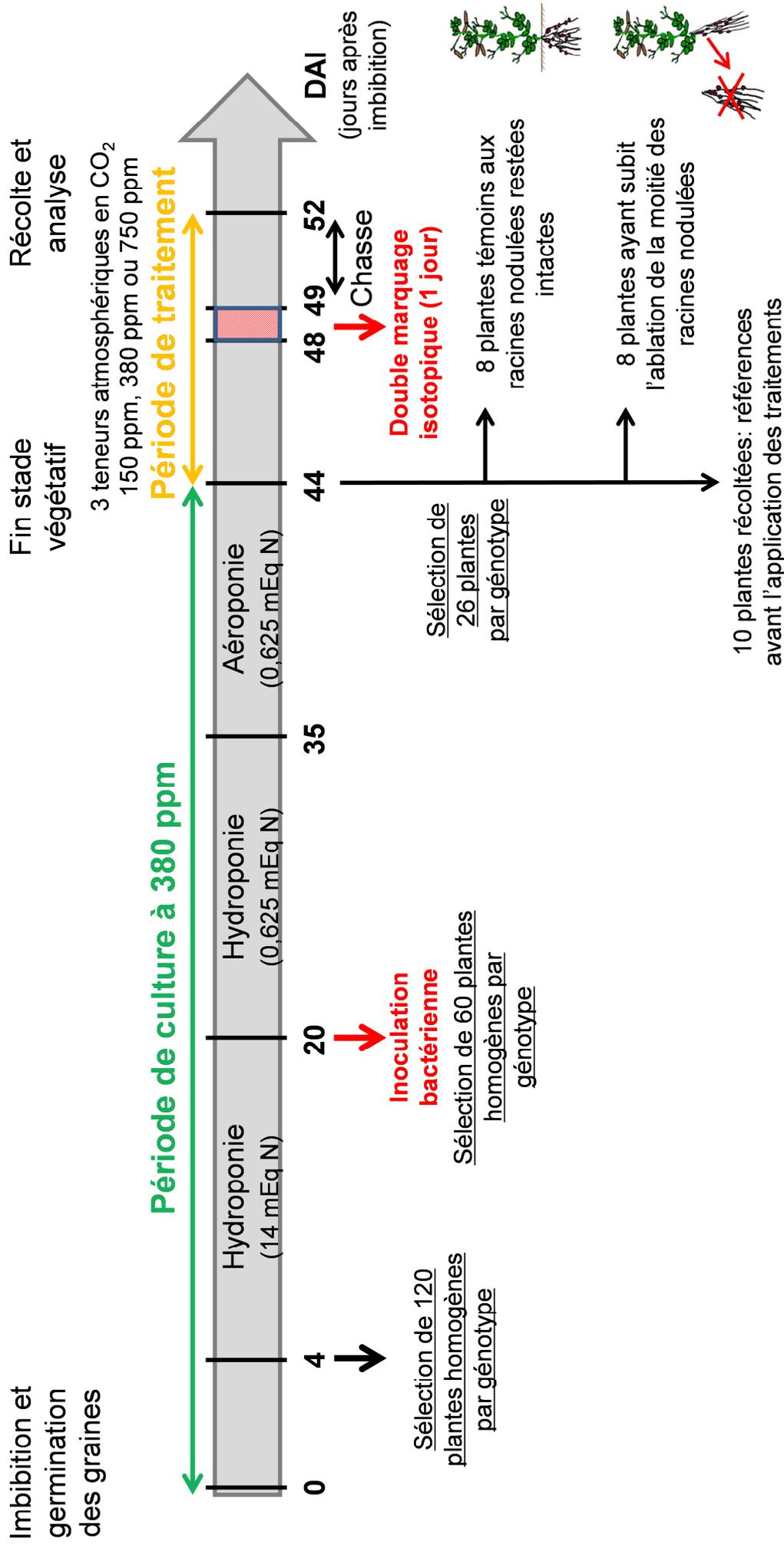


Figure 3.1 Déroulement des opérations de la germination jusqu'à la récolte des plantes chez 4 génotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Matériel biologique

Le matériel biologique qui a été utilisé dans l'expérimentation est le pois protéagineux *Pisum sativum* cv. Frisson et trois de ses mutants hypernodulants. Chaque hypernodulant est muté sur l'un des trois gènes entrant dans la régulation du nombre des nodosités : *SYM28*, *SYM29* et *NOD3* (Postma et al. 1988; Sagan et Duc 1996; Krusell et al. 2002). Pour chacun de ces mutants, nous avons sélectionné la lignée correspondant à l'allèle présentant le phénotype hypernodulant le plus faible, ce qui correspond à un impact moindre de la mutation sur la croissance de la plante (Bourion et al. 2007). Ainsi, nous avons utilisé les mutants P64 muté sur le gène *SYM28*, P118 muté sur *SYM29* et P121 muté sur *NOD3*.

3.2 Conditions de croissance

3.2.1 Contraintes expérimentales

Afin de réaliser le marquage isotopique $^{15}\text{N}_2$, il est nécessaire d'isoler le compartiment où se trouvent les racines pendant le marquage dans un dispositif étanche à l'air. Ainsi, l'étanchéité, entre le bac contenant les racines et son couvercle a été réalisée par un joint d'eau. Le système racinaire traverse ce joint au niveau de la zone de racines située 4 à 6 cm en dessous du collet. Afin de restreindre la formation des nodosités sur cette zone, une solution riche en N a été appliquée pendant les premières phases de l'élongation du pivot (Voisin et al. 2010).

Notre traitement expérimental est de réaliser une ablation de la moitié des racines. Pour faciliter la séparation reproductible du système racinaire en 2 parties égales, le pivot a été sectionné afin de conserver uniquement les racines latérales.

Afin de faciliter l'observation et les manipulations du système racinaire, les plantes ont été cultivées en système hydroponique. L'hydroponie facilite de plus le transfert des plantes dans le dispositif en aéroponie qui est ensuite utilisé pour le marquage au N_2 . Ce dispositif en aéroponie permet une diffusion optimale du $^{15}\text{N}_2$ à l'ensemble du système racinaire.

3.2.2 Déroulement des opérations de la germination aux traitements expérimentaux

Pour chacune des 3 expérimentations, 200 graines par génotype ont été pesées et calibrées puis désinfectées par une solution d'eau javellisée à 5 % pendant 2 minutes. Les graines sont ensuite rincées à l'eau osmosée pendant 10 minutes. Après imbibition, les graines ont été placées à la surface d'un milieu inerte composé d'Attapulgite (8.6 dm^3) contenu dans des boîtes hermétiquement fermées afin de garantir des conditions d'humidité constantes. Les boîtes ont été placées pendant 4 jours dans une chambre de culture maintenue à 20°C à l'obscurité jusqu'à ce que les apex soient visibles, puis à la lumière (néons).

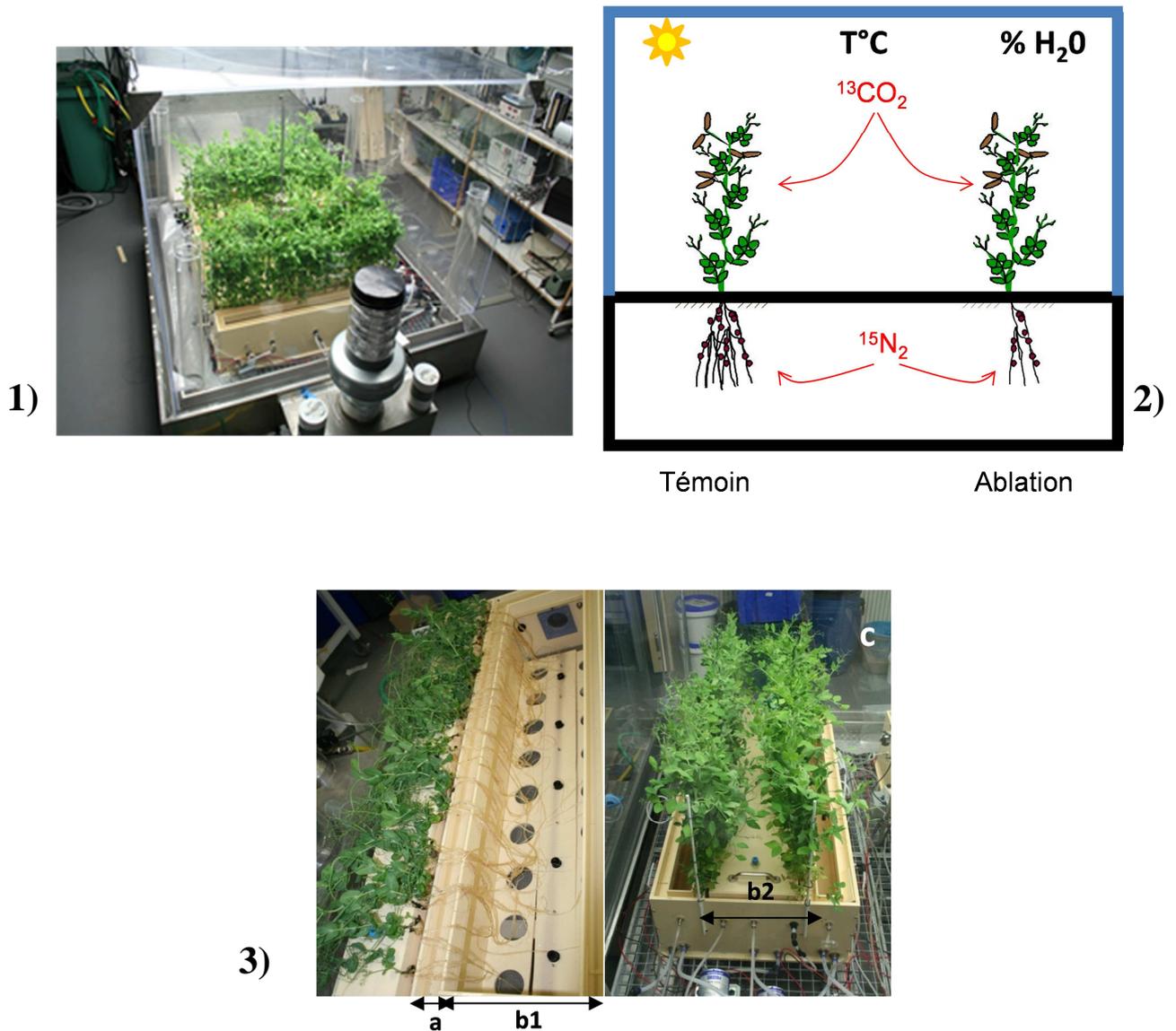


Figure 3.2 **Dispositif expérimental à l'intérieur de la chambre de marquage.** 1) photo de la chambre de marquage. 2) représentation schématique de la chambre de marquage dont les conditions environnementales sont contrôlées. 3) a : zone racinaire passant au travers du joint d'eau ; b1 : racines nodulées marquées au $^{15}\text{N}_2$ maintenues à l'intérieur du bac en PVC étanche à l'air ; b2 : couvercle du bac en PVC étanche à l'air ; c : parties aériennes marquées au $^{13}\text{CO}_2$ à l'intérieur de la chambre de marquage.

Au bout de 4 jours, 120 graines par génotype ont été sélectionnées sur la base d'un développement homogène, puis transférées pour une durée de 16 jours en culture hydroponique en chambre de culture (22°C/18°C jour/nuit), avec une photopériode de 10h. Une solution nutritive riche en azote (14mEq N, Annexe 3) a été utilisée afin de favoriser le développement des racines tout en restreignant la formation des nodosités. Vingt jours après imbibition (DAI), les 60 plantes les plus homogènes de chaque génotype ont été sélectionnées et leur pivot a été sectionné entre la 6^e et la 8^e racine latérale. Afin d'initier la nodulation, les plantes ont été transférées en hydroponie dans une solution nutritive pauvre en azote (0,625 mEq N, Annexe 3). Les racines ont été inoculées avec la bactérie fixatrice *Rhizobium leguminosarum* souche P221 (10⁸ rhizobia par plante) permettant la nodulation. A 35 DAI, le système hydroponique a été remplacé par un système aéroponique, avec brumisation de la solution nutritive pauvre en azote directement sur les racines. Ceci permet une acclimatation des plantes au système aéroponique qui est ensuite utilisé au cours des phases de marquage. A 43 DAI, les plantes ont été prélevées. Les plantes ont été pesées en frais, et leurs racines latérales ont été mesurées. Sur cette base, les 26 plantes les plus homogènes pour chaque génotype ont été sélectionnées.

3.3 Traitements expérimentaux

A 44 DAI, soit à la fin du stade végétatif, entre le 20 et 23 nœuds foliaires sur la tige principale, un premier lot de 10 plantes par génotype a été récolté pour servir de référence avant l'application des traitements.

Les 16 autres plantes ont été subdivisées en 2 groupes de 8 plantes. Pour chacune des plantes d'un groupe de 8 plantes, environ la moitié des racines latérales nodulées ont été retirées par ablation. Les 8 plantes restantes ont été conservées intactes et ont servi de plantes témoins. Ces plantes ont ensuite été introduites dans le système en aéroponie de la chambre de marquage, en solution nutritive sans azote (0 mEq N, Annexe 3).

3.4 Marquage isotopique

Le marquage isotopique a été réalisé dans une chambre de marquage hermétiquement fermée, permettant à la fois un contrôle de l'atmosphère des parties aériennes et des racines par utilisation du logiciel DasyLab (SM2i, Villier St Frédéric, France). Les paramètres environnementaux moyens étaient : 10h de photopériode avec un rayonnement PAR de 443 $\mu\text{mol}\cdot\text{photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 20.9°C et 60% d'hygrométrie pendant le jour et 18.9°C et 65% d'hygrométrie pendant la nuit.

Le double marquage isotopique $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ a été réalisé 5 jours après l'ablation des racines nodulées. Les parties aériennes de chaque plante ont été exposées à une atmosphère enrichie en $^{13}\text{CO}_2$ (10 atom% ^{13}C) pendant 10h de photopériode. Les racines nodulées ont simultanément été exposées à une atmosphère enrichie en $^{15}\text{N}_2$ (5 atom% ^{15}N) pendant 24h, pendant la journée d'exposition au ^{13}C et la nuit suivante.

Les 16 plantes de chaque génotype ont été récoltées après le deuxième jour de chasse, soit à 52 DAI soit 8 jours après l'ablation des racines.

3.5 Mesures

Pour chaque récolte, chaque plante a été divisée en plusieurs compartiments : feuilles, tiges, racines, nodosités, les nodosités ayant été retirées manuellement du système racinaire et dénombrées. La surface foliaire a été mesurée par utilisation d'un planimètre (Li-3100 Area Meter, Li-Cor Inc., Lincoln Nebraska, USA). Le nombre de nœuds foliaires sur la tige principale a également été comptabilisé. Chaque compartiment a été séché à l'étuve pendant 48h à 80°C puis pesé afin d'obtenir la masse de matière sèche (DW). Ils ont ensuite été broyés puis analysés par spectrométrie de masse (Sercon, Crewe, UK) couplé à un analyseur élémentaire C-N (Thermo Electron NC2500, Courtaboeuf, France) afin d'obtenir la teneur en N et en C ainsi que l'enrichissement en ^{15}N et en ^{13}C des plantes.

3.6 Calculs et statistiques

- Calcul de la proportion de biomasse de racines nodulées retirée lors du traitement ablation : la proportion a été calculée par la formule suivante :

$$\% \text{ Ablation} = \frac{DW \text{ racines nodulées}_{\text{retirées}}}{DW \text{ racines nodulées}_{\text{totales}}} \quad (1)$$

Avec $DW_{\text{racines nodulées}_{\text{retirées}}}$ la masse sèche des racines nodulées retirées lors de l'ablation à 43 DAI.

Et avec $DW_{\text{racines nodulées}_{\text{totales}}}$ la masse sèche totale des racines nodulées des plantes au moment de l'ablation d'une partie des racines nodulées à 43 DAI. Etant donné l'absence de mesures destructives au moment où l'ablation a été réalisée, une estimation a été calculée pour chaque plante en utilisant une relation proportionnelle ($P < 0.001$; $R^2 = 0.50$ à 0.87) entre la masse fraîche totale (FW) d'une plante et la masse sèche totale de ses racines nodulées mesurée pour chaque génotype sur les plantes de référence récoltées à 43 DAI.

$$DW \text{ racines nodulées}_{\text{totales}} = FW \times \left(\frac{DW \text{ racines nodulées}_{\text{ref}}}{FW_{\text{ref}}} \right) \quad (2)$$

Notre dispositif expérimental permettant le développement de racines homogènes (voir Matériel et Méthodes), il a été considéré que l'ablation des racines nodulées résultait en la perte similaire de biomasse de racines et de nodosités, calculé comme étant le pourcentage d'ablation.

- Azote symbiotique et carbone photosynthétique assimilé dans la biomasse

La quantité de N_2 fixé (ΔQN , en $\text{gN}\cdot\text{jour}^{-1}\cdot\text{plante}^{-1}$) pendant la phase d'exposition au $^{15}\text{N}_2$, dans un compartiment de la plante, a été calculée comme le produit de la biomasse (DW) de ce compartiment par sa teneur en azote (%N) par la proportion d'azote dans la plante issu de la fixation atmosphérique du N_2 :

$$\Delta\text{QN} = DW \times \frac{\%N}{100} \times \left(\frac{EN_{\text{échantillon}} - EN_{\text{référence}}}{EN_{\text{source}} - EN_{\text{référence}}} \right) \quad (3)$$

Avec $EN_{\text{échantillon}}$ l'abondance isotopique de la plante exposée au $^{15}\text{N}_2$, $EN_{\text{référence}}$ l'abondance isotopique de la plante de référence n'ayant jamais été exposée au $^{15}\text{N}_2$ marqué, et EN_{source} l'abondance isotopique de l'air marqué au $^{15}\text{N}_2$.

L'activité spécifique de fixation du N_2 (ϵN , en $\text{gN. g nodosités}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$) pendant la phase d'exposition au marquage a été définie par le ratio entre la quantité d'azote provenant de la fixation du N_2 (ΔQN) dans la plante entière et la masse sèche de nodosités fixatrices (efficaces) (DW_{nod}).

$$\epsilon\text{N} = \frac{\Delta\text{QN}}{\text{DW}_{\text{nod}}} \quad (4)$$

Assimilation du carbone dans la biomasse : la quantité de $^{13}\text{CO}_2$ assimilé dans la biomasse au cours de la période de marquage (ΔQC) a été calculée en utilisant une formule similaire à la formule (3). L'activité spécifique de photosynthèse des feuilles (ϵC en $\text{mg C. cm}^{-2}\text{ feuille}\cdot\text{jour}^{-1}$), définie par le ratio entre la quantité de carbone provenant du CO_2 assimilé dans la plante entière pendant la journée de marquage (ΔQC) et la surface foliaire (SF), a été calculée en utilisant une formule analogue à la formule (4).

$$\Delta\text{QC} = \text{DW} \times \frac{\%C}{100} \times \left(\frac{EC_{\text{échantillon}} - EC_{\text{référence}}}{EC_{\text{source}} - EC_{\text{référence}}} \right) \quad (5)$$

$$\epsilon\text{C} = \frac{\Delta\text{QC}}{\text{SF}} \quad (6)$$

Calcul de ratio : Des ratios entre deux variables données Y et X ont été utilisés pour le calcul des activités spécifiques de fixation du N_2 ou de photosynthèse, l'allocation du carbone nouvellement photosynthétisé entre les organes de la plante, la répartition des biomasses des différents organes et pour la vitesse de croissance relative. Afin de permettre des comparaisons statistiques des moyennes calculées parmi les géotypes, ces ratios ont été calculés comme la pente (a) de la régression linéaire entre les variables X et Y correspondant à l'équation $Y = aX$.

- Analyse de la réponse adaptative des plantes à l'ablation d'une partie des racines nodulées

Pour chaque mesure ou variable calculée, une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel libre « R » afin d'évaluer l'existence d'un effet significatif ou d'une interaction entre les traitements ou les géotypes. Les moyennes ont été comparées en réalisant un test de Tukey. Les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes à 5% de probabilité.

Pour plus de lisibilité, pour chaque graphe ou tableau, les comparaisons de moyennes ont été présentées séparément (en utilisant des séries distinctes de lettres) pour les plantes témoins et les plantes ayant subi l'ablation, à 5% de probabilité. Pour chaque géotype, les effets du traitement ablation ont été statistiquement déterminés par comparaison 2 à 2 en

utilisant un test de Student. L'amplitude de la réponse à l'ablation a été présentée en calculant le pourcentage de variation moyen (% variation) par rapport aux plantes contrôles :

$$\% \text{ variation} = \left(\frac{\text{moyenne}_{\text{ablation}} - \text{moyenne}_{\text{témoin}}}{\text{moyenne}_{\text{témoin}}} \right) \quad (7)$$

Avec $\text{moyenne}_{\text{ablation}}$, la valeur moyenne des plantes correspondant au traitement ablation, et $\text{moyenne}_{\text{témoin}}$, la valeur moyenne des plantes témoins dont les racines sont intactes.

Afin de quantifier les variations de croissance des racines et des nodosités en réponse à l'ablation, nous avons comparé la biomasse des racines ou des nodosités entre les plantes ayant subi l'ablation, et les plantes dont le système racinaire est resté intact (% variation, voir précédemment), avec la proportion de biomasse de racines nodulées retirée lors du traitement ablation. Comme il n'était pas possible de faire de comparaison statistique entre ces valeurs moyennes, un résultat a été considéré comme significativement différent lorsque la différence de biomasse entre les plantes ayant subi l'ablation et celles dont les racines sont intactes (% variation) était inférieur à la proportion de racines nodulées retirée par l'ablation moins l'écart type associé.

4 Réponse adaptative, à court terme et à teneur ambiante en CO₂, du pois protéagineux à une ablation d'une partie des racines nodulées

Ce travail se réfère à l'article rédigé pour la revue Plant and Soil et intitulé : « N₂ fixation of pea hypernodulating mutants is more tolerant to root pruning than that of wild type ».

Rappel de la problématique, en relation avec le schéma conceptuel (Figure 2.1) :

Des études ont permis de montrer que suite à une limitation locale et/ou temporaire en N, des différences de fixation symbiotique d'azote et d'activité spécifique de fixation symbiotique étaient observables entre un sauvage et un hypernodulant. Il en résultait une plus forte réactivité du mutant hypernodulant par rapport au sauvage face à ce stress (Jeudy et al, 2010). Le génotype sauvage avait une croissance réduite, due à une absence de réponse fonctionnelle du système fixateur dans les premiers jours suivant la limitation en N. A ce jour cependant peu de travaux ont étudié l'impact d'une perte d'une partie du système racinaire des hypernodulants sur leur nutrition azotée et leur croissance, en comparaison des réactions d'un génotype sauvage.

Ainsi, du fait de la suppression d'une partie des nodosités, l'ablation d'une partie des racines nodulées pourrait induire une limitation de la fixation symbiotique et de ce fait un état de carence en N, pouvant induire une limitation de sa croissance. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'ablation d'une partie des racines nodulées engendrera une augmentation de l'allocation du C vers les racines nodulées de celles-ci, afin de restaurer leur croissance et à plus long terme le prélèvement de N.

La réactivité des génotypes hypernodulants suite à cette ablation pourrait être supérieure à celle du génotype sauvage. Les génotypes hypernodulants sont mutés sur des gènes intervenant dans le mécanisme d'autorégulation de la nodulation et des études ont déjà révélé des impacts différents de l'hypernodulation sur le nombre de nodosités, la biomasse des différents compartiments et la répartition de celles-ci au sein de la plante entière. Ces variations pourraient entraîner, entre mutants hypernodulants, des stratégies différentes de réponse à l'ablation des racines nodulées. La réactivité observée pourra résulter d'une augmentation de l'activité spécifique de fixation symbiotique des hypernodulants, ou bien d'une réponse structurale via la croissance des nodosités.

Nous avons donc étudié l'effet de la perte d'une partie des racines nodulées sur la fixation symbiotique d'azote et sur la croissance des plantes en réalisant une analyse comparative sur 4 génotypes de pois : cv. Frisson et trois de ses mutants hypernodulants mutés sur les gènes SYM28, SYM29 et NOD3.

Table 4.1 Impact de l'ablation d'une partie des racines nodulées sur la croissance des parties souterraines, sur l'activité spécifique de fixation et la vitesse de fixation symbiotique d'azote chez le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypermodulants : P64, P118 et P121.

Impact de l'ablation	Force de puits des racines	Croissance des racines	Force de puits des nodosités	Croissance des nodosités	Réduction de l'activité spécifique de fixation symbiotique	Réduction de la vitesse de fixation symbiotique d'N
Sauvage	+	=	+	=	forte	forte
P64	++	+	+	=	forte	forte
P118	++	++	++	++	faible	faible
P121	+++	+++	+++	+++	forte	très faible

Rappel des principales conclusions de notre étude :

L'analyse de nos résultats a mis en évidence une réactivité globalement supérieure des mutants hypernodulants à une ablation d'une partie des racines nodulées par rapport au sauvage. En effet, la capacité du système fixateur d'N des mutants à répondre au stress a été plus importante que celle du génotype sauvage.

Toutefois, nous avons observé différentes stratégies des hypernodulants face à la perte d'une partie des racines nodulées. Ainsi, les mutants P118 et P121 ont montré la réponse la plus efficace parmi les 3 hypernodulants.

- Chez le P118, suite à l'ablation, on a observé la plus faible diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique d'azote (-17%) des 4 génotypes résultant ainsi en la plus faible diminution du flux d'N provenant de la fixation symbiotique d'azote. Le P118 a ainsi démontré sa plus forte réactivité suite à l'ablation.
- Chez le P121, bien que la diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique consécutive à l'ablation soit plus importante que celle observée pour P118, le flux d'N provenant de la fixation symbiotique d'azote était le plus élevé parmi ceux observés chez les 4 génotypes. Ceci résulte de la biomasse très importante des nodosités chez P121.
- Chez le sauvage et le mutant P64, la diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique suite à l'ablation a induit une très forte baisse de la fixation symbiotique d'azote.

Bien que l'ablation des racines nodulées ait induit une augmentation de la force de puits des nodosités chez les 4 génotypes, seuls les mutants P118 et P121 ont montré à court terme (8 jours après l'ablation) une accélération (respectivement modérée et forte) de la croissance de leurs nodosités, alors que ce n'était pas visible à ce stade chez le sauvage et le mutant P64. Chez P64, en réponse à l'ablation, on a observé une augmentation de la croissance des racines sans que celle-ci ne soit associée à une croissance des nodosités (Tableau 4.1).

Cette première étude analysant la réponse de plantes fixatrices à une ablation des racines nodulées montre la capacité plus importante de certains mutants hypernodulants à compenser la perte d'une partie de leurs racines nodulées en comparaison avec la réaction d'un génotype sauvage. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'études concernant les mécanismes et les gènes impliqués dans la réponse des légumineuses à des stress s'opérant au niveau des parties souterraines des plantes. Les composantes et conséquences de la capacité des mutants à réagir à l'ablation d'une partie du système racinaire devraient être plus finement analysées tout au long du cycle de croissance et lors de culture en champ.

A court terme (8 jours), suite à l'ablation des nodosités, nous avons globalement montré sur les 4 génotypes étudiés une diminution substantielle de la fixation symbiotique, sans modification notable de l'efficacité de la photosynthèse et de la croissance aérienne.

Toutefois, l'impact global de l'ablation d'une partie du système racinaire sur la fixation symbiotique d'azote et la croissance des plantes peut varier sur le long terme.

- D'un côté, l'augmentation de la force de puits pour le C des nodosités suite à l'ablation pourrait induire une augmentation de la proportion de nodosités au sein de la biomasse totale. Le coût en C respiré par les nodosités augmenterait alors, pouvant résulter en une diminution de l'efficacité de photosynthèse.
- A l'inverse, l'accélération de la croissance des nodosités suite à l'ablation pourrait induire une augmentation de la fixation symbiotique d'azote. Cette plus forte offre en N permettrait d'augmenter la synthèse des protéines foliaires, résultant en l'augmentation de l'activité spécifique de photosynthèse.

Les résultats de notre étude ne nous permettent cependant pas de prévoir à long terme laquelle de ces 2 réponses se vérifierait, et qui plus est, peut aussi varier selon le génotype. Enfin, la capacité des génotypes à restaurer leur niveau de fixation symbiotique d'azote pré-stress « ablation » est conditionnée par l'aptitude des racines à maintenir le prélèvement des nutriments indispensable aux nodosités comme le phosphore et le soufre ainsi que par la capacité de croissance des racines. Afin de répondre à ces questions, de nouvelles expérimentations analysant la réponse à long terme des légumineuses à l'ablation d'une partie du système racinaire sont nécessaires.

MANUSCRIPT TITLE: N₂ fixation of pea hypernodulating mutants is more tolerant to root pruning than that of wild type

Authors : Cazenave Alexandre-Brice, Salon Christophe, Jeudy Christian, Duc Gérard, Voisin Anne-Sophie

Affiliation : INRA, UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, 21000 Dijon, France

Abstract

Background and Aims As a legume, pea plant has the ability to symbiotically fix N₂. However, symbiotic N₂ fixation is very sensitive to environmental stresses that affect plant growth, and there is little knowledge on the impact of root pruning on N₂ fixation and plant growth.

Methods In this study we removed half of the nodulated roots of pea wild type Frisson and hypernodulating mutants P64, P118 and P121. Dinitrogen fixation was measured using ¹⁵N labeling and carbon assimilation and partitioning between plant organs using ¹³C labeling.

Results Root pruning decreased N₂ fixation by -46% to -79% in wild types and mutants. Pea mutant P118 had a lower decrease of specific activity of N₂ fixation (-17%) than both wild type and others mutants (-36% to -62%). For all genotypes, root pruning increased root and nodule sinks strengths for carbon. For P118 and for P121, this was associated to higher nodule growth than control plants, as measured 8 days after root pruning.

Conclusion This is the first analysis of N₂ fixing plant response to root pruning. Importantly, we showed that some hypernodulating mutants pea lines (P118 and to a lesser extent P121) withstood this stress better than wild type did.

Keywords: *Pisum sativum* L., Hypernodulating mutants, Root pruning, Symbiotic N₂ fixation, C nutrition, Growth

Abbreviations: C: Carbon ; N: Nitrogen ; SLN: Specific Leaf Nitrogen ; DAI: Days After Imbibition ; AON: Autoregulation Of Nodulation ; DW: Dry Weight

Introduction

Pea (*Pisum sativum* L.) is the leading grain legume grown in Europe. Its protein-rich seeds are used as human food and animal feed (Santalla et al. 2001). As a legume, in addition to soil mineral nitrogen uptake by the roots, pea has the ability to fix atmospheric nitrogen through symbiosis with *Rhizobium leguminosarum* bacteria, within specialized plant organs, the nodules (Nap and Bisseling 1990). Thus, symbiotic N₂ fixation is a major N source for legumes which therefore contribute to improving the sustainability of agriculture. Indeed nitrogen fixation by legume crops diminishes N fertilizer use in cropping systems and thereby the associated energy use and N₂O emissions (Munier-Jolain and Carrouee 2003; Jensen and Hauggaard-Nielsen 2003; Crozat and Fustec 2006; Nemecek et al. 2008; Jensen et al. 2012)

Root assimilation of soil mineral nitrogen and symbiotic fixation of atmospheric dinitrogen are complementary for plant N uptake as, in presence of nitrate, mineral N assimilation replaces N₂ fixation (Voisin et al. 2002b; Lucinski et al. 2002; Bollman and Vessey 2006). However, N nutrition can be a factor limiting pea yield when soil nitrate availability is low, as symbiotic N₂ fixation is highly sensitive to environmental stresses (Frings 1976; Corre-Hellou and Crozat 2005; Marino et al. 2007; Naeem et al. 2008; Mahieu et al. 2009). Abiotic or biotic stresses can lead to a local and/or temporary limitation of N₂ fixation. In particular, the pea weevil *Sitona lineatus* L. or the fungal pathogen *Aphanomyces euteiches*, are major pests damaging pea crops (Dore and Meynard 1995; Corre-Hellou and Crozat 2005; Mathesius 2009). The damage caused by the larvae of the Pea weevil *Sitona lineatus* to the root nodules is expected to have a much greater impact on yield than leaf damage from adults feeding (Dore and Meynard 1995; Crozat and Dore 2010). Also, the damage to the root nodules is far more difficult to quantify, as the root system has to be extracted to obtain an estimate of the number and/or mass of nodules destroyed. Still, larvae damage was measured in a few field studies. For example, Lohaus and Vidal (2010) have shown that the percentage of destroyed root nodules varied between 37 % and 57 %, with variations according to year and infestation treatments. Much higher values were found in earlier studies (80-90 %) (Cantot 1986, 1989). The *Aphanomyces* fungus pathogen induces root rots. Infected roots become honey brown, cortical tissues become soft and darker and discoloring continues up to epicotyl. Root rot is accompanied by a reduction in root weight. This can reduce yield by up to 80 % (Gaulin et al. 2007), but there is no available direct relationship between root damage and yield reduction. Root rot index (RRI) were developed to quantify the impact of the disease on the roots, as described in Moussart et al. (2007). The 0-5 scale describes the percentage of roots discolored, from no symptoms to total discoloration. This kind of scale has been used to screen genetic resources for resistance to *Aphanomyces*. Root rot index values from 1 to more than 4 were recorded (Pilet-Nayel et al. 2002; Moussart et al. 2007; Hamon et al. 2011), with RRI scores ranging from 2 to 3 for most lines. Thus, these biotic stresses damage roots and/or nodules, probably reducing their N uptake capacity (Gerard 2002). Many studies have shown that N₂ fixation decreases with pea weevil damage (Murray et al. 1996; Corre-Hellou and Crozat 2005; Lohaus and Vidal 2010). However, the impact of the loss of nodulated roots on the plant N₂ fixation capacity has not been studied so far. Moreover, plant growth responses to withstand this stress remain unknown.

Recent studies described legume plant response to a local and temporary deprivation of N_2 or NO_3^- . Following local deprivation of nitrate, *Medicago truncatula* (Mtr) can maintain N uptake through a short-term increase of root specific activity for nitrate uptake by those roots that remain exposed to nitrate (Ruffel et al. 2008). Plant response also involves a long-term increase of root proliferation. In contrast to NO_3^- , in the short term, local deprivation of N_2 does not involve increase of nodule specific activity by Mtr plants response, resulting in a decrease in N_2 fixation compared to control plants (Jeudy et al. 2010). In the long term, Mtr plants adapt to N shortage by first increasing nodule biomass and then nodule number (Jeudy et al. 2010).

Regulation of nodulation has been shown to be the main component of the legume plant's adjustment to its N requirements (Voisin et al. 2010). In pea, nodules are strong sinks for photosynthetic assimilates (Layzell et al. 1981; Walsh et al. 1987; Vance and Heichel 1991; Hacin et al. 1997; Voisin et al. 2003a; 2007), and carbon use for nodule formation and activity occurs at the expense of other plant organs (Voisin et al. 2003a). Nodule formation is highly controlled by the host plants, which limit nodule number by the Autoregulation Of Nodulation (AON) mechanism (Reid et al. 2011; Mortier et al. 2012). Hypernodulating mutants are defective in regulation of nodulation, thus producing an excessive number of nodules (Sagan and Duc 1996). In pea, 3 genes were identified as involved in the regulation of nodule number: *SYM28*, *SYM29* and *NOD3* (Postma et al. 1988; Sagan and Duc 1996). As the hypernodulating mutants produce numerous extra nodules, this may result in a higher carbon cost compared to wild type.

This is consistent with the depressed shoots and roots growth in hypernodulating mutants as compared to the wild type (Sagan et al. 1993; Wopereis et al. 2000; Voisin et al. 2003b; Bourion et al. 2007; Voisin et al. 2007; Novak 2010; Voisin et al. 2013). Nodule specific activity for N_2 fixation of hypernodulating mutants was also shown to be lower than for wild type (Voisin et al. 2007). Still, in split root experiments, unlike wild types, the *SUNN* (orthologous to *SYM29*) Mtr hypernodulating mutant response to local deprivation of N_2 was associated with an increased nodule specific activity for N_2 fixation compared with mutant without N_2 deprivation (Jeudy et al. 2010). Thus, the *SUNN* hypernodulating mutant shows a higher reactivity to a localized and temporary N_2 deprivation than a wild type.

Against this background, the aim of this study was to test whether the N_2 fixing apparatus of hypernodulating mutants could compensate more efficiently for physical and localized root damage than that of wild type lines. We have dissected the effect of the loss of part of the root system on plant symbiotic nitrogen fixation and plant growth. To carry out this study, a comparative analysis was conducted on 4 genotypes of pea: cv. Frisson and 3 of its hypernodulating mutants mutated in the *SYM28*, *SYM29* and *NOD3* genes. Half of the nodulated root system was removed at the end of the vegetative stage. The short term response of plants was measured 8 days after root pruning. The impact of root pruning on symbiotic N_2 fixation was measured using $^{15}N_2$ labeling, considering its two components i.e. the nodule dry weight and the nodule specific activity for N_2 fixation. Similarly to the Mtr plant's response to local N_2 deprivation, we hypothesized that the plant growth response to root pruning may be to induce preferential allocation of carbon (C) into nodule biomass.

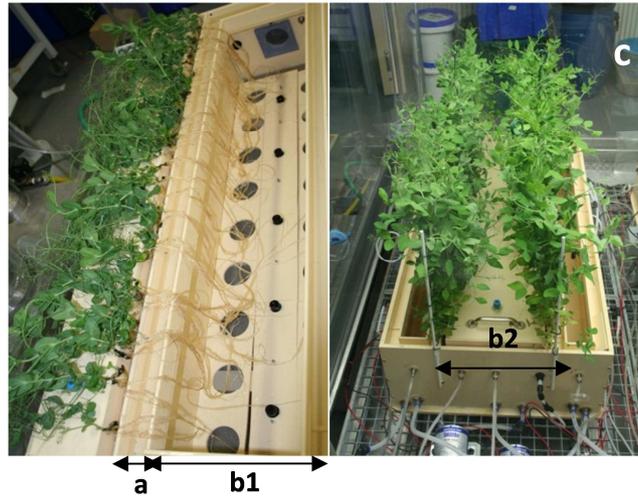


Fig. 4.1 Experimental set up inside the labeling chamber. a: Root zone crossing the water seal; b1: ¹⁵N₂ labeled nodulated roots inside the air-tight PVC tank used; b2: cover of the air-tight PVC tank; c: ¹³CO₂-labeled shoots inside the labeling chamber.

We therefore carried out simultaneous ^{13}C labeling of photosynthetic C to monitor photosynthetic C assimilation and partitioning into the shoot, root and nodule compartments.

Materials and methods

Plant material

The experiment was conducted on the *Pisum sativum* pea line cv. Frisson and 3 of its isogenic hypernodulating nod⁺⁺ mutants. Each hypernodulating mutant is mutated in one of three genes controlling Autoregulation Of Nodulation: *SYM28*, *SYM29* and *NOD3* (Postma et al. 1988; Sagan and Duc 1996) of which the mutated genes were identified by Krusell et al. (2011; 2002) and Schnabel et al. (2011), respectively. For each mutated gene, we selected the allele conferring the mildest hypernodulating phenotype, and there for the weakest impact of the mutation on plant growth compared to the parental line (Bourion et al. 2007). Thus, we used the P64, P118 and P121 mutant lines respectively mutated on *SYM28*, *SYM29* and *NOD3* genes.

Experimental constraints

In order to perform $^{15}\text{N}_2$ isotopic labeling, it was necessary to separate the below-ground atmosphere from the shoot atmosphere. For this, roots were placed in an air-tight PVC tank. Impermeability between the root tank and its cover was ensured using a water seal. The root zone crossing the water seal was the upper root zone (i.e. located 4 to 6 cm below the collar) (Fig. 4.1). To restrict nodule formation within this root zone, the nutrient solution supplied during the first days of root elongation was not inoculated and rich in nitrogen (Voisin et al. 2010). Our experimental treatment was to remove by cutting half of the roots. The tap root was cut after the emergence of the first lateral roots i.e. 20 days after imbibition. The resulting root systems consisted of lateral roots only, thus facilitating the subsequent separation of the root systems into two equivalent groups. To manipulate the root system without damage, plants were cultivated into a hydroponic culture system. In addition, this hydroponic system enabled easy transfer and acclimation of plants towards the aeroponic labeling system used inside the labeling chamber. Indeed, the aeroponic system allowed optimal diffusion of gases during the $^{15}\text{N}_2$ labeling of the roots (Jeudy et al. 2010).

Growing conditions from germination until experimental treatment

First, 200 seeds per genotype were weighed and calibrated. They were then disinfected using a bleach solution (5%) during 2 minutes and washed with water during 10 minutes. After imbibition, seeds were placed on the surface of an inert Attapulgate medium (8.6 dm³) in transparent germination boxes that were sealed to keep humidity constant. Boxes were placed inside a growth chamber for 4 days, at 20°C. Obscurity was maintained until the apex became visible. After 4 days, 120 seeds per genotype were selected, based on homogeneous development.

The selected seeds were transferred into hydroponic culture tank inside a growth chamber for 16 days (Average environmental parameters: 10 hours of photoperiod with $783 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ photosynthetic active radiation, 22.9°C and 54% hygrometry during the day and 18.1°C and 71% hygrometry during the night). The nutrient solution was a nitrate rich solution ($14 \times 10^{-3} \text{ mol N. l}^{-1}$) so as to prevent nodule formation (Voisin et al. 2010). Then, 20 days after imbibition (DAI), for each genotype the taproots of the 60 most homogenous plants were cut below the eighth lateral root so as to allow only the upper eight roots to grow. To allow nodule formation on these roots, plants were then transferred into hydroponic solution poor in nitrogen ($0.625 \times 10^{-3} \text{ mol N. l}^{-1}$). Plants were inoculated with the N_2 fixing bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* P221 (MIAE01212) with a concentration of 10^8 colony forming units per plant. This strain was obtained from "Microorganismes d'intérêt Agroenvironnemental" located at UMR Agroécologie, INRA, Dijon, France. The inoculum was prepared from cultures grown on Bergersen slopes washed with sterile water. At 35 DAI, the hydroponic system was replaced by an aeroponic system, with nutrient solution ($0.625 \times 10^{-3} \text{ mol N. l}^{-1}$) being directly fogged on roots. At 43 DAI, plants were transferred into the labeling chamber. Before transfer, plants were weighed for fresh mass estimation; and the length of the longest lateral root was measured for each plant. These measurements allowed selecting the 26 most homogeneous plants per genotype.

Experimental treatment

At 43 DAI, the 26 selected plants for each genotype were divided into 3 groups. On a first group of 8 plants, half of the lateral roots were removed and harvested for measurements; this experimental treatment will be referred thereafter as "root pruning". A second group of 8 plants was kept intact and served as control plants. For each genotype, these two groups of plants were transferred into the labeling chamber, with nitrogen free nutrient solution (0 mol N. l^{-1}) being provided to the roots by an aeroponic system. The third group of 10 plants was not treated but harvested directly for measurements and served as a pre-treatment reference.

Labeling chamber and isotopic labeling

The labeling experiment was conducted in a gas-proof chamber, allowing control of both shoot and root atmospheres using DasyLab software (SM2i, Villiers St Frédéric, France) (Fig. 4.1). The average environmental parameters of this chamber were: 10 h of photoperiod with $443 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ photosynthetic active radiation, 20.9°C and 60% hygrometry during the day and 18.9°C and 65% hygrometry during the night, and $380 \mu\text{l.l}^{-1} \text{ CO}_2$ concentration.

A double isotopic $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labeling experiment was performed inside the labeling chamber, 5 days after root pruning. The shoots of all plants were exposed to a $^{13}\text{CO}_2$ -enriched atmosphere (10 atom% ^{13}C) for 10h. Nodulated roots were simultaneously exposed to a $^{15}\text{N}_2$ -enriched atmosphere (5 atom% ^{15}N) for 24h, during the day of exposure to ^{13}C and the following night. Plants were harvested after two days of chase i.e. at the beginning of the 8th days after root pruning (52 DAI).

Harvest and measurements

Each harvested plant (or half root system) was divided into shoot, root and nodule compartments. Nodules were removed from the roots using forceps and counted. Leaf area was measured using a planimeter (Li-3100 Area Meter, Li-Cor Inc., Lincoln Nebraska, USA). Each plant compartment was dried in an oven at 80°C during 48 hours for dry weight determination. Dry plant tissues were then ground. ^{13}C and ^{15}N contents were analyzed using a continuous-flow isotope ratio mass spectrometer (Sercon, Crewe, UK) coupled to a C-N elemental analyzer (Thermo Electron NC2500, Courtaboeuf, France).

Calculations and statistics

The proportion of nodulated root biomass that removed by the “root pruning” treatment was calculated as follows:

$$\% \text{ Root pruning} = \frac{DW \text{ rootnod}_{pruned}}{DW \text{ rootnod}_{total}} \quad (1)$$

$DW_{\text{rootnod}_{pruned}}$ = the biomass of nodulated roots that was removed by the root pruning treatment and harvested at 43 DAI (T_0).

$DW_{\text{rootnod}_{total}}$ = the total biomass of the nodulated roots of pruned plants at the time of the root pruning treatment at 43 DAI. Given the absence of non-destructive measurements at the time when the root pruning treatment was performed, this was estimated using the proportional relationship estimated for each genotype ($P < 0.001$; $R^2 = 0.50$ to 0.87) between total plant fresh weight (FW) and total nodulated root biomass, as measured on the pre-treatment reference plants harvested at 43 DAI:

$$DW \text{ rootnod}_{total} = FW \times \left(\frac{DW \text{ rootnod}_{ref}}{FW_{ref}} \right) \quad (2)$$

As our experimental setup favored the development of homogenous roots (see material and methods), it was herein considered that root pruning would result in similar losses of root and nodule biomass, as calculated by the root pruning percentage.

Nitrogen fixation: The amount of $^{15}\text{N}_2$ fixed (ΔQN) during the one day (24h) ^{15}N labeling period in total plant or in a given plant compartment was calculated as follows (Voisin et al. 2003c):

$$\Delta QN = DW \times \frac{\%N}{100} \times \left(\frac{EN_{\text{sample}} - EN_{\text{reference}}}{EN_{\text{source}} - EN_{\text{reference}}} \right) \quad (\text{g N} \times \text{plant}^{-1} \times \text{day}^{-1}) \quad (3)$$

With for each plant compartment exposed to $^{15}\text{N}_2$: DW its biomass, %N its nitrogen concentration, EN_{sample} its ^{15}N isotopic abundance. $EN_{\text{reference}}$ is the ^{15}N isotopic abundance of pre-treatment reference plants never exposed to labeled $^{15}\text{N}_2$ and EN_{source} the isotopic abundance of air labeled with $^{15}\text{N}_2$.

The specific activity of nodules for N₂ fixation (ε) was defined by the ratio between the amount of N coming from N₂ fixation assimilated into the entire plant during the day of labeling (ΔQN) and nodule biomass (DW_{nod}) :

$$\varepsilon = \frac{\Delta QN}{DW_{nod}} \quad (\text{g N} \times \text{g nodule}^{-1} \times \text{day}^{-1}) \quad (4)$$

Carbon assimilation into biomass: The amount of ¹³CO₂ assimilated into biomass during the labeling period (ΔQC) was calculated using a formula similar to formula (3). The specific activity of leaves for photosynthesis, as defined by the ratio between the amount of C coming from CO₂ assimilated into the entire plant during the day of labeling (ΔQC) and leaf area (LA) (in mg C × cm² leaves × day⁻¹) was calculated using a formula similar to formula (4). For each compartment (shoot, root and nodule), sink strength for carbon was calculated as the amount of carbon assimilated into the biomass of each compartment during the labeling period divided by its biomass (in g C × day⁻¹ × g DW⁻¹).

Ratios between 2 given variables Y and X were used for calculation of specific activities of fixation or photosynthesis, for carbon allocation ratios, for biomass ratios and for sink strengths. So as to allow statistical comparisons of the means calculated among genotypes, those ratios were calculated for each genotype as the slope (a) of the linear regression between the X and Y variables following the equation Y= aX.

Means were calculated on eight plants. For each measured or calculated variable, variance analysis (ANOVA) was performed using the freeware “R” to evaluate the respective effects or interaction between treatments or genotypes. Means were compared using a Tukey test. Means followed by different letters were significantly different at the 0.05 probability level.

For more legibility, in each graph or table, mean comparisons among genotypes were presented separately (i.e. using distinct series of letters) for control plants and treated plants (for which roots were pruned) at the 0.05 probability level. And for each genotype, the effect of the root pruning treatment was statistically determined using a two-tailed paired Student t test.

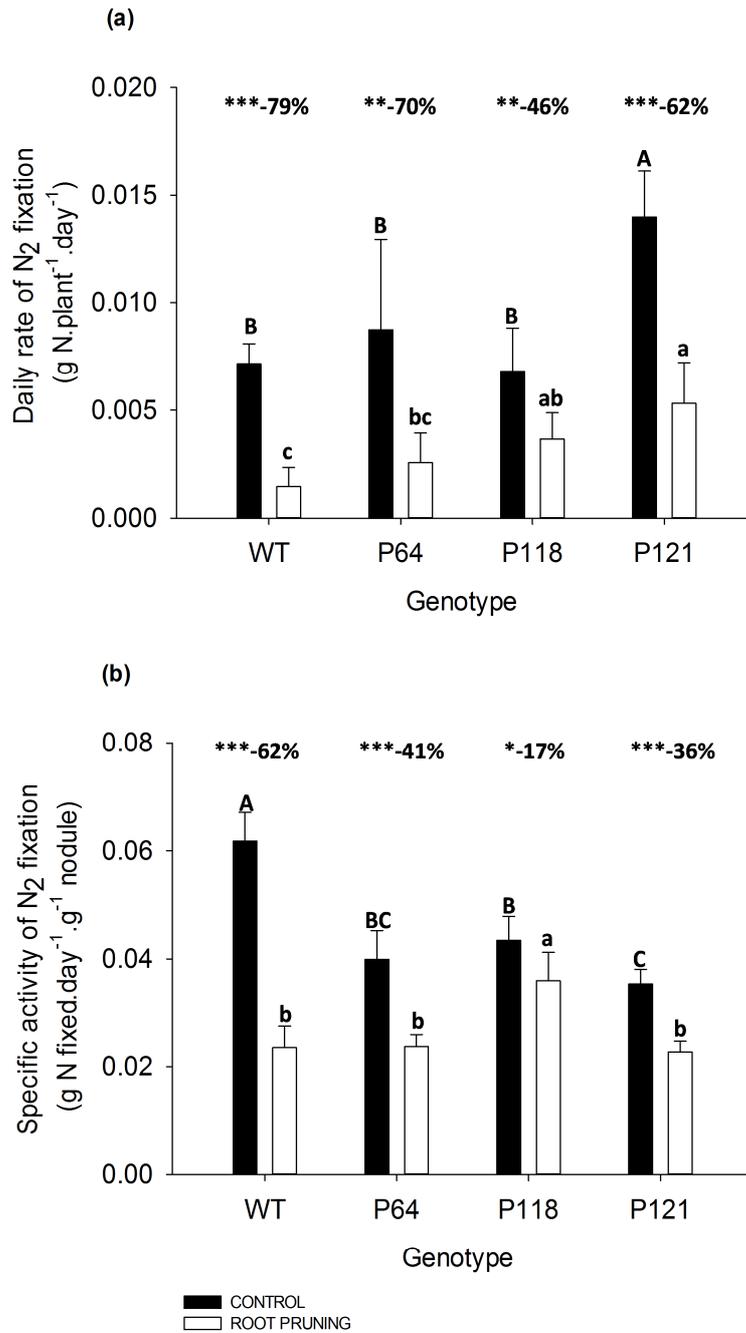


Fig. 4.2 N₂ fixation of pea as affected by root pruning for 4 genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121). (a) daily rate of N₂ fixation (Δ QN) and (b) nodule specific activity for N₂ fixation (ϵ), for control plants (“control”, black bar) and plants for which half of the roots were removed (“root pruning”, white bar), as measured eight days after root pruning. N₂ fixation was measured using ¹⁵N labeling. Vertical bars indicate standard deviation. Within each treatment, different letters denote significant differences between genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$).

For each genotype, the magnitude of response to root pruning was presented using a calculation of the differential mean variation (% variation) compared to control plants as follows, as measured 8 days after root pruning:

$$\% \text{ variation} = \left(\frac{\text{mean}_{\text{treated}} - \text{mean}_{\text{control}}}{\text{mean}_{\text{control}}} \right) \quad (5)$$

With $\text{mean}_{\text{treated}}$, the mean value for plants corresponding to the root pruning treatment, and $\text{mean}_{\text{control}}$ the mean for the control plants.

So as to quantify root or nodule growth variation in response to root pruning, we compared the variation of root or nodule biomass between plants with pruned root and intact control plants (% variation, see above), with the proportion of nodule root biomass removal. As it was not possible to make statistical comparisons on these mean values, they were considered as significantly different when the difference between root pruned plants and control plants was lower than the proportion of nodule root biomass removal minus its associated standard deviation.

Results

Root pruning treatment at the end of the vegetative period.

Root pruning was performed at the end of the vegetative period by cutting off half of the lateral roots. This resulted in the loss of 53 % (± 14) of the nodule root biomass for wild type Frisson, and of 56 % (± 12), 51 % (± 7) and 67 % (± 12) for the hypernodulating mutants P64, P118 and P121, respectively.

Effect of root pruning on N_2 fixation

For control plants with intact roots, the daily N_2 fixation rate, as measured 5 days after the root pruning treatment (ΔQN), was similar for wild type, P64 and P118 but higher for P121 (Fig. 4.2a). Following root pruning, the N_2 fixation rate decreased for all genotypes, but the extent of this decrease varied among genotypes. Wild type and mutant P64 displayed the strongest decrease following root pruning (-79 % and -70 % compared to intact plants), while the decrease was lower for P118 and P121 mutants (-46 % and -62 % respectively compared to intact plants) (Fig. 4.2a). Thus, 5 days after root pruning, the wild type displayed the lowest daily N_2 fixation rate, P121 the highest, with P64 and P118 being intermediate (Fig. 4.2a).

Considering intact control plants, nodule specific activity for nitrogen fixation (ϵ ; in $\text{g N fixed} \times \text{day}^{-1} \times \text{g nodule}^{-1}$) was lower for hypernodulating mutants than for the wild type Frisson (Fig. 4.2b). Following root pruning, nodule specific activity decreased for all genotypes compared to control plants, most markedly for the wild type (-62 %) and the least for P118 (-17 %), the decrease being intermediate for P64 and P121 (around -40 %) (Fig. 4.2b). Thus, following root pruning, nodule specific activity of P118 was the highest, the 3 other genotypes displaying similar values (Fig. 4.2b).

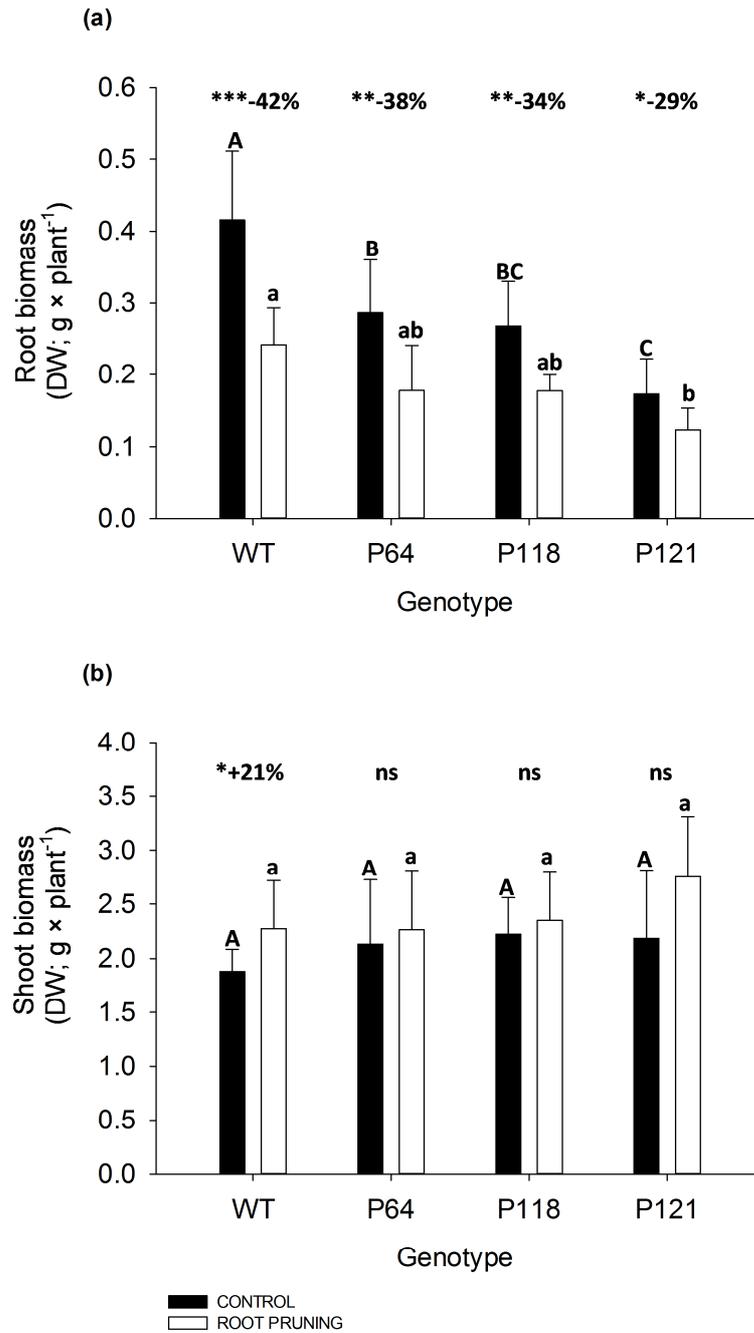


Fig. 4.3 Plant growth, as affected by root pruning for 4 pea genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121). (a) Root biomass and (b) shoot biomass, for control plants (“control”, black bar) and plants for which half of the roots were removed (“root pruning”, white bar), as measured eight days after root pruning. Vertical bars indicate standard deviation. Within each treatment, different letters denote significant differences between genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$).

Effect of root pruning on shoot, nodule, and root growth, eight days after root pruning.

Shoot biomass of control plants of the four genotypes was similar, as measured eight days after root pruning (Fig. 4.3b). This is in accordance with the fact that we selected hypernodulating lines for which the mutation had a mild effect on shoot growth. But below ground biomass of control plants contrasted among genotypes (Fig. 4.3a and Fig. 4.4a). Thus, the wild type Frisson had the highest proportion of nodule biomass over total plant biomass (22 %) and mutant P118 the lowest one (16 %) (Table 4.2), while mutants P64 and P121 displayed different and intermediate values. The wild type had the highest root biomass but the lowest nodule number and biomass. Thus, nodule biomass proportion within nodule biomass was the lowest for the wild type (21 %). Conversely, P121 displayed the smallest root biomass and the highest nodule number and biomass and therefore the highest nodule/ nodule biomass ratio (68 %). P64 and P118 had intermediate and similar values for root biomass and nodule number and biomass. Thus, at whole plant scale, P121 displayed the highest nodule proportion in total plant biomass (14 %) while the wild type displayed the lowest one (4 %) and P64 and P118 mutants had intermediate values (around 7 %) (Table 4.2). Thus, for control plants, the higher number of nodules and higher nodule biomass of mutants confirmed their hypernodulating status as compared to wild type.

For all genotypes, root pruning decreased both the proportion of nodule biomass over total plant biomass and the proportion of nodule biomass over total plant biomass, as compared to control plants (Table 4.2), by around -42 % and -44 % respectively.

However, these decreases were lower than those observed for the proportion of nodule biomass that was removed (more than 50 %). This may result either from depressed shoot growth or from higher nodule and/or root growth after root pruning, as compared to control plants. However, shoot growth of hypernodulating mutants was not affected following root pruning. Conversely shoot growth of wild type was slightly increased (+20 %) compared to that of control plants (Fig. 4.3b). As such, for hypernodulating mutants, main growth variations associated to root pruning were due to modifications of both root and/or nodule growth.

In order to measure the effect of root pruning on root and nodule re-growth capacity during the 8 days spanning from root pruning to plant harvest, we compared root or nodule biomass variation between plants with pruned roots and intact control plants to the proportion of nodule biomass removal (see Material and Methods). It appears that root pruning accelerated nodule growth of P121 and P118 hypernodulating mutants. Indeed, for the P118 mutant, the percentage of nodule biomass removal was 51 % (± 7 %). At harvest, nodule biomass of treated plants was only 37 % lower than that of control plants (Fig. 4a). Thus, this shows that following root pruning, nodule growth was moderately accelerated compared to control plants. Similarly, 8 days after root pruning, nodule biomass of root pruned P121 plants was only 39 % lower than control plants (Fig. 4.4a) while the percentage of nodule biomass removal was 67 % (± 12 %). Thus, for P121, following root pruning, nodule growth was also significantly accelerated compared to control plants. For the wild type and the mutant P64, nodule biomass difference between treated and control plants were of the same level as the

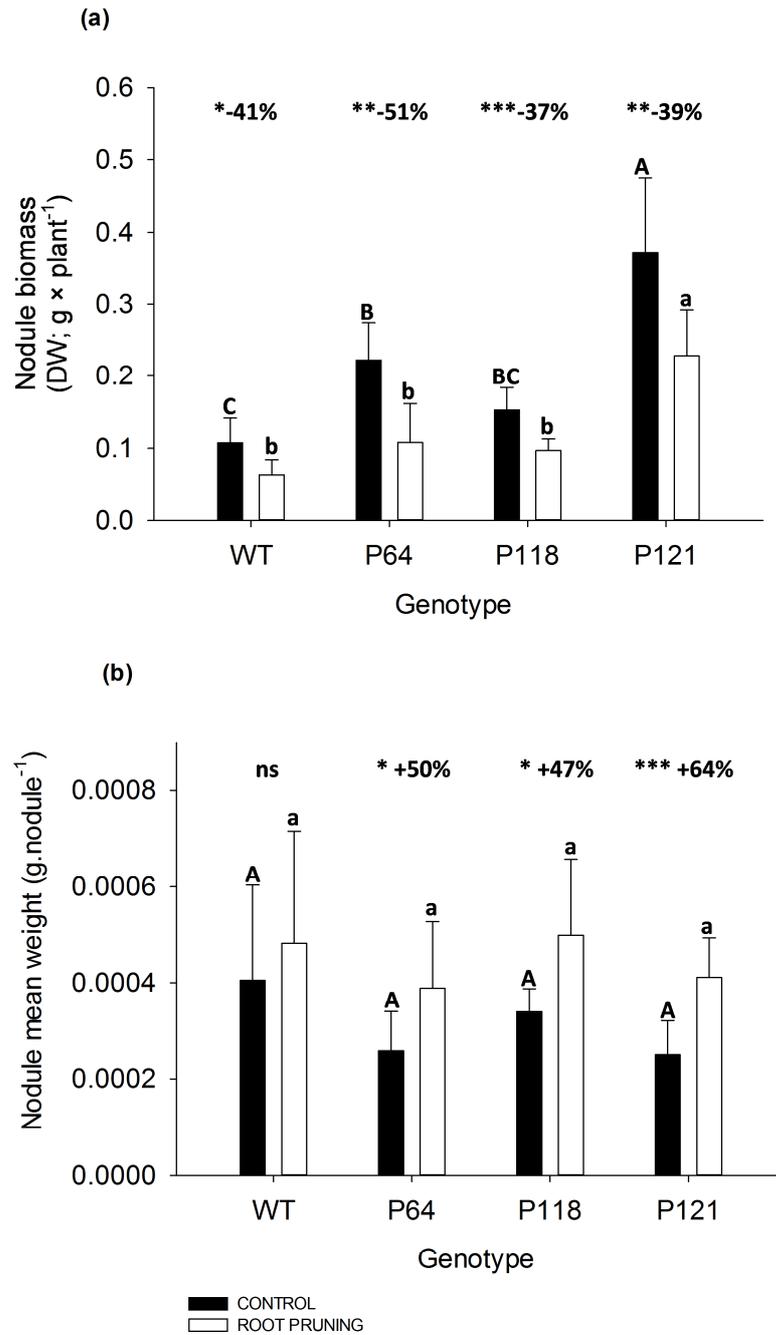


Fig. 4.4 Nodule growth, as affected by root pruning for 4 pea genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121). (a) Total nodule biomass and (b) nodule mean weight, for control plants (“control”, black bar) and plants for which half of the roots were removed (“root pruning”, white bar), as measured eight days after root pruning. Vertical bars indicate standard deviation. Within each treatment, different letters denote significant differences between genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$).

percentage of nodule biomass removal 8 days earlier (Fig. 4.4a). Hence, for the wild type and P64, we concluded that root pruning did not modify nodule growth.

The variation of nodule mean weight between treated plants and control intact plants can give additional indications on the impact of root pruning on nodule growth (Fig. 4.4b). Indeed, as the increase of nodule number with time was not modified in response to root pruning (Table 4.2), variations in nodule growth can be inferred from variations of nodule mean weight. For the hypernodulating mutants, nodule mean weight of plants with pruned roots was higher than that of intact control plants, while the difference was non significant for wild type (Fig. 4.4b).

Both measurements of nodule growth following root pruning (i.e. (1) nodule growth variation compared to the % of root pruning and (2) mean nodule weight) were consistent for 3 genotypes. Our results thus consistently showed an acceleration of nodule growth following root pruning for the mutants P118 and P121. For the wild type, they consistently showed no modification of nodule growth following root pruning, as compared to control plants. For the P64 genotype, nodule growth was shown to be unchanged following root pruning, despite the significant increase of nodule mean weight, as compared to control plants. Thus for P64, we concluded that variations of nodule growth following root pruning, if existing, were slight, or not significant.

As for the nodules, root growth variation following root pruning was analyzed using as a reference the percentage of root biomass removal at the time of pruning (Fig. 4.3a). For the wild type, this showed that root growth was not modified following root pruning compared to control plants whereas for the three hypernodulating mutants, root growth was accelerated following root pruning, most markedly for the P121 mutant (Results section 1; Fig. 4.3a).

Overall, results from root and nodule growth analysis are consistent with the data showing that root pruning did not or only slightly change nodule biomass proportion within nodulated roots for all genotypes except for P64 for which it was decreased (Table 4.2).

Effect of root pruning on photosynthetic carbon assimilation and its allocation to the biomass of roots and nodules.

The decrease of nitrogen uptake by symbiotic N₂ fixation caused by pruning of half of the root system (Fig. 4.2) could have reduced either leaf growth or carbon uptake capacity of the plants. Carbon assimilation into plant biomass was similar for the control plants of the four genotypes (Table 4.3). For all genotypes, following root pruning, there was no variation of leaf area compared to control plants, but a strong decrease in Specific Leaf Nitrogen (SLN; Table 4.3). Surprisingly, this SLN decrease was associated with an increase of leaf specific activity. This resulted in a significant increase in carbon assimilation rate into biomass for the P121 genotype compared to control plants, while no increase was observed for the wild type or for mutants P64 and P118 (Table 4.3).

Table 4.2 Below-ground phenotype of the nodulated roots as affected by root pruning for 4 pea genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121), for measurements made 8 days after root pruning

Treatment	Genotype	Biomass partitioning (g DW× g DW ⁻¹)						Nodule number	
		Nodulated root / Total plant		Nodule / Nodulated root		Nodule / Total plant			
Control	Wild Type	0.22	A	0.21	D	0.04	D	312	C
	P64	0.19	C	0.44	B	0.08	B	961	B
	P118	0.16	D	0.36	C	0.06	C	507	C
	P121	0.20	B	0.68	A	0.14	A	1877	A
Root pruning	Wild Type	0.12 (***)	a	0.21(ns)	d	0.02 (***)	d	169 (***)	b
	P64	0.11 (***)	a	0.39 (**)	b	0.04 (***)	b	355 (**)	b
	P118	0.10 (***)	b	0.35 (ns)	c	0.04 (***)	c	258 (***)	b
	P121	0.11 (***)	ab	0.65 (*)	a	0.07 (***)	a	619 (***)	a

Within each treatment, different letters denote significant differences between genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). For each treatment, the effect of root pruning was test using a two-tailed paired Student t test. * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

To further analyze plant growth modifications observed 8 days after root pruning, we then analyzed the effect of root pruning on carbon allocation patterns to the shoot, root and nodules: carbon partitioning between the shoots and nodulated roots and, subsequently, between roots and nodules within the root system (Table 4.4) were analyzed. We also considered carbon sink strength of each plant compartment (Table 4.4).

Except for P118, shoot sink strength for C was increased by 10 to 15 % compared to control plants, following root pruning (Table 4.4). Despite the removal of at least 50 % the plant root system, carbon partitioning to nodulated roots of pruned plants for the wild type and P64 was only reduced by 30 % and 21 % respectively, compared to that of control plants. More remarkably, this decrease was only 15 % for P121, and zero for P118 (Table 4.4). These results are consistent with the observed increase of root and nodule sink strength for C for each genotype following root pruning. For control plants, root and nodule sink strength was of similar magnitude for the wild type and P64. After root pruning, root and nodule sink strength of these 2 genotypes had increased compared to the control and remained constant. However for P64, the increase in root sink strength was greater than that of nodules. This resulted in a decrease of 25 % of the carbon partitioning to nodule biomass within the root system of mutant P64, while there was no variation for the wild type.

For P118 and P121, the slight decrease in carbon allocation to the root system biomass and the slight decrease of the carbon allocation to nodule biomass within the root system were associated with a large increase of the nodulated root sink strength (Table 4.4). In control plants, root sink strength was approximately two-fold lower in P118 and P121 than in the wild type and P64. Following root pruning, the sink strength of roots had increased by more than 120% for P118 and P121 (Table 4.4). However, root sink strengths of pruned P118 and P121 still remained lower than that of pruned wild type and P64. Similarly, the sink strength of nodules for C of P118 and P121 had increased by 60% and 80% respectively following root pruning. These increases were higher than those observed for the wild type and P64 (Table 4.4).

Discussion

Abiotic or biotic below-ground stresses can lead to local and temporary limitation of N₂ fixation. They can induce physical damage of nodules and/or only decrease their N₂ fixing capacity. The ability of N₂ fixing plants to react to a local and temporary decrease of their N₂ fixing capacity has been documented in *Medicago truncatula* (Jeudy et al. 2010). However, the impact of physical damage of nodulated roots on the N₂ fixation ability of legume plants has never been investigated. To our knowledge, our study describing the effect of root pruning of half of the root system of pea on its N₂ fixing capacity is the first of its kind.

Table 4.3 Shoot phenotype related to photosynthesis, as affected by root pruning for 4 pea genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121), for measurements made 8 days after root pruning

Treatment	Genotype	Carbon assimilation rate (ΔQ_C ; g C \times plant ⁻¹ \times day ⁻¹)		Leaf Area (cm ²)		Specific leaf nitrogen (SLN) ($\Delta Q_{N_{leaf}}$; mg N \times cm ⁻²)		Leaf specific activity (mg C \times day ⁻¹ \times cm ⁻²)	
Control	Wild Type	0.050	A	521	A	0.0077	B	0.096	B
	P64	0.058	A	477	A	0.0097	AB	0.120	A
	P118	0.045	A	441	A	0.0101	AB	0.099	B
	P121	0.060	A	520	A	0.0151	A	0.113	A
Root pruning	Wild Type	0.060 (ns)	ab	459	a	0.0013 (***)	c	0.132 (***)	b
	P64	0.064 (ns)	ab	415	a	0.0021 (*)	bc	0.155 (***)	a
	P118	0.048 (ns)	b	421	a	0.0054 (*)	a	0.115 (**)	c
	P121	0.082 (*)	a	527	a	0.0047 (***)	ab	0.154 (***)	a

Within each treatment, different letters denote significant differences among genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). For each treatment, the effect of root pruning was test using a two-tailed paired Student t test. * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$). For Specific leaf nitrogen (SLN), N in leaves is measured using ¹⁵N labeling ($\Delta Q_{N_{leaf}}$) during the labeling period

Impact of root pruning on N₂ fixation

Interestingly, our results show that for all genotypes, root pruning induced a strong decrease in daily N₂ fixation rate. This was associated both with the decrease of nodule biomass induced by root pruning, and with a decrease of nodule specific activity for N₂ fixation (ε Fig. 4.2b). In the short term, for all genotypes, this did not induce any decrease of shoot growth, and the short term growth response to root pruning was characterized by a substantial increase in root and nodule sink strength for new photosynthetic C assimilation in their biomass (Table 4.4). But, importantly, both the extent of the negative impact of root pruning on nodule specific activity (Fig. 4.2b) and the magnitude of the growth modifications varied among genotypes (Fig. 4.4). Compared to control plants, wild type Frisson displayed the highest decrease in N₂ fixation rate following root pruning (-79 %). This was associated with the highest decrease of nodule specific activity and with the lowest nodule growth response to root pruning. Of the mutants, P118 displayed the highest tolerance to root pruning, having the lowest decrease in N₂ fixation rate (only -46 %), associated with modification of both nodule specific activity and nodule growth in response to root pruning. P64 and P121 showed an intermediate tolerance to root pruning (decrease of N₂ fixation (ΔQN) of around -65%), mainly involving modification of nodule growth.

In our study, the negative impact of root pruning on nodule specific activity for N₂ fixation was lower for hypernodulating mutants (-17 % to -41 % compared to control plants) than for wild type (-62 %) (Fig. 4.2b). This may be attributed to the fact that nodule specific activity of control plants of hypernodulating mutants was lower than that of wild type, as previously reported (Schuller et al. 1988; Voisin et al. 2007; Jeudy et al. 2010). This was interpreted as a systemic N regulation, which compensates for the excess nodule biomass induced by the nod⁺⁺ mutation (Jeudy et al. 2010). In our study, root pruning resulted in the reduction of nodule specific activity to similar values for wild type and hypernodulating mutants; as a consequence, the negative impact of root pruning was less for the mutants. Still, for the P118 genotype, despite initial values being similar to other hypernodulating mutants for control plants, nodule specific activity was only slightly modified by root pruning (-17%). Compared to other genotypes, this could be interpreted as a greater functional ability of its N₂ fixing apparatus to withstand root pruning. Nevertheless, the physiological determinants of this better resistance remain to be elucidated.

For all genotypes, the unexpected decrease of nodule specific activity following root pruning may be explained by additional effects of root reduction on the nutrient uptake. Indeed, the loss of half of the roots could have induced water stress or nutrient deficiency other than nitrogen, thus indirectly limiting the N₂ fixing ability of nodules. In support of this hypothesis, it was shown in wheat that root pruning induced a decrease in whole-plant transpiration, due to the reduced size of the root system (Aldahadha et al. 2012). Those authors also showed that root pruning had no effect on leaf stomatal conductance, which is also in accordance with our results showing photosynthesis is maintained compared to intact control plants 5 days after root pruning. Another study from Yang et al. (2012) on Chinese jujube tree has shown that root pruning induced a decrease in nitrogen, phosphorus and potassium concentrations in leaves. Thus, the decrease of those nutrients in pruned plants,

Table 4.4 Allocation of new photosynthetic C among the biomass of shoot, roots and nodules, as affected by root pruning for 4 pea genotypes: wild Type Frisson and 3 of its hypernodulating mutants (P64, P118 and P121). Measurements were made 5 days after root pruning

Treatment	Génotype	Partitioning of new photosynthetic C (g C × g C ⁻¹)				Sink strength for C (g C × day ⁻¹ × g DW ⁻¹)					
		Nodulated root / Total plant		Nodule / Nodulated root		Shoot		Root		Nodule	
Control	Wild Type	0.27	A	0.29	D	0.020	B	0.023	A	0.037	B
	P64	0.24	A	0.64	B	0.021	AB	0.018	B	0.043	A
	P118	0.13	C	0.54	C	0.018	C	0.009	C	0.020	D
	P121	0.20	B	0.87	A	0.022	A	0.010	C	0.028	C
Root pruning	Wild Type	0.18 (***)	ab	0.29 (ns)	c	0.022 (**)	b	0.032 (***)	b	0.050 (***)	b
	P64	0.19 (**)	a	0.48 (***)	b	0.024 (*)	ab	0.037 (***)	a	0.055 (***)	a
	P118	0.14 (ns)	c	0.49 (*)	b	0.018 (ns)	c	0.020 (***)	c	0.034 (***)	c
	P121	0.17 (**)	b	0.80 (**)	a	0.025 (**)	a	0.025 (***)	d	0.050 (***)	b

Within each treatment, different letters denote significant differences among genotypes (Tukey test, $P \leq 0.05$). For each treatment, the effect of root pruning was test using a two-tailed paired Student t test. * represented a significant difference (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

especially phosphorus, could have had a deleterious effect on N₂ fixation in our experiment (Schulze et al. 2006; Miao et al. 2007; Qiao et al. 2007; Chaudhary et al. 2008; Bargaz et al. 2011).

Growth modifications induced by root pruning.

For the wild type, the plant response to root pruning that we observed here only involved a slight increase of nodule sink strength for carbon (+ around 30 %; Table 4.4); but this did not induce any acceleration of nodule growth in the short term (Fig. 4.4). These results are in accordance with the response of N₂ fixation to local deprivation of N₂, as previously described for *Medicago truncatula* (Jeudy et al. 2010). In that study, local N₂ deprivation also induced the stimulation of nodule sink strength in the short term, and couple with the stimulation of nodule growth and the development of new nodules in the long term. This response was interpreted as a systemic response to N deficiency, and it is likely that root pruning can also stimulate pea nodule development in the long term. In response to root pruning, the increase of nodule sink strength for C of P64 was similar to that of the wild type and, similarly, it did not accelerate nodule growth as measured 8 days after root pruning. Nodule growth responses of P118 and P121 were far higher (+ around 60 % and 80 %, respectively as compared to control plants); and they were associated with a significant acceleration of nodule growth, as observed 8 days after root pruning.

For all genotypes, the increase in nodule sink strength for C was accompanied by increased root sink strength, with differences among genotypes (Table 4.4). The magnitude of the increase in root sink strength was approximately twice that of nodules on hypernodulating mutants, but similar to wild type nodules. For P64, this resulted in an acceleration of root growth, eight days after root pruning (Fig. 4.3a). As this was not associated with any acceleration of nodule growth, it resulted in a decreased proportion of nodule biomass within nodulated root biomass, as compared to control plants eight days after root pruning (Table 4.2). For the 3 other genotypes, root pruning accelerated total root growth to a similar extent to that of total nodule growth, as measured eight days after root pruning (null for wild type, moderate for P118, high for P121). For those three genotypes, this maintained the proportion of nodule in nodulated root biomass, compared to control plants eight days after root pruning.

This is the first report of a root phenotype for the *SYM28* mutation (P64) in contrast to *SYM29* (P118) and *NOD3* (P121). P64 was the only genotype for which a root growth response was not proportional to nodule growth response to root pruning. This information suggests a different AON role of *SYM28* to that of *SYM29* and *NOD3* on root/nodule equilibrium. Beside their interactions in the nodulation signaling (Oka-Kira and Kawaguchi 2006), the effects of these genes are complicated by their particular roles in plant development. In this context, *SYM28* mutants display a fasciation of shoot apex in pea (Sagan and Duc 1996; Krusell et al. 2011) while *Mtr* mutants of orthologs of *SYM29* and *NOD3* display a shorter root length even in the absence of Rhizobia (Schnabel et al. 2011). Even if the underlying mechanisms involved are yet to be unraveled, the fact that the root phenotype

associated to the *SYM28* mutation may be less correlated to the nodule phenotype than for other mutants supports the need for further physiological studies of these mutants.

P118 and P121 hypernodulating mutants displayed the greatest response to root pruning, with different strategies. Control plants of P118 and P121 displayed lower initial values of root and nodule sink strength for C than P64 and the wild type (Table 4.4). Root pruning resulted in the increase in sink strength of both roots and nodules to similar values for all genotypes. The reason why all genotypes attained similar values is unknown; but this may indicate a maximal sink strength capacity for carbon that would represent a maximal growth rate capacity. This may confer to P118 and P121 a greater potential for nodule growth response to any stress. This hypothesis is supported by the fact that despite the removal of more than 50 % of the root system, the proportion of photosynthetic C allocated to the remaining nodulated roots was equal or close to that of control plants for P121 and P118, respectively, whereas it was 20 and 30 % lower than control plants for P64 and wild type, respectively. However, nodule sink strength for C did not totally attain this “maximal” sink strength capacity. This may be due to competition for carbon between N_2 fixation and nodule growth for this genotype, as previously suggested (Voisin et al. 2003b; 2007). In the short term, the P118 strategy, combining a potential N_2 fixation response and moderate nodule growth response, proved here to be the most efficient for withstanding root pruning.

Impact of root pruning on photosynthetic C assimilation into biomass and shoot growth.

As the photosynthetic enzyme rubisco is the most abundant protein in the shoot (Chapin et al. 1987; Evans and Seemann 1989), leaf N concentration (as expressed on a surface basis by Specific Leaf nitrogen, SLN) is a strong determinant of photosynthesis. As expected, the decrease in the N_2 fixation (ΔQN) rate resulted in a decreased SLN measured eight days after root pruning (Table 4.3). Surprisingly, for all 4 genotypes, this was associated with a higher leaf specific activity of photosynthesis which, as calculated here, represents leaf efficiency for net C accumulation into biomass. This efficiency may vary depending upon the amount of photosynthetic C that is respired. As nodule respiratory costs are known to be higher than those of roots and shoots (Layzell et al. 1981; Voisin et al. 2003a, 2003c), this efficiency could vary according with the proportion of nodules in total plant biomass. In our experiment, for each genotype, the increase of the leaf specific activity was associated with a decrease in the proportion of nodule biomass in total biomass of about 40 to 50% due to root pruning. Thus, the potential decreased efficiency of gross photosynthesis due to decreased SLN may have been counterbalanced by the increase of net C assimilation into biomass induced by the loss of nodules. In addition, in the short term, root pruning had no impact on leaf area for all genotypes. Consequently, eight days after root pruning, decreased N_2 fixation had only a slight impact on global growth (Fig. 4.3b), considering its slight effect on total carbon assimilation into biomass (Table 4.3).

Conclusion

Our analysis conducted at the whole-plant level showed that the ability of the N₂ fixing apparatus to withstand stresses induced by root pruning was globally higher for hypernodulating mutants than for wild type. Among hypernodulating genotypes, P118 and P121 mutants reacted more efficiently to root pruning than both the P64 mutant and wild type Frisson. Thus, even if root pruning increased nodule sink strength for C for all of the genotypes, it did not induce any increase of nodule growth in the short term for the wild type and P64 mutant. In contrast, for P118 and P121 mutants respectively, high and moderate accelerations of both nodule and root growth could be measured eight days after root pruning. Interestingly, in response to root pruning, mutant P64 displayed an increase of root growth without affecting nodule growth. For P118 only, root and nodule growth response to root pruning was accompanied by a more tolerant N₂ fixation to root pruning. In the short term, the P118 genotype was therefore the one for which the N₂ fixation apparatus withstood best root pruning. Altogether, our study thus provides new insights for searching mechanisms and genes involved in legume's ability to tolerate this kind of below-ground stress. Nevertheless, the ability of hypernodulating mutants to withstand root pruning should be further investigated over the whole growth cycle and in the field.

Acknowledgements

Ours grateful thanks are due to Vincent Durey, Patrick Mathey, Anne-Lise Santoni, and Sylvie Girodet for their technical assistance. We also thank Anouk Zancarini, Annabelle Larmure, Marion Prudent, Stephen Marle and Charlotte Ollagnier for either their advice or help during the experiments. We thank the greenhouse staff for managing the experiments. We finally thank Richard Thompson and Sergio Ochatt for critical readings of this manuscript. This work was partly funded by the French National Institute of Agronomical Research (INRA), UNIP and Burgundy Region.

References

L'ensemble des références de l'article ont été regroupée à la fin de la thèse dans la section « Références bibliographiques ».

Tableau 5.1 Caractérisation de l'état initial phénotypique avant l'application des traitements dans les 3 expériences des 4 géotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.

Teneur atmosphérique en CO ₂	Géotype	Biomasse totale (g.plante ⁻¹)		Surface foliaire (cm ² .plante ⁻¹)		Surface foliaire / Biomasse Totale (cm ² .g ⁻¹ plante)	
150ppm	Sauvage	1.76 (**)	a	419 (*)	ab	241 (ns)	a
	P64	1.63 (**)	a	360 (**)	b	230 (ns)	a
	P118	2.34 (ns)	b	471 (**)	a	220 (ns)	a
	P121	1.66 (ns)	a	373 (*)	b	231 (ns)	a
380ppm	Sauvage	2.13	a	489	a	232	a
	P64	2.12	a	467	a	222	ab
	P118	1.92	a	372	b	195	b
	P121	1.83	a	452	ab	248	a
750ppm	Sauvage	1.95 (ns)	a	533 (ns)	a	278 (**)	a
	P64	1.86 (ns)	a	459 (ns)	a	254 (*)	ab
	P118	1.94 (ns)	a	436 (ns)	a	226 (**)	b
	P121	2.07 (ns)	a	541 (ns)	a	264 (ns)	a

Chaque valeur représente la moyenne calculée sur 10 plantes. Au sein de chaque traitement, une lettre différente reflète une différence significative entre géotype (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). La différence entre expérience a été testée en utilisant une comparaison 2 à 2 par un test de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

5 Caractérisation de l'état initial des différents génotypes avant l'application des traitements et caractérisation des traitements ablation et CO₂ dans les 3 expériences

L'impact de l'ablation d'une partie des racines nodulées sur la fixation symbiotique d'azote et la croissance des plantes a été étudié en utilisant 3 teneurs en CO₂ atmosphérique différents, dans des expériences successives menées à 150 ppm, 380 ppm et 750 ppm. Les traitements « faible » ou « fort » CO₂ atmosphériques ont eu lieu à partir de l'ablation d'une partie du système racinaire des plantes, (réalisée en fin de phase végétative) et maintenus jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ces expériences seront dénommées par la suite « expérience 150 ppm », « expérience 380 ppm » et « expérience 750 ppm ».

Afin de comparer l'impact d'une modification de la teneur en CO₂ de l'atmosphère sur les 4 génotypes avec les résultats obtenus dans les différentes expériences, il a été nécessaire au préalable de vérifier l'homogénéité des plantes à l'état initial, avant traitement ainsi que l'homogénéité et du traitement « ablation » entre les 3 expérimentations.

5.1 *Caractérisation de l'état initial des génotypes avant l'application des traitements dans les 3 expériences*

Nous avons comparé, en fin de phase végétative avant l'application des traitements CO₂ et ablation des racines, l'état initial des plantes des 4 génotypes dans les expériences 150 ppm et 750 ppm à celui des plantes de l'expérience 380 ppm. Cette comparaison a été effectuée sur la base de différents traits phénotypiques.

Croissance totale des plantes : La biomasse totale des 4 génotypes mesurée dans l'expérience 750 ppm était similaire à la biomasse des plantes de l'expérience 380 ppm (Tableau 5.1). Dans l'expérience 150 ppm, les mutants P118 et P121 ont montré une biomasse totale des plantes similaires à celle de l'expérience 380 ppm. En revanche, pour le sauvage et le mutant P64, la biomasse totale était inférieure dans l'expérience 150 ppm, comparée à l'expérience 380ppm, de -17 % et -23 % respectivement.

Dans l'expérience à 750 ppm, comme dans l'expérience à 380 ppm, la biomasse totale des 4 génotypes était similaire en fin de phase végétative. Dans l'expérience 150 ppm la biomasse totale du mutant P118 était significativement supérieure à celle des 3 autres génotypes (+25% par rapport au sauvage).

Surface foliaire : La surface foliaire (exprimée en cm².plante⁻¹) du sauvage et des mutants P64 et P121 était significativement plus faible dans l'expérience 150 ppm (respectivement de -14%, -23% et -17%) comparée à l'expérience 380 ppm alors que l'inverse était observé pour le mutant P118 (+27%) (Tableau 5.1). La surface foliaire des 4 génotypes mesurée dans l'expérience 750 ppm était similaire à la surface foliaire des plantes

Tableau 5.2 Caractérisation de la répartition de la biomasse entre compartiment à l'état initial avant l'application des traitements dans les 3 expériences des 4 génotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.

Teneur atmosphérique en CO ₂	Génotype	Répartition de la biomasse (g.g ⁻¹)						Nombre de nodosités / Biomasse Totale (.g plante ⁻¹)	
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Nodosités / Plante entière			
150ppm	Sauvage	0.18 (***)	b	0.14 (***)	c	0.03 (***)	d	292 (ns)	bc
	P64	0.19 (*)	a	0.33 (ns)	b	0.07 (**)	b	425 (ns)	bc
	P118	0.17 (ns)	b	0.31 (ns)	b	0.06 (ns)	c	221 (*)	c
	P121	0.18 (***)	ab	0.53 (ns)	a	0.10 (***)	a	681 (ns)	a
380ppm	Sauvage	0.21	a	0.18	c	0.04	d	232	c
	P64	0.18	b	0.33	b	0.06	b	402	b
	P118	0.16	c	0.32	b	0.05	c	343	bc
	P121	0.15	d	0.53	a	0.08	a	779	a
750ppm	Sauvage	0.19 (**)	a	0.15 (**)	c	0.03 (***)	d	188 (ns)	c
	P64	0.20 (*)	a	0.32 (ns)	b	0.06 (*)	b	290 (ns)	ab
	P118	0.18 (**)	b	0.31 (ns)	b	0.05 (ns)	c	217 (**)	bc
	P121	0.16 (**)	c	0.56 (**)	a	0.09 (***)	a	357 (***)	a

Chaque valeur représente la moyenne calculée sur 10 plantes. Au sein de chaque traitement, une lettre différente reflète une différence significative entre génotype (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). La différence entre expérience a été testée en utilisant une comparaison 2 à 2 par un test de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

de l'expérience 380 ppm. La biomasse totale des génotypes sauvages et P64 étant différente entre les expériences 150 ppm et 380 ppm, nous avons relativisé la surface foliaire de chaque génotype par la biomasse totale des plantes (exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ plante) (Tableau 5.1). Ainsi, à 150 ppm, la surface foliaire par gramme de plante des 4 génotypes était similaire à la celle de l'expérience 380 ppm. Dans l'expérience 750 ppm, la surface foliaire par gramme de plante était significativement supérieure chez le sauvage et les mutants P64 et P118 (respectivement de +20%, +14% et +16%) comparée à l'expérience 380 ppm alors qu'aucune différence n'était observée pour le mutant P121.

Dans l'expérience 150 ppm, la surface foliaire par gramme de plante était similaire entre génotypes. Dans les expériences 750 ppm et 380 ppm, la surface foliaire par gramme de plante du mutant P118 était significativement la plus faible des 4 génotypes (-19% et -16% par rapport au sauvage respectivement).

Proportion des racines nodulées : Entre expérimentations, de légères variations de répartition de biomasse étaient observables entre les racines nodulées et les parties aériennes des différents génotypes. Chez le sauvage la proportion de racines nodulées était comprise entre 18 et 21% de la biomasse totale de la plante (Tableau 5.2). Chez les mutants hypernodulants, la proportion de racines nodulées représentait de 18 à 20% de la biomasse totale de la plante chez P64, de 16 à 18% chez P118 et 15 à 18 % chez le P121.

Au sein de chaque expérience, le génotype P121 présentait toujours le % de racines nodulées le plus faible, la valeur des autres génotypes étant supérieure ou égale, selon les expériences (Tableau 5.2).

Proportion de biomasse des nodosités : Quelle que soit l'expérimentation, la proportion de nodosités au sein des racines nodulées est très différente entre génotypes et plus importante chez les 3 mutants, confirmant leur statut d'hypernodulants (Tableau 5.2). Le génotype sauvage montrait la plus faible proportion de nodosités avec de 14 à 18 % de la biomasse des racines nodulées, avec 188 à 292 nodosités par gramme de plante soit de 3 à 4 % de la biomasse totale. Le mutant P121 montrait la plus forte proportion de nodosités des 4 génotypes avec de 53 à 56 % de la biomasse des racines nodulées, avec 357 à 779 nodosités par gramme de plante soit de 8 à 10 % de la biomasse totale. Les mutants P64 et P118 présentaient un phénotype nodulaire intermédiaire (et similaire) avec une proportion de nodosités dans la biomasse des racines nodulées de 31 à 33% et un nombre de nodosités de 217 à 425 nodosités par gramme de plante soit de 5 à 7% de la biomasse totale.

Par conséquent, bien que les expériences aient été conduites de manière à obtenir des plantes les plus homogènes possible avant l'application des traitements, ces résultats concernant les biomasses des différents compartiments ou bien le nombre des nodosités nécessitera une normalisation par la biomasse des plantes. Comme les mesures de biomasse des nodosités relatives à la biomasse des racines nodulées étaient comparables au sein des 3 expériences, elles pourront être utilisées pour des comparaisons de ce trait phénotypique entre expériences.

Tableau 5.3 Caractérisation du traitement ablation dans les 3 expériences chez 4 géotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.

Teneur en CO₂ atmosphérique	WT	P64	P118	P121	moyenne intra-expérience
150ppm	62% (±10)	45% (±10)	50% (±7)	57% (±10)	54% (±11)
380ppm	53% (±14)	56% (±12)	51% (±7)	67% (±12)	57% (±12)
750ppm	57% (±9)	46% (±10)	46% (±5)	54% (±8)	51% (±10)
moyenne intra - géotype	57% (±11)	48% (±11)	49% (±7)	59% (±11)	53% (±11)

Chaque valeur représente la proportion de racines nodulées retirée lors de l'ablation estimée sur 10 plantes.

5.2 Caractérisation du traitement ablation dans les 3 expériences

Chez le sauvage, la perte moyenne de biomasse des racines nodulées suite à l'ablation, et mesurée en fin de phase végétative, variait de 53 et 62 % dans les 3 expériences (Tableau 5.3). Chez les mutants hypernodulants, la perte de biomasse des racines nodulées était comprise entre 46 et 56 % chez le P64, 46 et 51% chez le P118 et 54 et 67 % chez le P121.

Considérant la variabilité entre les plantes au sein des 4 génotypes et/ou des 3 expérimentations, nous n'avons pas observé de différences significatives du pourcentage d'ablation entre les expérimentations pour un même génotype, ou entre génotypes au sein d'une même expérimentation. Ainsi, en moyenne, sur l'ensemble des génotypes et des expériences, l'ablation des racines nodulées a ainsi conduit à une perte moyenne de 53 % de la biomasse des racines nodulées.

5.3 Caractérisation du traitement CO₂ dans les 3 expériences

Trois teneurs atmosphériques en CO₂ ont été utilisées dans des expériences successives afin de faire varier la photosynthèse foliaire.

Des études préliminaires ont permis de mesurer les variations de la photosynthèse nette en fonction de la teneur atmosphérique en CO₂. Pour ce faire, comme lors des expériences réalisées par la suite, 80 plantes de pois (*Pisum sativum*) réparties parmi les différents génotypes (Frisson sauvage et ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121) ont été placées à 20°C dans la chambre de marquage hermétiquement close. La teneur en CO₂ de l'enceinte a été fixée à 900ppm. En absence de régulation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère, la teneur en CO₂ a naturellement diminué du fait de l'assimilation nette du CO₂ par les plantes lors de la photosynthèse. Des mesures de la teneur en CO₂ dans la chambre de marquage ont été effectuées toutes les minutes pendant 4h30 jusqu'à atteindre une valeur de 140ppm. La photosynthèse nette a été calculée comme la valeur de la pente de la courbe entre la teneur en CO₂ de l'atmosphère et le temps, en différents points, par intervalle de 50 ppm donnant la vitesse de consommation nette de CO₂ par unité de temps (en -ppm. mn⁻¹).

Ainsi, la photosynthèse nette (exprimée en mmole de CO₂ consommée par minute) a augmenté avec la teneur en CO₂ (exprimée en ppm) jusqu'à atteindre un plateau pour une teneur de l'atmosphère de 650 ppm de CO₂ (Figure 5.1). Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation de 3 différentes teneurs atmosphériques en CO₂: une teneur de 380 ppm qui est la teneur atmosphérique en CO₂ ambiante, 150 ppm qui d'après nos études préliminaires abouti à une réduction de la photosynthèse de 50 % et enfin 750 ppm, permettant d'augmenter la photosynthèse d'environ 30 %.

Lors des 3 expérimentations réalisées en chambre de marquage, nous avons vérifié des valeurs similaires de photosynthèse nette étaient obtenues avec les 3 teneurs atmosphériques en CO₂ que nous avons choisies (Figure 5.2). Pour chaque expérimentation, lors de la journée d'acclimatation dans la chambre de marquage (1^{ère} photopériode de 10h suivant l'ablation d'une partie des racines nodulées), des mesures de décroissance de la teneur en CO₂ avec le temps ont été effectuées sur l'ensemble des plantes présentes dans la chambre de marquage, comprenant les 4 génotypes de pois Frisson : le génotype sauvage et les 3 mutants

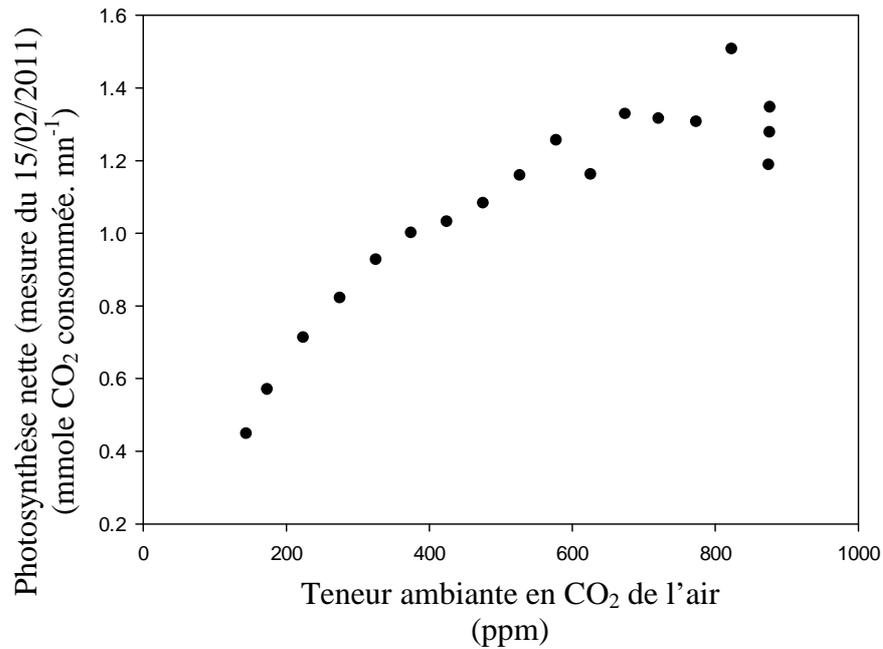


Figure 5.1 **Photosynthèse nette mesurée le 15 février 2011 chez les 4 génotypes de pois : le sauvage Frisson et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La photosynthèse nette (en mmole CO₂ consommée.mn⁻¹) a été mesurée dans l'enceinte de la chambre de marquage hermétiquement close à 20°C sur 80 plantes réparties entre 4 génotypes différents (Frisson sauvage et 3 de ses mutants : P64, P118 et P121).

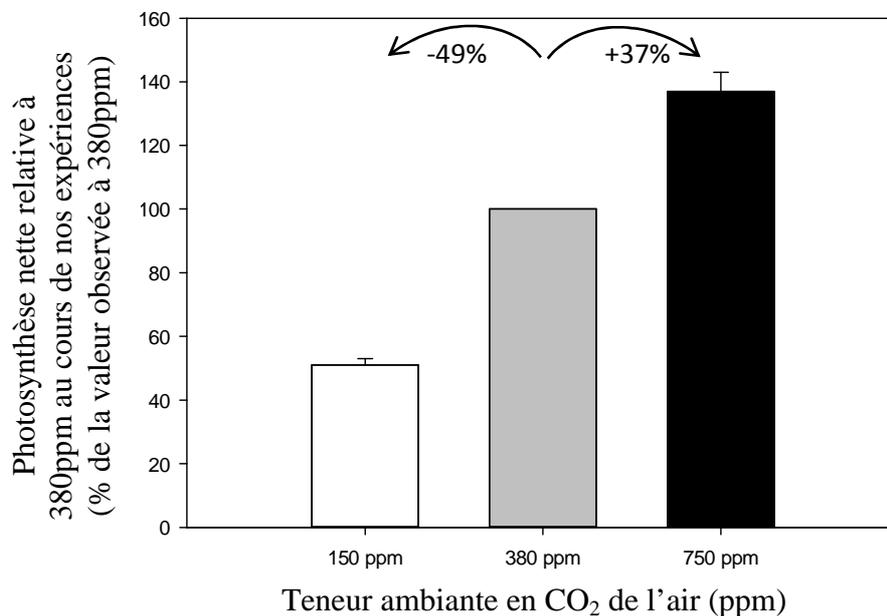


Figure 5.2 **Photosynthèse nette relative chez les 4 génotypes de pois : le sauvage Frisson et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La photosynthèse nette a été mesurée en mg C.mn⁻¹ dans l'enceinte de la chambre de marquage hermétiquement close à 20°C sur 80 plantes réparties entre 4 génotypes différents (Frisson sauvage et 3 de ses mutants : P64, P118 et P121) dans l'expérience 150 ppm (barre blanche), l'expérience 380 ppm (barre grise) et dans l'expérience 750 ppm (barre noire).

hypernodulants. La photosynthèse nette a été calculée comme la pente de la relation linéaire décroissante entre le CO₂ et le temps pour des valeurs de ± 20 ppm autour de la valeur cible.

Pour l'expérience qui devait être réalisée à 750 ppm, les plantes ont été exposées à une teneur atmosphérique en CO₂ de 800 ppm que l'on a laissée décroître par photosynthèse des plantes jusqu'à 700 ppm. La valeur de la photosynthèse nette à 750 ppm a été ensuite calculée pour les valeurs comprises entre 770 et 730 ppm. On a ensuite laissée chuter la teneur en CO₂ de l'atmosphère jusqu'à 350 ppm, pour calculer la photosynthèse nette à 380 ppm, comme indiqué précédemment. Enfin, dans l'expérience à 150 ppm, des mesures similaires de la photosynthèse nette ont été réalisées pour les valeurs cibles de 380 ppm (teneur en CO₂ initiale) et 150 ppm (traitement CO₂ appliqué).

Pour chaque expérience, les résultats (Figure 5.2) présentent la valeur de la photosynthèse nette, en valeur relative de la valeur mesurée au sein d'une même expérience à 380 ppm, de façon à s'affranchir des variations de croissance des plantes (et donc de surface foliaire) entre les expériences.

Nos mesures montrent que la photosynthèse nette a été augmentée de +37 % à 750 ppm par rapport à la valeur témoin de 380 ppm, et réduite de -49% à 150 ppm par rapport à la valeur témoin de 380 ppm.

6 Réponse adaptative des 4 géotypes de pois protéagineux à une modification de la teneur atmosphérique en CO₂.

Dans le cadre de nos travaux, les plantes de pois ont été exposées à 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes, à la fin de la phase végétative, lors de 3 expériences successives. En réponse à la modification à la teneur en CO₂, les modifications observées concernant la croissance et la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique ont été analysées pour un géotype sauvage de pois (Frisson) et trois de ses mutants hypernodulants. La teneur atmosphérique en CO₂ de 380 ppm a été utilisée comme témoin.

- La teneur en CO₂ de 150 ppm a conduit à une diminution moyenne de la photosynthèse nette (des parties aériennes) de 49 % pour l'ensemble des géotypes mesurés (Partie 5. Figure 5.2). Cette diminution pourrait induire pour chaque géotype une activité photosynthétique des feuilles plus faible qu'à 380 ppm, conduisant à réduire la quantité de biomasse accumulée. Afin de compenser cette diminution de l'activité spécifique photosynthétique, la plante peut choisir comme stratégie d'accroître sa surface foliaire, ce qui induirait une augmentation de l'allocation de C vers les parties aériennes. La réduction concomitante de la quantité de C alloué aux parties souterraines pourrait induire une plus faible activité spécifique de fixation symbiotique d'azote et/ou un ralentissement de la croissance des racines et des nodosités.

- La teneur en CO₂ de 750 ppm a induit une augmentation moyenne de la photosynthèse nette des parties aériennes de 37 % (Partie 5. Figure 5.2) pour l'ensemble des géotypes mesurés. Il y aura alors un rééquilibrage fonctionnel entre l'acquisition d'N et de C. Afin d'adapter le prélèvement d'azote à cette augmentation de l'assimilation carbonée, la plante peut allouer une quantité plus importante du C assimilé photosynthétiquement vers son système racinaire dans son ensemble, ou bien selon le mode de nutrition azotée (ie assimilation de l'azote minéral du sol ou bien fixation symbiotique de l'azote atmosphérique) spécifiquement vers les racines ou les nodosités. Pour des plantes reposant exclusivement sur la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, une augmentation de l'allocation de C vers les parties souterraines pourrait conduire à augmenter la fonction de fixation symbiotique de N₂ (via effet sur l'activité spécifique de fixation symbiotique) ou bien la croissance des structures souterraines (via allongement des racines et/ou formation de nodosités). Ce traitement expérimental permettrait de tester l'hypothèse selon laquelle l'activité spécifique de fixation symbiotique serait limitée par la disponibilité en assimilats carbonés.

L'hypernodulation ayant provoqué une rupture de la régulation de la formation du nombre des nodosités, l'impact d'une modification de la teneur en CO₂ est susceptible de varier entre le géotype sauvage et les mutants hypernodulants.

Tableau 6.1 Impact d'une modification de la teneur en CO₂ sur le phénotype aérien et la photosynthèse foliaire des 4 géotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. Mesures effectuées 8 jours après le début du traitement CO₂.

Teneur en CO ₂ atmosphérique	Géotype	Assimilation du carbone dans la biomasse (g C.g plante ⁻¹ .jour ⁻¹)		Surface foliaire (cm ² .g ⁻¹ plante)		Activité spécifique de photosynthèse (mg C.jour ⁻¹ .cm ⁻²)	
150 ppm	Sauvage	0.016 (**)	A	240 (ns)	a	0.068 (***)	A
	P64	0.015 (***)	A	231 (**)	ab	0.067 (***)	A
	P118	0.012 (*)	B	203 (**)	b	0.058 (***)	B
	P121	0.012 (***)	B	221 (ns)	ab	0.052 (***)	C
380 ppm	Sauvage	0.021	AB	219	a	0.096	B
	P64	0.022	A	186	ab	0.120	A
	P118	0.017	B	166	b	0.099	B
	P121	0.022	A	198	ab	0.113	A
750 ppm	Sauvage	0.022 (ns)	B	224 (ns)	a	0.114 (*)	B
	P64	0.030 (***)	A	172 (ns)	b	0.180 (***)	A
	P118	0.020 (ns)	B	184 (ns)	b	0.112 (ns)	B
	P121	0.022 (ns)	B	194 (ns)	ab	0.118 (ns)	B

Chaque valeur représente la moyenne calculée sur 8 plantes. Au sein de chaque traitement, une lettre différente reflète une différence significative entre géotype (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet d'une modification de la teneur atmosphérique en CO₂ a été testé en utilisant une comparaison 2 à 2 par un test de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

6.1 Impact sur la nutrition carbonée

L'impact d'une modification de la teneur atmosphérique en CO₂ sur l'activité photosynthétique des feuilles et sur l'assimilation de C dans la biomasse a été mesuré à l'aide d'un marquage isotopique au ¹³C réalisé 5 jours après le début du traitement CO₂, et analysé sur des plantes prélevées 8 jours après le début du traitement CO₂. Afin de comparer les résultats des 3 expériences, l'assimilation de C dans la biomasse a été rapportée à la biomasse des plantes, exprimée en g C.g⁻¹ plante.jour⁻¹ (Tableau 6.1). Elle a été exprimée comme le produit de l'activité spécifique des feuilles (en mg C.jour⁻¹.cm⁻²), par la surface foliaire des plantes (en cm² feuilles.g⁻¹ plante) (Tableau 6.1). L'impact des modifications de la teneur en CO₂ de l'atmosphère sur la répartition du carbone entre compartiments a été présenté dans le tableau 6.2. Les variations observées dans les expériences 150 ppm et 750 ppm, par rapport à l'expérience 380 ppm, ont été récapitulées dans le tableau 6.3 (en prenant en comptes les différences éventuelles dues à des différences d'état initial des plantes avant application des traitements CO₂).

6.1.1 Impact sur l'activité photosynthétique et sur l'assimilation de C dans la biomasse

- Après exposition pendant 7 jours à une teneur en CO₂ de 150 ppm (« expérience 150 ppm »), une plus faible activité spécifique de photosynthèse a été observée chez tous les génotypes, comparée à celle mesurée à la fin de l'expérience 380 ppm, avec une diminution moindre pour le génotype sauvage (-29 %) par rapport aux mutants P64, P118 et P121 (-44 %, -41 % et -54 %, respectivement) (Tableau 6.1). Cette diminution d'activité photosynthétique observée dans l'expérience menée à 150 ppm s'est accompagnée d'une plus faible assimilation de C dans la biomasse de chaque génotype, comparée aux valeurs de l'expérience menée à 380 ppm : -24 % pour le génotype sauvage et -32 %, -29 % et -45 % pour P64, P118 et P121, respectivement (Tableau 6.1). Pour chacun des génotypes hypernodulants, la diminution de l'accumulation du carbone dans la biomasse a été plus faible que celle de l'activité photosynthétique, car elle s'est accompagnée d'une augmentation de la surface foliaire (en cm² feuilles.g⁻¹ plante), de l'ordre de + 23 % pour P64 et P118 et d'une tendance (non significative) de + 16 % pour P121 (Tableaux 6.1 et 6.3). Chez le génotype sauvage, la diminution de la teneur en CO₂ n'a pas induit de variation de la surface foliaire, par rapport à celle mesurée dans l'expérience menée à 150 ppm par rapport à la teneur de référence de 380 ppm.

- Lors de l'expérience menée à 750 ppm, on a observé une plus forte activité spécifique de photosynthèse chez le génotype sauvage et le mutant P64 (respectivement + 19 % et + 50 %), comparée à l'expérience menée à 380 ppm (Tableau 6.1) alors qu'elle n'était pas significativement différente chez les mutants P118 et P121, comparée aux valeurs de l'expérience 380 ppm (Tableau 6.1). Pour le génotype P64 seulement, la plus forte activité spécifique de photosynthèse a induit une plus forte assimilation du C dans la biomasse de + 36 % à 750 ppm comparée à l'expérience 380 ppm, mais pas chez le génotype sauvage.

Les valeurs de surface foliaire mesurées en fin d'expérience menée à 750 ppm étaient similaires à celles mesurées dans l'expérience à 380 ppm pour tous les génotypes. Pour les génotypes sauvage et P64, considérant que les valeurs de surface foliaire à l'état initial de

l'expérience 750 ppm, avant application des traitements CO₂ (Tableau 4.1), étaient de 12 à 20 % supérieures à celles mesurées dans l'expérience 380 ppm pour les génotypes sauvage et P64, on peut en conclure que la surface foliaire de ces 2 génotypes a diminué en réponse à l'augmentation de la teneur en CO₂ (Tableau 6.1), i.e. que pour ces génotypes, l'augmentation de la surface foliaire a été moins forte que celle de la biomasse totale.

Pour le génotype P64, la diminution de la surface foliaire a été moins importante que l'augmentation de l'activité spécifique photosynthétique ce qui *in fine* a résulté en une **augmentation de l'assimilation du C dans la biomasse** des plantes. Pour le génotype sauvage, la diminution de la surface foliaire a été du même ordre de grandeur que l'augmentation de l'activité spécifique de photosynthèse. Pour les génotypes P121 et P118, ni l'activité photosynthétique des feuilles, ni la surface foliaire n'ont varié significativement suite à l'augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère (Tableaux 6.1 et 6.3). Ainsi, pour ces trois génotypes, aucun changement **d'assimilation du C dans la biomasse** des plantes n'est ainsi observé par rapport au traitement 380 ppm de CO₂.

Dans l'expérience 150 ppm, la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère (Figure 5.2) a induit une diminution de l'accumulation de C dans la biomasse pour tous les génotypes, avec une diminution plus faible pour le génotype sauvage (- 24 %) que chez les mutants hypernodulants (-30 % pour P64 et P118 et - 45 % pour P121) (Tableaux 6.1 et 6.3). Pour les génotypes hypernodulants, cette diminution a été associée à une diminution plus forte de l'activité spécifique des feuilles (-40 à -54 %), partiellement compensée par une augmentation de la surface foliaire. Chez le génotype sauvage, la diminution de l'accumulation du C dans la biomasse suite à la diminution de la teneur en CO₂ était du même ordre de grandeur que la diminution d'activité photosynthétique des feuilles, sans variation de la surface des feuilles.

Dans l'expérience 750 ppm, seule l'assimilation de C dans la biomasse du génotype P64 a été plus élevée (+ 36 %) que dans l'expérience menée à 380 ppm, associée à une augmentation de l'activité spécifique des feuilles (+ 50 %), et à une diminution de la surface foliaire (Tableau 6.1). Pour les autres génotypes, l'augmentation de la teneur en CO₂ n'a pas induit de variation de la quantité de C accumulée par la photosynthèse. Pour le génotype sauvage l'augmentation de l'activité spécifique de la photosynthèse (+19 %) a été compensée par une diminution de surface foliaire du même ordre de grandeur, par rapport à l'expérience 380 ppm. Pour les génotypes P121 et P118, ni l'activité photosynthétique des feuilles, ni la surface foliaire n'ont varié significativement suite à l'augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère.

Les résultats observés chez le génotype sauvage et les mutants P118 et P121 sont concordant avec ceux observés chez le Soja sauvage et hypernodulant par Matsunami (2009) qui n'observaient aucune augmentation significative de la photosynthèse suite à l'utilisation d'une forte teneur en CO₂ à la fin du stade végétatif.

Etant donné que nous ne mesurons que la photosynthèse nette, l'absence d'augmentation de l'accumulation de C dans la biomasse résultant de l'élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère à 750 ppm, telle qu'observée pour les génotypes P118 et P121,

Tableau 6.2 Répartition du C nouvellement photosynthétisé dans la biomasse des parties aériennes, des racines et des nodosités, affectée par l'exposition aux 3 différentes teneurs en CO₂ chez les 4 génotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. Mesures effectuées 8 jours après le début du traitement CO₂.

Teneur en CO ₂ atmosphérique	Génotype	Répartition du carbone nouvellement photosynthétisé (g C.g C ⁻¹)						Force de puits (g C.jour ⁻¹ .g biomasse ⁻¹)					
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Nodosités / Plante entière		Partie aérienne		Racine		Nodosité	
150 ppm	Sauvage	0.17 (***)	B	0.33 (**)	D	0.06 (***)	C	0.017 (**)	A	0.012 (***)	A	0.025 (***)	A
	P64	0.19 (**)	B	0.62 (ns)	C	0.11 (**)	B	0.016 (***)	A	0.009 (***)	B	0.023 (***)	AB
	P118	0.15 (*)	C	0.69 (***)	B	0.10 (***)	B	0.012 (***)	B	0.006 (**)	C	0.021 (ns)	B
	P121	0.26 (**)	A	0.80 (*)	A	0.20 (ns)	A	0.011 (***)	C	0.007 (**)	C	0.023 (**)	AB
380 ppm	Sauvage	0.27	A	0.29	D	0.08	B	0.020	B	0.023	A	0.037	B
	P64	0.24	A	0.64	B	0.16	A	0.021	AB	0.018	B	0.043	A
	P118	0.13	C	0.54	C	0.07	C	0.018	C	0.009	C	0.020	D
	P121	0.20	B	0.87	A	0.17	A	0.022	A	0.010	C	0.028	C
750 ppm	Sauvage	0.24 (*)	B	0.33 (**)	C	0.08 (ns)	D	0.023 (**)	AB	0.025 (ns)	B	0.046 (***)	B
	P64	0.23 (ns)	B	0.55 (**)	B	0.12 (*)	B	0.029 (***)	A	0.033 (***)	A	0.050 (**)	A
	P118	0.19 (***)	C	0.54 (ns)	B	0.10 (***)	C	0.021 (*)	C	0.017 (***)	C	0.033 (***)	D
	P121	0.31 (***)	A	0.84 (*)	A	0.25 (***)	A	0.020 (**)	C	0.017 (***)	C	0.044 (***)	C

Chaque valeur représente la moyenne calculée sur 8 plantes. Au sein de chaque traitement, une lettre différente reflète une différence significative entre génotype (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet d'une modification de la teneur atmosphérique en CO₂ a été testé en utilisant une comparaison 2 à 2 par un test de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

pourrait en fait aussi s'expliquer par une augmentation dans les mêmes proportions de la photosynthèse brute et de la respiration. L'augmentation de la photosynthèse nette moyenne de + 37 % suite à l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm ne peut être le fait de la seule augmentation de l'activité spécifique de photosynthèse des génotypes P64 (+ 50 %) et génotype sauvage (+19 %). Pour les génotypes P118 et P121 au moins, ceci laisse supposer une élévation de la photosynthèse brute en réponse à une augmentation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère, associée à une élévation du même ordre de grandeur de la respiration par les parties racinaires (isolées des parties aériennes dans notre dispositif).

6.1.2 Impact sur la répartition du C entre les organes et sur leurs forces de puits

6.1.2.1 Répartition du C entre les parties aériennes et souterraines

Suite à une modification de la teneur atmosphérique en CO₂, on a observé des modifications dans la répartition du C entre les racines nodulées et les parties aériennes (Tableau 6.2).

- Dans l'expérience 150 ppm, la plus faible assimilation du C dans la biomasse observée chez les 4 génotypes (par comparaison à l'expérience 380 ppm), s'est accompagnée, chez le génotype sauvage et le mutant P64 uniquement, d'une diminution de la proportion de C allouée aux racines nodulées (respectivement -37 % et -21 %) comparée à l'expérience 380 ppm (Tableaux 6.2 et 6.3). En revanche, pour les mutants P118 et P121, la proportion de C allouée aux racines nodulées a augmenté avec la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère (de +15 % et +30 %, respectivement) (Tableaux 6.2 et 6.3).

Ces résultats pour les génotypes sauvage et P64 indiquent une réponse adaptative à la diminution de la teneur en CO₂ via l'augmentation de l'allocation de C vers les parties aériennes. Les mutants P118 et P121 semblent par contre réagir à cette réduction de la disponibilité en carbone en maintenant le flux d'assimilats carbonés vers les parties racinaires (Tableau 6.2).

- Dans l'expérience 750 ppm, chez P118 et P121, le pourcentage de répartition du C vers les racines nodulées a été plus élevé à la teneur en CO₂ de 750 ppm qu'à 380 ppm, avec une augmentation de l'ordre de + 50 % (Tableau 6.2 et 6.3).

- Chez le génotype sauvage, on a observé une faible différence du pourcentage de répartition du C vers les racines nodulées dans l'expérience 750 ppm, comparée à l'expérience 380 ppm (-11%). Cette différence étant du même ordre de grandeur que celle observée entre les plantes des 2 expériences à leur état initial (- 9.5 %) (Tableau 4.2), nous pouvons conclure que pour le génotype sauvage, l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm n'a pas induit à court terme de modification de la répartition des assimilats entre parties aériennes et parties racinaires (Tableau 6.3).

- Chez le génotype P64, le pourcentage de répartition du carbone entre organes aériens et souterrains était similaire dans les expériences menées à 750 ppm et à 380 ppm (Tableau 6.2). Toutefois, les valeurs des plantes à l'état initial (avant application des traitements CO₂) étant légèrement supérieures pour les plantes de l'expérience 750 ppm

Tableau 6.3 Synthèse des réponses des différents génotypes, **a.** sur la nutrition Carbonée et **b.** sur la nutrition Azotée à une exposition à une faible ou forte teneur atmosphérique en CO₂

a.		Activité spécifique de photosynthèse (mg C.jour ⁻¹ .cm ⁻²)	Surface foliaire (cm ² .g ⁻¹ plante)	Assimilation du C dans la biomasse (g C.g ⁻¹ plante.jour ⁻¹)	Répartition du C nouvellement photosynthétisé (g C.g C ⁻¹)			Force de Puits (g C.jour ⁻¹ .g ⁻¹ biomasse)		
					Racines nodulées / Plante entière	Nodosités / Racines nodulées	Nodosités / Plante entière	Partie Aérienne	Racine	Nodosité
<u>150 ppm</u>	Sauvage	-29%	ns	-24%	-37%	+14%	* ns	-15%	-48%	-32%
	P64	-44%	+24%	-32%	-21%	ns	-31%	-24%	-50%	-47%
	P118	-41%	+22%	-29%	+15%	+28%	+43%	-33%	-33%	ns
	P121	-54%	(+16 %) ns	-45%	+30%	-8%	+18%	-50%	-30%	-18%
<u>750 ppm</u>	Sauvage	+19%	* -16%	ns	* ns	+14%	*+12%	+15%	ns	+24%
	P64	+50%	* -11%	+36%	*-4%	-14%	-25%	+38%	+83%	+16%
	P118	ns	ns	ns	+46%	ns	+43%	+17%	+89%	+65%
	P121	ns	ns	ns	+55%	-3%	+47%	-9%	+70%	+57%

b.		Indice de Nutrition Azotée	Vitesse de Fixation d’N (g N.g ⁻¹ plante.jour ⁻¹)	Activité spécifique de fixation d’N (g N.jour ⁻¹ .g ⁻¹ nodosité)
	P64	+14%	(-28 %) ns	-24%
	P118	+12%	ns	ns
	P121	-20%	-59%	-45%
<u>750 ppm</u>	Sauvage	-17%	-40%	-34%
	P64	-18%	(-34 %) ns	-40%
	P118	ns	ns	ns
	P121	-21%	-30%	-24%

* signifie qu'il a été tenu compte de l'état initial lorsque cela induit une réponse différente de celle obtenue en comparant directement l'état final à 150 ppm et 750 ppm à 380 ppm.

(Tableau 4.2), on peut conclure à une légère diminution de l'allocation du carbone pour la croissance aux parties racinaires, suite à l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm (Tableau 6.3).

6.1.2.2 Répartition du C entre les nodosités et les autres organes souterrains

Dans l'expérience 150 ppm, on a observé un plus fort % de répartition du C vers les nodosités au sein des racines nodulées chez le génotype sauvage et le P118 (respectivement +14 % et + 28 %) en comparaison à l'expérience 380 ppm (Tableaux 6.2 et 6.3). En revanche, pour P121, la diminution de la teneur en CO₂ a été associée à une diminution de la proportion de C allouée au système racinaire vers les nodosités (- 8%). Le P64 n'a pas présenté de variations de la répartition du C entre les racines et les nodosités, comparée à l'expérience 380 ppm. Ainsi, à 150 ppm, à l'échelle de la plante entière, la proportion de C total allouée aux nodosités (C alloué à la biomasse des nodosités / C alloué à la biomasse totale ; Tableaux 6.2 et 6.3) a peu varié chez le génotype sauvage, a diminué chez P64 alors qu'elle a augmenté chez P118 et P121.

Dans l'expérience 750 ppm, au sein des parties racinaires, le génotype sauvage réparti une proportion de C vers les nodosités supérieure de + 14% comparée à l'expérience 380 ppm (Tableau 6.2). A 750 ppm, en comparaison à l'expérience 380 ppm, les mutants P64 et P121 ont montré une plus faible allocation du C vers les nodosités de respectivement -14% et -3%. Aucune variation n'était observée chez le P118. Enfin, à 750 ppm, à l'échelle de la plante entière, la proportion de C total allouée aux nodosités a légèrement augmenté chez le génotype sauvage (+25 %), a diminué chez P64 (-25 %) alors qu'elle a fortement augmenté chez P118 et P121 (autour de +45 %), par comparaison à l'expérience 380 ppm (Tableau 6.3).

On observe par ailleurs que quelle que soit la teneur en CO₂ utilisée, le ratio d'allocation du carbone aux nodosités relativement à celui alloué à la totalité des racines nodulées était le plus élevé des 4 génotypes chez le P121 (entre 0.80 et 0.87) et le plus faible chez le génotype sauvage (entre 0.29 et 0.33), les mutants P64 et P118 ayant présentés des valeurs intermédiaires (entre 0.54 et 0.69) (Tableau 6.2).

6.1.2.3 Force de puits des différents compartiments

Pour chaque génotype et chacun de leur compartiment, l'exposition à une teneur en CO₂ de 150 ppm a induit une diminution de la force de puits, comparée à l'expérience 380 ppm, mis à part pour les nodosités de P118, pour lesquelles la force de puits n'a pas varié avec la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère (Tableau 6.2). La diminution de la force de puits des parties aériennes a été la plus forte pour P121 (-50 %), intermédiaire pour P118 et P64 (autour de -30 %) et la plus faible pour le génotype sauvage (-15 %). La diminution de la force des puits des racines a été la plus forte chez le génotype sauvage et P64 (-50 %), et moyenne chez P118 et P121 (environ -30 %). La diminution de la force de puits des nodosités a été la plus forte chez P64, moyenne pour le génotype sauvage (-32 %), faible pour P121 (- 18%), et nulle pour P118 (Tableau 6.2).

De manière opposée, suite à l'exposition à une teneur élevée en CO₂ de 750 ppm, les forces de puits des différents compartiments ont été généralement plus élevées, comparées à l'expérience 380 ppm (Tableaux 6.2 et 6.3). L'augmentation la plus forte de la force de puits des parties aériennes a été celle de P64 (+ 38 %), la plus faible pour le génotype sauvage et P118 (autour de +15%) ; à l'inverse, chez le mutant P121, une diminution de la force de puits des parties aériennes de 9 % a été observée. Dans les racines, la force de puits était plus élevée chez les 3 hypernodulants de + 70 % à + 89 % dans l'expérience à 750 ppm comparée à l'expérience témoin alors qu'elle n'a pas varié chez le génotype sauvage. Enfin, chez les nodosités, la force de puits des nodosités était plus élevée de + 24 % chez le génotype sauvage, de + 16 % chez P64 et autour de + 60 % chez les mutants P118 et P121 (Tableau 6.2).

6.1.2.4 Synthèse

En comparant aux mesures réalisées dans l'expérience 380 ppm, chez le génotype sauvage, la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère à 150 ppm a modifié la répartition des assimilats carbonés, en défavorisant l'allocation de carbone aux parties racinaires (Tableau 6.2). La surface foliaire qui aurait pu en conséquence bénéficier de l'allocation préférentielle d'assimilats n'a cependant pas été augmentée. Cette réduction de l'allocation du carbone aux parties racinaires a pénalisé surtout la croissance des racines, car au sein des racines nodulées, l'allocation de carbone en faveur des nodosités a légèrement augmenté. Toutefois, à l'échelle de la plante entière, le pourcentage d'allocation du C aux nodosités n'a pas varié.

La modification de la répartition des assimilats carbonés en réponse à la diminution de la teneur en CO₂ à 150 ppm a différé entre les 3 génotypes hypernodulants. Chez P64, comme pour le génotype sauvage, la réponse a impliqué une diminution du pourcentage d'allocation des assimilats carbonés aux parties racinaires. Par contre il n'y a pas eu de modification de l'allocation du C entre racines et nodosités, résultant à l'échelle de la plante entière, en une diminution du pourcentage de C alloué aux nodosités (Tableaux 6.2 et 6.3). A l'inverse, pour les génotypes P118 et P121, le pourcentage d'allocation du carbone aux parties racinaires a été augmenté, avec au sein des parties racinaires, un pourcentage d'allocation du C aux nodosités fortement augmenté pour P118, ou bien légèrement diminué pour P121, ce qui in fine a globalement résulté en une augmentation du pourcentage de C total alloué aux nodosités de + 43 % et +18 % respectivement pour ces 2 génotypes. Toutefois, au sein des parties racinaires, le pourcentage d'allocation du C aux nodosités est resté très élevé chez les hypernodulants en comparaison avec le génotype sauvage.

Par comparaison aux mesures réalisées dans l'expérience 380 ppm, suite à une élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère à 750 ppm, la répartition du carbone entre parties aériennes et parties racinaires du génotype sauvage n'a pas été modifiée (en prenant en compte les différences d'état initial ; Tableau 6.3) ; toutefois, au sein des parties racinaires, l'allocation de C vers les nodosités a augmenté de + 14 %, aux dépens des racines, en cohérence avec un éventuel rééquilibrage fonctionnel en faveur de la fixation symbiotique.

A l'échelle de la plante, la proportion de C total alloué aux nodosités a augmenté de +12 % (en prenant en compte les différences d'état initial ; Tableau 6.3).

Pour le génotype P64 l'élévation de la teneur en CO₂ a été associée à un maintien de la proportion de C allouée aux parties racinaires (- 4 % seulement), à une diminution de l'allocation du carbone aux nodosités (- 14 %), résultant à l'échelle de la plante entière, en une diminution du % d'allocation du carbone aux nodosités de - 25 %. Ainsi, la proportion de C total alloué aux nodosités P64 est de 0.12 (Tableau 6.2).

Les génotypes P118 et P121 ont présenté des réponses similaires à l'élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère, avec, comme à 150 ppm, une augmentation du pourcentage d'allocation du C aux parties racinaires (par rapport aux parties aériennes), de l'ordre de + 50 %, en cohérence avec la théorie de l'équilibre fonctionnel, sans modification substantielle de l'allocation du carbone entre racines et nodosités au sein des parties racinaires, avec en conséquence à l'échelle de la plante entière une augmentation du % d'allocation de C aux nodosités, autour de + 45% en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère. La proportion de C total alloué aux nodosités de ces 2 génotypes était alors de respectivement 0.10 et 0.25 (Tableau 6.2).

6.2 Impact sur la Nutrition Azotée, en relation avec la croissance

Les différences d'assimilation du C dans la biomasse observées entre les 3 expériences à trois teneurs en CO₂ de l'atmosphère différentes, peuvent avoir induit une modification de l'équilibre entre la demande en N et l'offre en N. Nous avons ainsi utilisé l'indice de nutrition azoté pour diagnostiquer le statut azoté des plantes (Figure 6.1).

Le prélèvement d'azote par la fixation symbiotique a été mesuré par un marquage isotopique au ¹⁵N réalisé 5 jours après le début du traitement CO₂, et analysé sur des plantes récoltées après 8 jours de traitement CO₂.

Pour chacun des génotypes, la biomasse des nodosités, exprimée en g nodosités. g⁻¹ plante (Figure 6.2), mesurée après 8 jours de traitement CO₂, a peu varié dans les 3 expériences menées à des teneurs en CO₂ différentes. Par conséquent, pour chaque génotype, nous avons considéré que les variations de vitesse de fixation symbiotique (Fig 6.3) avec la teneur en CO₂ de l'atmosphère sont majoritairement imputables aux variations d'activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.4). Afin de s'affranchir des variations d'état initial des plantes entre les 3 expériences, la vitesse de fixation symbiotique a été normalisée par la biomasse des plantes, et exprimée en g N fixé. g⁻¹ plante. jour⁻¹.

Les variations observées dans les expériences 150 ppm et 750 ppm, par rapport à l'expérience 380 ppm, ont été récapitulées dans le tableau 6.3.

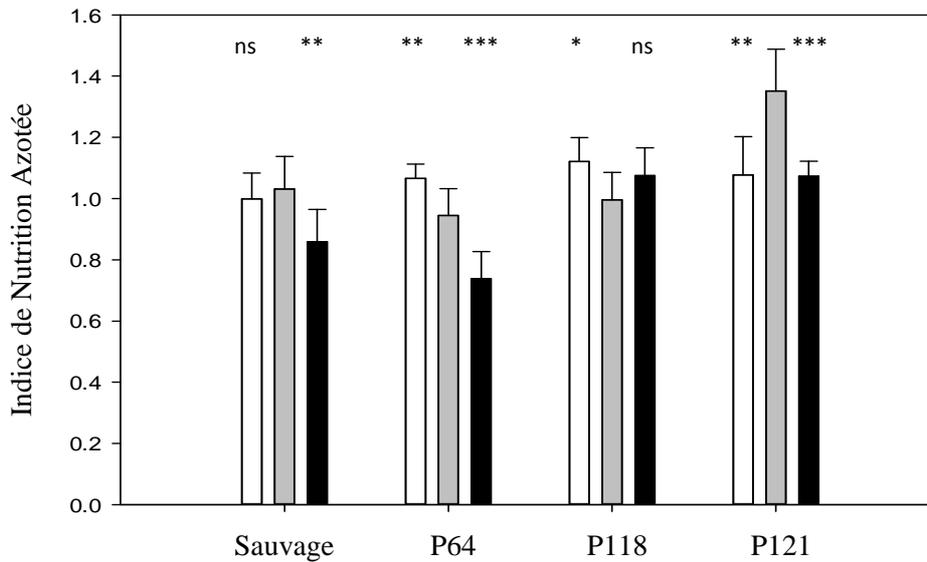


Figure 6.1 **Indice de Nutrition Azotée (INN) des plantes sous 3 différents teneurs en CO₂ chez 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L'INN a été mesurée chez des plantes aux racines intactes 8 jours après le début du traitement dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750ppm (barres noires). Les barres verticales indiquent l'écart type. Une * représente une différence significative entre l'expérience 150 ppm ou 750ppm comparée à l'expérience témoin 380ppm (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

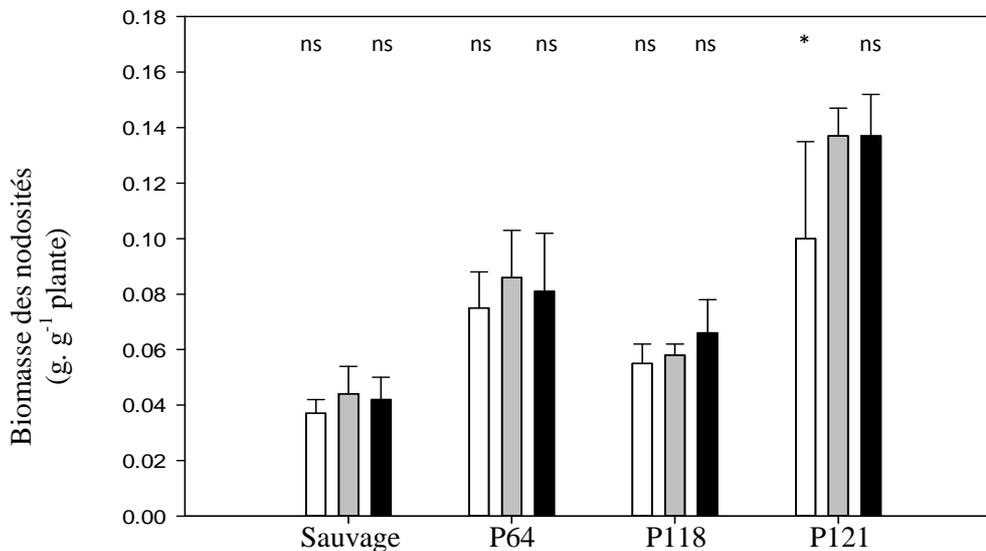


Figure 6.2 **Biomasse des nodosités des plantes sous 3 différents teneurs en CO₂ chez 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La biomasse des nodosités a été mesurée en g.g⁻¹ plante chez des plantes aux racines intactes 8 jours après le début du traitement dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750ppm (barres noires). Les barres verticales indiquent l'écart type. Une * représente une différence significative entre l'expérience 150 ppm ou 750 ppm comparée à l'expérience témoin 380 ppm (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

6.2.1 Impact sur la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante, en relation avec la croissance totale

L'Indice de Nutrition Azotée (INN) indique le statut azoté d'une plante et exprime le niveau de satisfaction des besoins en N pour la croissance des plantes. Lorsque l'INN est inférieur à 1, la nutrition azotée est insuffisante et limite la croissance. La plante est alors en état de carence azotée. Lorsque l'INN est supérieur à 1, la nutrition azotée est dite supra-optimale, donc supérieure aux besoins de la plante.

A une teneur ambiante en CO₂ de 380 ppm, on a observé que les génotypes sauvage, P64 et P118 possédaient une nutrition N optimale. En effet, l'INN de chaque génotype était approximativement égal à 1, signifiant un équilibre entre l'offre en N provenant de la fixation symbiotique, et la demande en N nécessaire à la croissance des parties aériennes (Figure 6.1). Chez le P121, l'INN était égal à 1.35, mettant en évidence une nutrition azotée supra-optimale (Figure 6.1).

Dans l'expérience 150 ppm, l'assimilation de C dans la biomasse était plus faible que dans celle à 380 ppm, pour chaque génotype. On peut faire l'hypothèse que cette diminution de la croissance pourrait induire une diminution de la demande en N, et donc une augmentation du statut N de la plante.

- Dans le cas où le prélèvement de N par la fixation symbiotique est régulé par le statut N de la plante (cas des génotypes sauvages), on peut s'attendre à une diminution de la fixation symbiotique d'azote, via une répression de l'activité spécifique de fixation symbiotique, conduisant à un maintien de l'équilibre fonctionnel C-N, avec un maintien de l'INN autour de 1.
- Dans le cas où la fixation symbiotique n'est pas régulée par le statut N de la plante (cas des mutants hypernodulants), on peut s'attendre à un maintien du niveau d'activité spécifique de fixation symbiotique, indépendamment du statut N de la plante, et donc à une augmentation de l'INN.

L'impact de l'exposition à la teneur en CO₂ de l'atmosphère de 150 ppm sur le statut azoté des plantes a varié entre le génotype sauvage et les 3 mutants hypernodulants. Chez le génotype sauvage, l'INN n'était pas différent suite à l'exposition à une teneur de 150 ppm, comparé à l'expérience 380 ppm (Figure 6.1). Ceci indiquerait que la plus faible assimilation de C dans la biomasse a été associée à une plus faible vitesse de fixation symbiotique d'azote. Cette hypothèse est cohérente avec les observations d'une diminution de la vitesse de fixation symbiotique d'azote de -13 %, même si, du fait de la variabilité inter-plante cette diminution n'est pas significative au seuil de 5 % ($P = 0.0716$) (Figure 6.3). Ainsi, l'équilibre entre l'offre et la demande en N a été maintenu, et le niveau de fixation symbiotique régulé par le statut N de la plante.

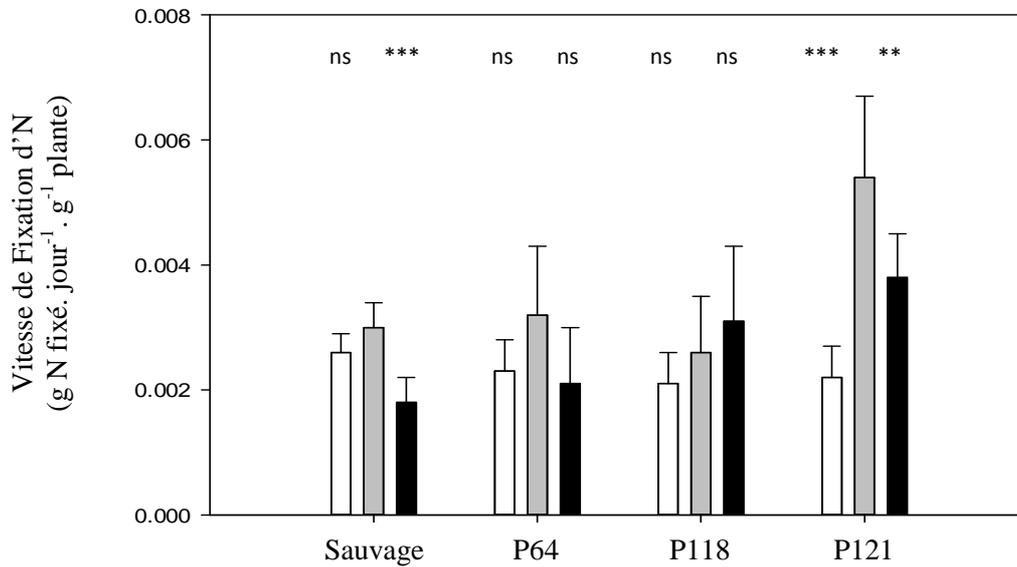


Figure 6.3 **Fixation symbiotique d'azote des plantes sous 3 différents teneurs en CO₂ chez 4 génotypes de pois : sauvage Frisson et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La vitesse de fixation d'N a été mesurée en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ plante par marquage isotopique au ¹⁵N, chez des plantes aux racines intactes 5 jours après le début du traitement dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750ppm (barres noires). Les barres verticales indiquent l'écart type. Une * représente une différence significative entre l'expérience 150 ppm ou 750ppm comparée à l'expérience témoin 380ppm (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

Chez le mutant P121, la plus faible assimilation de C dans la biomasse mesurée dans l'expérience 150 ppm, a été associée à un INN très inférieur à celui de l'expérience 380 ppm (-20 %), passant ainsi de 1.35 à 1.08 (Figure 6.1), du fait d'une diminution de la vitesse de fixation symbiotique de -59 % (Figure 6.3). Ainsi, la nutrition azotée du mutant P121, supra-optimale à 380 ppm, est devenue optimale à 150 ppm. La première explication est que la diminution de la disponibilité en C par la photosynthèse a pu induire une diminution de l'offre en N par les nodosités, du fait d'un apport en C aux nodosités insuffisant. La seconde explication est que le prélèvement d'N a diminué en relation comme suite à la diminution de la demande en N associée au ralentissement de la croissance des plantes à 150 ppm. Cette seconde hypothèse est toutefois peu probable. En effet, les mesures de notre étude à 380 ppm et dans d'autres études (Voisin et al, 2007) montrent une nutrition N supra-optimale du génotype P121, indiquant une absence d'ajustement de la fixation symbiotique par rapport au statut N de la plante. L'hypothèse d'une limitation de la fixation symbiotique par la disponibilité en carbone est ainsi plus probable : en effet, malgré l'augmentation du pourcentage d'assimilats carbonés alloués vers les racines nodulées de + 30 %, la diminution de la quantité de C assimilée dans la biomasse de 45 % a réduit en quantité importante le flux de carbone alloué aux nodosités, et a pu limiter leur fonction de fixation symbiotique de N₂.

Chez les mutants hypernodulants P64 et P118, la plus faible assimilation de C dans la biomasse à 150 ppm a induit un INN légèrement plus élevé que dans l'expérience 380 ppm (respectivement +14 % et +12 %) (Figure 6.1), associé à une absence de variation de la vitesse de fixation symbiotique (Figure 6.3). La nutrition azotée était devenue légèrement supra-optimale. Ainsi, pour ces 2 mutants, contrairement au génotype P121, la plus faible diminution de l'assimilation du carbone dans la biomasse à 150 ppm (autour de - 30 % pour P64 et P118 vs - 45 % pour P121) (Tableau 6.1) n'a pas conduit à une diminution significative de la vitesse de fixation symbiotique de N₂ (Figure 6.3). Toutefois, pour le génotype P64, en tendance, la vitesse de fixation symbiotique d'azote a légèrement diminué avec la diminution de la concentration en CO₂ de l'atmosphère à 150 ppm (- 28 % par rapport à l'expérience 380 ppm) (Figure 6.3).

Dans l'expérience 750 ppm, les INN des génotypes sauvage, P64 et P121 ont été plus faibles respectivement de -17 %, -18 % et -21 % par rapport aux INN mesurés dans l'expérience 380 ppm (Figure 6.1). Pour ces 3 génotypes, l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm a été associée à une baisse de la vitesse de fixation symbiotique (Figure 6.3). Dans le cas des génotypes sauvage et P64, l'INN est alors passé d'une valeur proche de 1 à 380 ppm à une valeur inférieure à 1, indiquant une nutrition azotée de la plante insuffisante (Figure 6.1).

- Pour le génotype P64, la diminution de l'INN à la valeur de 0.77 s'explique par l'augmentation de l'accumulation de C dans la biomasse (de + 36 %) (Tableau 6.1) concomitante de la baisse de la vitesse de fixation symbiotique de N (en tendance de -34 % ; Figure 6.3).

- Pour le génotype sauvage, la diminution de l'INN à la valeur de 0.86 a été uniquement associée à une diminution de la vitesse de fixation symbiotique de - 40 %.

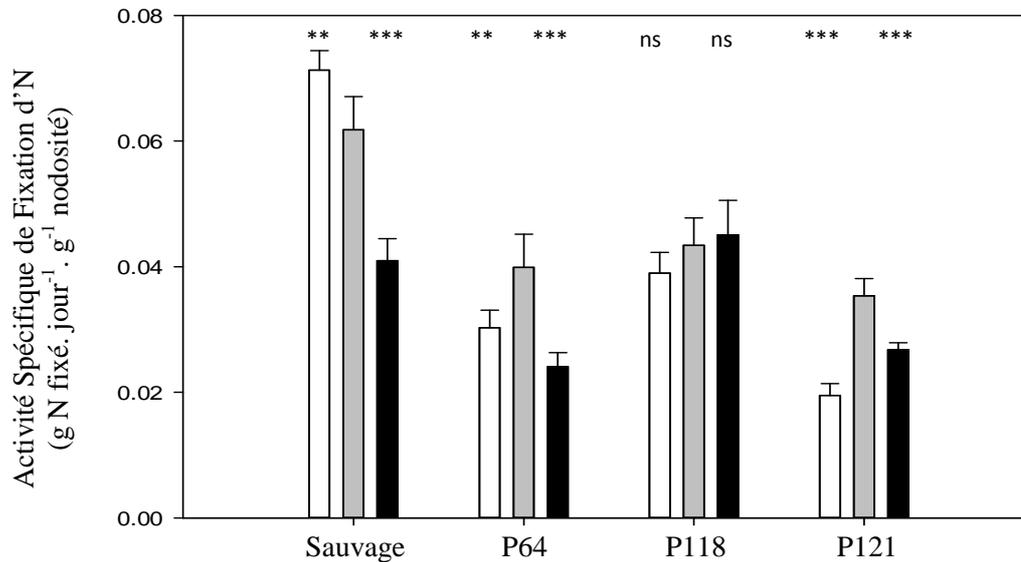


Figure 6.4 **Activité spécifique de fixation d’N des plantes sous 3 différents teneurs en CO₂ chez 4 génotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L’activité spécifique de fixation d’N des nodosités a été mesurée en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité par marquage isotopique au ¹⁵N, chez des plantes aux racines intactes 5 jours après le début du traitement dans l’expérience 150 ppm (barres blanches), l’expérience 380 ppm (barres grises) et dans l’expérience 750ppm (barres noires). Les barres verticales indiquent l’écart type. Une * représente une différence significative entre l’expérience 150 ppm ou 750ppm comparée à l’expérience témoin 380ppm (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

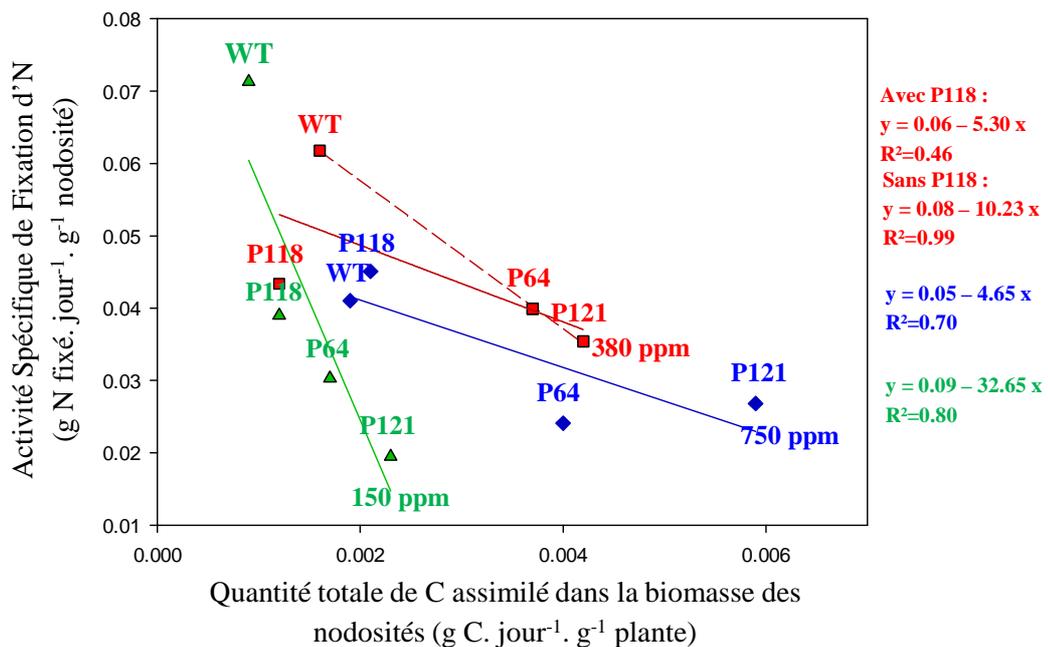


Figure 6.5 **Activité spécifique de fixation de l’azote en fonction de l’assimilation du C dans la biomasse des nodosités des plantes sous 3 différents teneurs en CO₂ chez 4 génotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L’activité spécifique de fixation (en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité) en fonction de l’assimilation de C dans la biomasse de l’ensemble des nodosités (en g C. jour⁻¹. g⁻¹ plante) a été mesurée 8 jours après le début du traitement dans l’expérience 150 ppm (triangles verts), l’expérience 380 ppm (carrés rouges) et dans l’expérience 750ppm (losanges bleus). A 380ppm, les valeurs moyennes de P118 étaient faibles. La droite rouge en pointillé représente la régression linéaire sans P118 alors que celle en trait plein représente la régression linéaire avec P118.

- Pour le génotype P121, l'INN a diminué, passant d'une valeur de 1.35 à 380 ppm à 1.07 à 750 ppm, en relation avec une baisse uniquement de la vitesse de fixation symbiotique de -30 %.

- La réponse de la nutrition N du génotype P118 à une élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère se distingue de celle des autres génotypes. Ainsi pour P118, l'exposition à une teneur en CO₂ de 750 pm a été associée à un maintien de l'INN à 1 (Figure 6.1), avec un maintien à la fois de l'assimilation du C dans la biomasse et de la vitesse de fixation symbiotique (Figure 6.3).

6.2.2 Impact sur l'activité spécifique de fixation symbiotique des nodosités, en relation avec la croissance des nodosités

A 150 ppm, par comparaison à l'expérience 380 ppm, l'activité spécifique des nodosités a légèrement augmenté pour le génotype sauvage, alors qu'elle a diminué pour P64 et P121 mais qu'elle s'est maintenue pour le génotype P118 (Figure 6.4).

A 750 ppm, par comparaison à l'expérience 380 ppm, l'activité spécifique des nodosités a diminué pour tous les génotypes sauf P118, génotype pour lequel elle a été maintenue (Figure 6.4). Ainsi, contrairement à notre hypothèse, l'activité spécifique de fixation symbiotique n'a pas augmenté pour aucun génotype suite à une élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère.

Afin d'expliquer les différences entre génotypes concernant les variations de leur activité spécifique de fixation symbiotique aux modifications de teneur en CO₂ de l'atmosphère, l'activité spécifique (moyenne) des nodosités a été exprimée en fonction de la quantité totale de C assimilé dans la biomasse des nodosités (Figure 6.5). Pour chaque teneur en CO₂ de l'atmosphère expérimentée, il existe une relation négative entre l'activité spécifique de fixation symbiotique des nodosités et la quantité de C allouée à la biomasse totale des nodosités (Figure 6.5). Ces résultats sont cohérents avec les études ayant montré une compétition au sein des parties racinaires entre les processus de synthèse des nodosités et leur activité fixatrice au cours de la phase végétative (Voisin et al. 2003c).

A 380 ppm, la corrélation négative entre l'activité spécifique de fixation symbiotique et la quantité de C accumulée dans la biomasse des nodosités est plus forte si l'on considère les génotypes sauvage, P64 et P121 que si l'on inclut le génotype P118, suggérant un comportement particulier de ce génotype. La pente de la relation linéaire entre activité spécifique des nodosités et quantité de C allouée à la biomasse des nodosités diffère entre teneurs en CO₂ expérimentées, avec une pente plus forte à 150 ppm qu'à 380 ppm alors que la pente observée à 750 ppm est similaire à celle observée à 380 ppm.

Ces résultats montrent qu'en conditions d'assimilats limitants (expérience 150 ppm), l'activité spécifique de fixation symbiotique est plus fortement limitée par la croissance des nodosités qu'à 380 ppm ou 750 ppm.

A 150 ppm, en réponse à la diminution de la teneur en CO₂, la diminution du flux de carbone alloué à la biomasse des nodosités a été la plus forte pour P121, très faible à nulle

pour P118, et intermédiaire pour P64. Ainsi, pour les génotypes hypernodulants, les observations à 150 ppm vont dans le sens d'une forte limitation de l'activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.4) par l'allocation du carbone pour la croissance des nodosités en réponse à la diminution de la teneur en CO₂, avec une limitation décroissante de P121, à P64 et P118. Pour le génotype sauvage, à l'inverse, la diminution de l'allocation du C à la biomasse des nodosités s'est accompagnée d'une légère augmentation de l'activité spécifique de fixation symbiotique. On peut attribuer cette réponse à la faible proportion de biomasse nodosités (par rapport à la biomasse totale) pour ce génotype comparé aux génotypes hypernodulants, qui nécessite de ce fait une dépense énergétique moindre à l'échelle de la plante.

A 750 ppm, l'augmentation de la quantité des assimilats vers les nodosités en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂ pour tous les génotypes (Figure 6.5) a été associée à une diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique pour tous les génotypes.

6.2.3 Synthèse

Suite à une exposition à 150 ppm, pour le génotype sauvage, la vitesse de fixation symbiotique a légèrement diminué avec la baisse d'assimilation du C dans la biomasse résultant en un INN maintenu autour de 1. Pour les génotypes hypernodulants, la diminution de la vitesse de fixation symbiotique avec la teneur en CO₂ de l'atmosphère semble plutôt liée à la diminution de l'activité spécifique des nodosités, du fait d'une compétition accrue pour le C avec la croissance des nodosités, en conditions d'assimilats carbonés limitants. La diminution de la vitesse de fixation symbiotique a été plus forte pour P121, moyenne pour P64, et nulle pour P118. Pour chacun de ces génotypes, cette réponse a conduit à une nutrition N optimale (INN = 1) à 150 ppm.

L'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm a conduit à une nutrition N sub-optimale pour le génotype sauvage et le génotype P64, du fait d'une diminution de la vitesse de fixation symbiotique, malgré le maintien (génotype sauvage) voire l'augmentation (P64) de l'assimilation du C dans la biomasse. Pour le génotype P121, une diminution de la vitesse de fixation symbiotique a également été observée suite à l'élévation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère ; cependant, pour ce génotype, elle a conduit à une baisse du statut N d'une nutrition supra-optimale à 380 ppm à une nutrition optimale à 750 ppm. Pour ces 3 génotypes, la diminution d'activité spécifique de fixation symbiotique a été associée à une augmentation de la quantité de C allouée à la biomasse des nodosités, suggérant une limitation de la disponibilité en assimilats carbonés pour la fonction de fixation symbiotique. Pour le génotype P118, l'exposition à une teneur en CO₂ de 750 pm a été associée à un maintien d'une nutrition N optimale (INN égal à 1), avec un maintien à la fois de l'assimilation du C dans la biomasse totale et de la vitesse de fixation symbiotique.

6.3 Synthèse des stratégies adaptatives des génotypes à des modifications de la teneur en CO₂

L'exposition à une teneur en CO₂ faible ou élevée a induit la mise en place de stratégies adaptatives de la fixation symbiotique chez chaque génotype. Cependant ces

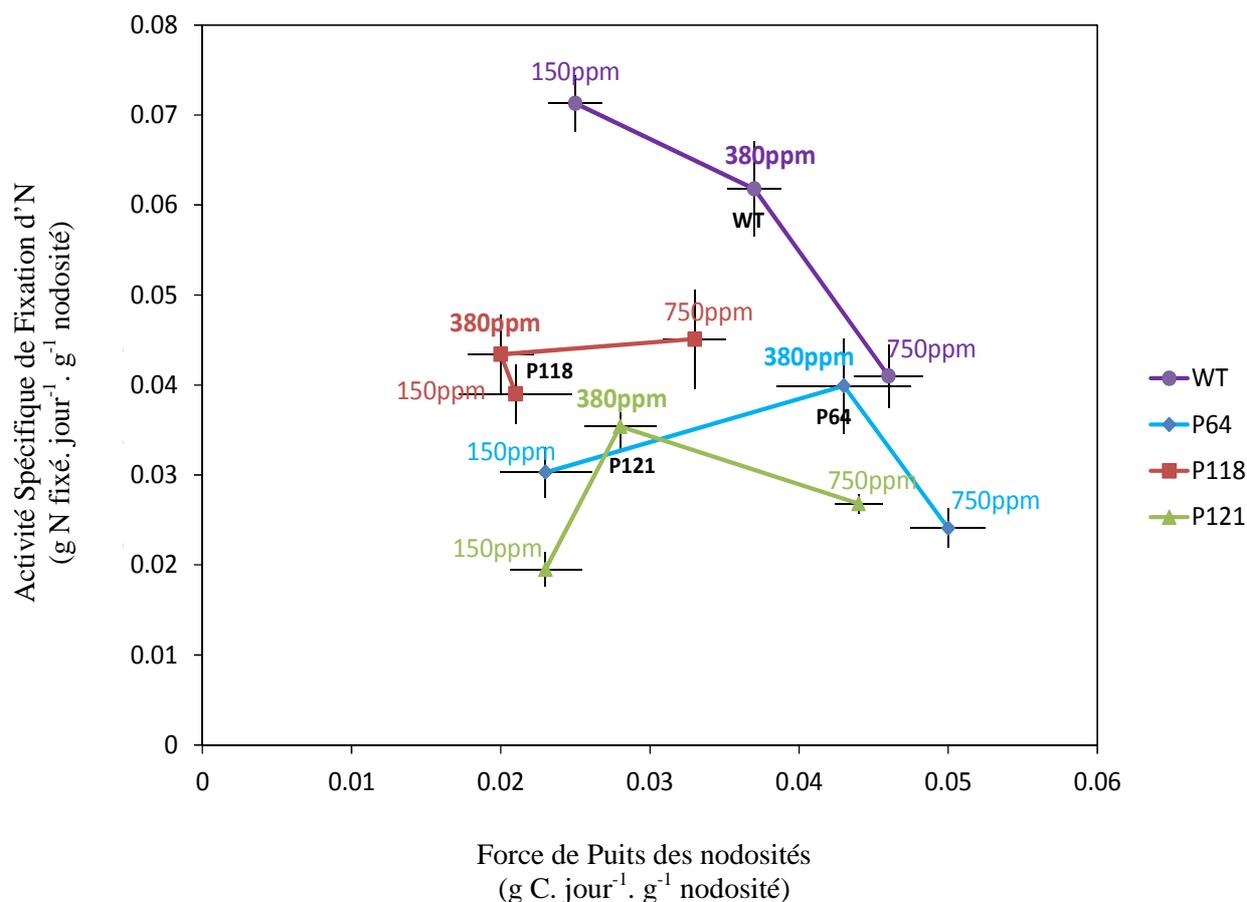


Figure 6.6 **Activité spécifique de fixation en fonction de la force de puits des nodosités suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L'activité spécifique de fixation (en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité) en fonction de la force de puits des nodosités (en g C. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité) a été mesurée 8 jours après le début du traitement chez le sauvage (ronds violets), P64 (losanges bleus), P118 (carrés rouges) et P121 (triangles verts) dans l'expérience 150 ppm, l'expérience 380 ppm et dans l'expérience 750ppm.

stratégies ont varié entre génotypes, en mettant en jeu de façon différente les composantes structurale et/ou fonctionnelle de la fixation symbiotique. Les stratégies adaptatives des génotypes ont ainsi été décrites en analysant la « trajectoire » des génotypes de 380 ppm à 150 ppm et 750 ppm, dans le plan mettant en relation l'activité spécifique des nodosités pour la fixation symbiotique et la force de puits des nodosités pour le carbone (Figure 6.6).

A 150 ppm : Pour tous les génotypes, l'exposition à une faible teneur en CO₂ a induit une baisse de l'assimilation du C dans la biomasse (Tableau 6.3). Celle-ci s'est accompagnée d'une baisse de la vitesse de fixation symbiotique chez tous les génotypes sauf P118 pour lequel celle-ci a été maintenue (Tableau 6.3). Des différences de réponse adaptative ont été observées entre génotypes pour l'allocation des assimilats carbonés (Tableau 6.3) ainsi que pour l'activité spécifique de fixation symbiotique d'azote (Figure 6.6). L'exposition à une faible teneur en CO₂, a conduit à une diminution de la force de puits des nodosités pour tous les génotypes sauf pour P118 pour lequel elle a été maintenue (Figure 6.6). Et l'activité spécifique de fixation symbiotique d'azote a augmenté chez le génotype sauvage, mais diminué chez P64 et P121 et s'est maintenue chez P118 (Figure 6.6). Ainsi, à 150 ppm comme à 380 ppm, l'activité spécifique de fixation symbiotique à 150 ppm était inférieure chez les mutants hypernodulants comparés au génotype sauvage (Figure 6.6).

A 750 ppm : L'exposition à une forte teneur en CO₂ n'a pas résulté en une augmentation de l'assimilation de C dans la biomasse pour tous les génotypes en dehors de P64 pour lequel l'augmentation a été effective (Tableau 6.3). L'exposition à une teneur élevée en CO₂ a conduit à une augmentation de la force de puits des nodosités, accompagnée d'une diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique chez tous les génotypes sauf P118 pour lequel l'activité spécifique de fixation symbiotique a été maintenue (Figure 6.6). L'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm a ainsi résulté en une baisse de la vitesse de fixation symbiotique pour tous les génotypes, à part pour P118 où elle a été maintenue (Tableau 6.3). Ainsi, à 750 ppm comme à 380 ppm, l'activité spécifique de fixation symbiotique du P118 était similaire à celle du génotype sauvage, alors que celle des génotypes P64 et P121 était inférieure à celle du génotype sauvage (Figure 6.6).

Stratégie adaptative du génotype Sauvage :

150 ppm : L'impact de l'exposition à une faible teneur en CO₂ sur l'assimilation de C dans la biomasse a été le plus faible parmi les 4 génotypes chez le génotype sauvage (-24%) comparé à l'expérience 380 ppm (Tableau 6.3). Il a été associé à une diminution de l'allocation du C vers les racines nodulées, et en particulier vers les racines (Tableau 6.3). Mais la surface foliaire n'a pas été augmentée suite à ces réallocations du C entre les compartiments. Enfin, la diminution de la force de puits des nodosités pour le C à 150 ppm, a été associée à une augmentation de la fonction de fixation symbiotique (Figure 6.6) ; nous faisons ainsi l'hypothèse qu'à 150 ppm, la diminution de la compétition pour le C entre la croissance des nodosités et l'activité spécifique de fixation symbiotique a permis de d'augmenter cette dernière par rapport à la situation observée à 380 ppm. A l'échelle de la plante, la faible diminution de la vitesse de fixation symbiotique (bien que non significative) (Tableau 6.3), associée à une diminution du même ordre de grandeur de l'assimilation

du C, est cohérente avec une régulation de la fixation symbiotique par le statut azoté de la plante, maintenant l'INN à 1 (Tableau 6.3).

750 ppm : Il n'y a pas eu d'impact d'une exposition à une forte teneur en CO₂ sur l'assimilation de C dans la biomasse (Tableau 6.3). En effet, l'augmentation de l'activité spécifique de photosynthèse a été compensée par une baisse de la surface foliaire. En réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, on a observé une augmentation de la force de puits des nodosités (+ 24 %) associée à une diminution de leur activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6) ; ces modifications ont conduit à une réduction de la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante (Tableau 6.3), provoquant la carence en N observée.

Ainsi, à 750 ppm, chez le génotype sauvage, la réponse adaptative via l'augmentation des dépenses en C pour la croissance des nodosités et pour la respiration associée pourrait avoir limité l'allocation du C aux dépenses énergétiques nécessaires à la fixation symbiotique de N₂ et expliquer la diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique (Voisin et al, 2003c). Ces modifications ont conduit à une réduction de l'INN (comparé à 380 ppm), avec à 750 ppm un INN inférieur à 1, traduisant un état de carence en N.

Stratégie adaptative du génotype P64 :

150 ppm : La diminution de la teneur en CO₂ a eu un impact modéré sur l'assimilation du C dans la biomasse (- 30 % ; Tableau 6.3), avec une réponse adaptative via l'augmentation de la surface foliaire par gramme de plante. En réponse à la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère, le génotype P64 a montré une réduction de la proportion et *in fine* de la quantité de C allouée aux parties racinaires (Tableau 6.3), sans modification du rapport racines / nodosités. L'exposition à une teneur de 150 ppm a par conséquent induit une importante réduction de la force de puits des nodosités pour le C, associée à une diminution plus modérée de l'activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6), résultant en une diminution (en tendance) de la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante (Tableau 6.3). Il en résulte à 150 ppm une compensation de la diminution de l'assimilation du C dans la biomasse par une diminution de la vitesse de fixation symbiotique (légèrement plus faible), résultant en un INN similaire à celui observé à 380 ppm (non significativement augmenté de 14 %), pour une valeur supérieure proche de 1.

La diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique et de la croissance des nodosités induite par une limitation en C lors de l'exposition à une teneur en CO₂ de 150 ppm a entraîné une baisse de la vitesse de fixation symbiotique d'azote, du même ordre de grandeur que la diminution de l'assimilation de C.

750 ppm : P64 est le seul génotype à avoir augmenté son activité spécifique de photosynthèse ainsi que l'assimilation de C dans la biomasse suite à l'exposition à une teneur en CO₂ de 750 ppm (Tableau 6.3). Cette réponse a été associée à une diminution de la surface foliaire, avec un relatif maintien du pourcentage d'allocation du C au système racinaire nodulé, et à une diminution du pourcentage du C alloué vers les nodosités, la croissance des racines étant ainsi moins défavorisée (Tableau 6.3). Toutefois, il en résulte une légère augmentation de la quantité de C allouée à la biomasse des nodosités (Tableau 6.3). Pour ce

génotype, en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, l'augmentation de force de puits des nodosités a été la plus faible (+16 %), et associée à une baisse de leur activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6).

Pour le génotype P64, comme pour le génotype sauvage, on peut faire l'hypothèse que l'augmentation de la force de puits des nodosités en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂ a induit une diminution de leur activité spécifique de fixation symbiotique, du fait de la compétition pour le C entre la formation des nodosités et leur activité fixatrice, celle-ci étant moins compétitive.

En réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, l'augmentation de l'accumulation du C dans la biomasse a été associée à une légère diminution de la vitesse de fixation symbiotique d'azote à l'échelle de la plante, (Tableau 6.3), entraînant par conséquent une diminution de l'INN (Tableau 6.3), et donc un état de carence en N pour P64.

Globalement, P64 a présenté une réponse aux variations de la teneur en CO₂ proche de celle du génotype sauvage. Cependant pour le génotype P64, la croissance des racines a toujours été favorisée par rapport à celle des nodosités, alors que les variations de croissance des racines et des nodosités ont été similaires pour le génotype sauvage.

Stratégie adaptative du génotype P118 :

150 ppm : L'impact de l'exposition à une teneur en CO₂ de 150 ppm sur l'assimilation de C dans la biomasse a été modéré chez P118, avec une diminution de - 30 % (Tableau 6.3), la diminution de l'activité spécifique de photosynthèse ayant été associée à une augmentation de la surface foliaire. La réponse adaptative de ce génotype s'est effectuée via une augmentation conjointe du pourcentage de C alloué à la biomasse du système racinaire nodulé, et au sein des parties racinaires, à la biomasse des nodosités (Tableau 6.3). Il en a résulté pour ce seul génotype, un maintien de la force de puits des nodosités pour le C, suite à la diminution de la teneur en CO₂ (Figure 6.6).

Ainsi, pour le génotype P118, les nodosités sont restées le puits prioritaire pour les assimilats carbonés, même en situation de réduction de leur disponibilité.

Suite à la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère, le maintien du flux de C vers la biomasse des nodosités (Tableau 6.3) s'est accompagné d'un maintien de l'activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6), résultant à maintenir la vitesse de la fixation symbiotique à l'échelle de la plante et *in fine* en une légère augmentation de l'INN à une valeur supérieure à 1 (Tableau 6.3).

750 ppm : A la différence du génotype P64, il n'y a aucun impact de l'exposition à une teneur en CO₂ de 750 ppm sur l'assimilation de C dans la biomasse (Tableau 6.3). La réponse adaptative à l'élévation de la teneur en CO₂ a induit une augmentation forte (+ 50 %) du pourcentage d'allocation du C aux racines nodulées, sans modification du rapport d'allocation à la biomasse des racines et des nodosités au sein des parties racinaires (Tableau 6.3). Ainsi, comparée à l'expérience 380 ppm, la force de puits des nodosités pour les assimilats a fortement augmenté (+ 65%), (Figure 6.6) en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂ ; cette augmentation a été associée à un maintien de l'activité spécifique des nodosités (Figure 6.6), et par conséquent à l'échelle de la plante à un maintien de la vitesse de fixation symbiotique et de l'INN à une valeur proche de 1 (Tableau 6.3).

Stratégie adaptative du génotype P121 :

150 ppm : La diminution de la teneur en CO₂ a entraîné la diminution la plus forte de l'assimilation de C dans la biomasse (-45 %) (Tableau 6.3), la très forte diminution de l'activité spécifique de photosynthèse ayant été associée à une faible augmentation de la surface foliaire (Tableau 6.3). En réponse à la diminution de la teneur en CO₂, on a observé pour P121, comme pour P118, une forte augmentation du pourcentage d'allocation de C à la biomasse des racines nodulées, mais contrairement à P118, sans modification substantielle du rapport d'allocation du C à la biomasse pour la croissance des racines et des nodosités au sein des parties racinaires (Tableau 6.3). Ainsi, comme pour P118, les nodosités sont restées le puits prioritaire pour les assimilats carbonés, résultant toutefois pour P118 en une faible diminution de la force de puits des nodosités à 150 ppm (Figure 6.6). Et contrairement à P118, la faible baisse de la force de puits des nodosités s'est accompagnée d'une diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6). Ainsi, pour P121 comme pour P64, la diminution de la disponibilité en assimilats C a induit une diminution conjointe de la croissance des nodosités et de leur activité spécifique de fixation symbiotique (Figure 6.6). Cette diminution de l'activité spécifique de fixation a induit une diminution de la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante et par conséquent une baisse l'INN en réponse à la diminution de la teneur en CO₂. Toutefois l'INN à 380 ppm étant supérieur à 1, l'INN est resté supérieur à 1 à 150 ppm malgré une baisse substantielle suite à la diminution de la teneur en CO₂ (Tableau 6.3).

750 ppm : L'exposition à une forte teneur en CO₂ de 750 ppm n'a pas eu d'impact sur l'allocation de C dans la biomasse chez P121 (Tableau 6.3). Comme pour P118, en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, on a observé une augmentation du pourcentage d'allocation du C pour la croissance des racines nodulées, sans modification du rapport d'allocation du C à la biomasse des racines et des nodosités au sein des racines nodulées (Tableau 6.3), associée à une augmentation de la force de puits des nodosités de l'ordre de +60 %. Du fait de la forte biomasse des nodosités pour le génotype P121, cette augmentation a été associée à l'augmentation de la quantité de C allouée à la biomasse totale des nodosités la plus forte (Tableau 6.3). Et contrairement à P118, cette augmentation de la force de puits des nodosités a été associée à une diminution de leur activité spécifique de fixation symbiotique. Ainsi, l'exposition à 750 ppm a une diminution de la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante, résultant en une baisse de l'INN jusqu'à une valeur proche de 1 (nutrition azotée optimale) (Tableau 6.3).

Comme pour les génotypes sauvages et P64, on peut faire l'hypothèse que la diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique suite à l'élévation de la teneur en CO₂ est imputable à l'augmentation de la compétition pour le C avec l'allocation du C à la croissance des nodosités, dont la force de puits a augmenté à forte teneur en CO₂. Ainsi, pour ces 3 génotypes, l'augmentation de l'allocation du C aux nodosités en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, a en premier lieu profité à la croissance des racines, mais défavorisé leur activité spécifique de fixation symbiotique.

Finalement, il apparaît que les stratégies de réponse des mutants P118 et P121 aux variations de teneurs en CO₂ de l'atmosphère sont proches. Elles consistent à maintenir en

priorité un flux d'assimilats carbonés vers les nodosités quelle que soit la teneur en CO₂. La différence principale entre les génotypes est que P118 maintient la fonction de fixation symbiotique d'azote à un niveau constant quel que soit celui du CO₂ atmosphérique. Pour le génotype P121, comme pour P64 (et le génotype sauvage), l'allocation de C aux nodosités pour leur croissance a généralement limité la quantité de C disponible pour réaliser la fonction de fixation symbiotique d'azote des nodosités.

6.4 Conclusion

L'utilisation d'une plus faible teneur en CO₂ par rapport à la teneur ambiante a induit pour chaque génotype une plus faible activité photosynthétique induisant une plus faible photosynthèse nette, (ou assimilation de C dans la biomasse). Celle-ci a pu s'accompagner également d'une plus faible quantité de C perdue par la respiration. De façon opposée, lors de l'utilisation d'une teneur plus élevée en CO₂ de 750 ppm, on a observé une plus forte activité photosynthétique chez 2 des 4 génotypes (sauvage et P64). Seul P64 a montré une accumulation du C dans la biomasse supérieure à 750 ppm comparé à 380 ppm. Il est possible que la quantité de C perdue par la respiration ait été plus importante chez chaque génotype, expliquant l'absence d'augmentation d'accumulation de C dans la biomasse.

Nos résultats ont montré qu'un changement de la teneur atmosphérique en CO₂ n'induisait pas de plus forte vitesse de fixation symbiotique d'azote. En effet, celle-ci a été soit maintenue comme observé pour le génotype sauvage dans l'expérience 150 ppm et pour les mutants P64 et P118 dans les expériences 150 et 750 ppm, soit elle a été réduite comme chez le génotype sauvage (expérience 750 ppm) et le P121 (expérience 150 et 750 ppm). Seul le génotype sauvage dans l'expérience 150 ppm a montré une activité spécifique de fixation symbiotique plus importante. L'activité spécifique était ainsi plus faible chez le génotype sauvage dans l'expérience 750 ppm et chez les mutants P64 et P121 dans les expériences 150 et 750 ppm comparé à l'expérience 380 ppm. Le P118 n'avait présenté aucune variation de l'activité spécifique de fixation symbiotique en fonction de la teneur en CO₂ utilisée.

Ces résultats réfutent notre hypothèse que l'utilisation d'une teneur atmosphérique en CO₂ plus élevée, conduisant à une augmentation moyenne de la photosynthèse de 37% (tous génotypes confondus), pouvait induire une activité spécifique de fixation symbiotique d'azote plus importante.

Discussion : Un nombre important d'études ont montré que l'utilisation d'une forte teneur en CO₂ peut conduire généralement à un maintien voire une augmentation de la fixation symbiotique d'azote. Une augmentation de la concentration en CO₂ pendant 6 jours chez le Soja provoque une augmentation de 18% de l'activité nitrogénase (Cen et Layzell 2004) et donc de la fixation symbiotique d'azote (Rogers et al. 2009). Chez le Soja la concentration en N totale d'un mutant hypernodulant (muté sur le gène *NARK* homologue de *SYM29* chez le pois) soumis à une forte teneur en CO₂ n'était pas supérieure à celle observée à teneur ambiante en CO₂ (Nishimura et al. 2002; Searle et al. 2003; Matsunami et al. 2009; Hayashi et al. 2012). L'activité de fixation symbiotique par les nodosités ne changeait pas alors qu'elle diminue dans notre expérience.

A l'inverse, Haase et al. (2007) et Kirschbaum (2011) expliquaient dans leurs études que l'utilisation d'une forte teneur en CO₂ chez des plantes soumises à une carence résulterait en une exacerbation de celle-ci. Chez les mutants hypernodulants, la formation de nodosités s'effectue au détriment de celle des autres compartiments (Voisin et al. 2007), notamment des parties racinaires, qui peuvent être réduites de 60 à 80 % chez les hypernodulants (Voisin et al. 2013). Ceci peut ainsi induire une déficience dans l'acquisition de certains éléments nécessaires à la croissance des plantes. Cette déficience pourrait être exacerbée par l'utilisation de la forte teneur en CO₂ et provoquer une diminution de la fixation symbiotique d'azote. Enfin, Rogers et al. (2009) expliquaient dans leur revue qu'une exposition à une forte teneur en CO₂ pouvait provoquer une diminution de la fixation symbiotique d'azote à cause d'une limitation par la disponibilité des autres nutriments nécessaire à la croissance des plantes.

Il est probable que les éléments observés dans notre étude soient en effet la conséquence d'une limitation en nutriments par l'exposition à une forte teneur en CO₂, induisant alors une diminution de la fixation symbiotique d'azote.

7 Réponse adaptative des 4 géotypes de pois protéagineux à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes.

7.1 Problématique et hypothèses

Nous avons étudié la réponse adaptative des 4 géotypes 8 jours après l'ablation d'une partie du système souterrain, sous exposition à 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes. L'exposition à des teneurs en CO₂ différentes peut avoir un effet synergique ou antagoniste à l'effet de l'ablation d'une partie du système racinaire, sur la nutrition N et la croissance des différents géotypes.

L'impact d'une ablation d'une partie des racines nodulées ou de l'exposition à des teneurs atmosphérique en CO₂ faible ou élevée a été quantifié séparément, dans les parties 4 et 6 précédentes, respectivement.

En moyenne (pour les 3 expériences menées à 3 teneurs en CO₂ différentes), l'intensité des traitements a résidé pour tous les géotypes en une ablation de 50 % des racines nodulées (Tableau 7.1). En moyenne, nos mesures sur l'ensemble des géotypes, au moment de l'application du traitement CO₂ (cf. figure 5.2), ont montré que l'exposition à une faible teneur en CO₂ a induit quant à elle induit une diminution moyenne de - 49 % de la photosynthèse nette des parties aériennes (comparée à une teneur ambiante de 380 ppm), alors qu'une teneur élevée en CO₂ de 750 ppm a conduit à une augmentation moyenne de + 37% de la photosynthèse nette des parties aériennes.

Ainsi, la tolérance des plantes à l'ablation d'une partie des racines nodulées a pu être modifiée par l'exposition à des teneurs en CO₂ différentes. Notre hypothèse est que l'exposition des plantes à une teneur en CO₂ élevée pourrait accentuer la carence en N induite par la suppression de la moitié des racines nodulées, du fait de l'augmentation de la croissance (et donc de la demande en N) potentiellement associée à l'élévation de la teneur en CO₂. A l'inverse, l'exposition à une teneur en CO₂ faible pourrait atténuer l'intensité de la carence N induite par l'ablation racinaire, du fait de la diminution de la croissance, et donc de la demande en azote associée à la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère.

Ainsi, l'ablation des racines nodulées et l'impact de l'exposition à une faible teneur en CO₂ étant approximativement du même ordre de grandeur mais d'un effet opposé sur la fixation symbiotique d'N et la croissance, on pourrait assister à une atténuation de l'impact de l'ablation des racines nodulées à 150 ppm, comparé à l'impact mesuré à la teneur en CO₂ de référence (380 ppm). A l'inverse, l'impact de l'utilisation d'une teneur en CO₂ de 750 ppm ayant un impact sur l'équilibre C-N allant dans le même sens que l'impact d'une ablation des racines nodulées, on pourra observer une accentuation de l'impact de l'ablation à 750 ppm par rapport aux mesures réalisées à 380 ppm.

Tableau 7.1 Caractérisation des traitements Ablation et CO₂ chez le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants : P64, P118 et P121

	Sauvage	P64	P118	P121
Proportion moyenne de racines nodulées retirées par l'ablation	-57%	-48%	-49%	-59%
Variation par rapport à 380 ppm de l'assimilation de C dans la biomasse à :				
150ppm	-24%	-31%	-29%	-45%
750ppm	0%	+37%	0%	0%

La proportion de racines nodulées moyenne retirées par l'ablation est une valeur moyenne sur les 3 expériences menées à 3 teneurs en CO₂ différentes

Toutefois, nous avons montré dans les parties précédentes que l'impact de l'ablation et de la modification de la teneur en CO₂ sur la fixation symbiotique et la croissance varient entre géotypes :

Dans la partie 4, nous avons démontré que la **réponse des plantes à l'ablation** pouvait varier entre le géotype sauvage et les mutants hypernodulants. En effet, l'ablation avait induit une diminution de la fixation symbiotique d'azote pour les tous géotypes. Cependant, cette diminution était globalement plus faible chez les mutants hypernodulants comparés au sauvage. Ainsi, le sauvage possédait la plus forte diminution de la fixation d'azote. P64 montrait une diminution proche du sauvage mais légèrement moins importante. Enfin, les hypernodulants P121 et P118 montraient une diminution de la fixation d'N respectivement modérée et faible. Seul le mutant P118 ne présentait pas de diminution de l'activité spécifique de fixation d'N en réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées. La réponse adaptative de tous les géotypes à l'ablation des racines a été une augmentation de la force de puits des nodosités. Cette réponse s'est traduite en une accélération de la croissance des nodosités, forte chez le P121, modérée chez P118 alors qu'aucune modification de la croissance des nodosités n'a été observée 8 jours après traitement chez le sauvage et P64.

La partie 6 décrivant l'impact d'une **modification de la teneur en CO₂** sur la fixation d'azote, a montré que la réponse variait entre géotypes.

La diminution de la teneur en CO₂ à 150 ppm a induit une diminution de l'assimilation du C dans la biomasse pour tous les géotypes, alors que l'augmentation de la teneur en CO₂ à 750 ppm n'a été associée à une augmentation de l'assimilation du C dans la biomasse que pour le géotype P64 (Tableau 7.1). Etant donné l'augmentation moyenne sur l'ensemble des plantes de la photosynthèse nette des parties aériennes de + 37 %, on a fait l'hypothèse que l'absence de variation de l'assimilation du C dans la biomasse à 750 ppm chez le sauvage, P118 et P121 était associée à une augmentation de la photosynthèse brute et du C perdu par la respiration des parties racinaires (cf. partie 6.1)

Le mutant P64 présentait globalement une réponse à la modification de la teneur en CO₂ proche de celle du sauvage, dans le sens d'une restauration de l'équilibre fonctionnel C-N, avec toutefois une plus faible allocation du C vers les nodosités chez P64. En revanche, P118 et P121 maintenaient tous les deux la priorité pour l'allocation du C vers les racines nodulées quelle que soit la teneur en CO₂ utilisée. Le P118 montrait également un maintien de la fixation symbiotique d'N et de l'activité spécifique de fixation d'N quelle que soit la teneur en CO₂.

Dans cette partie de notre étude, nous comparons les réponses des 4 géotypes à l'ablation de la moitié des racines nodulées, sous 3 teneurs atmosphériques en CO₂. Ainsi, pour chaque variable de réponse analysée, nous avons comparé, entre géotypes et entre teneurs atmosphériques en CO₂, le pourcentage de variation existant entre les plantes ayant subi l'ablation et les plantes témoins dont les racines étaient intactes.

Tableau 7.2 Impact de l'ablation d'une partie des racines nodulées sur la photosynthèse à différentes teneurs en CO₂ pour les 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. Mesures effectuées 8 jours après le début des traitements.

Teneur en CO ₂ atmosphérique	Géotype	Assimilation du carbone dans la biomasse	Surface foliaire	Activité spécifique de photosynthèse
150 ppm	Sauvage	- 38%	- 24%	- 17%
	P64	+ 4% (ns)	+ 9% (ns)	- 5% (ns)
	P118	- 4% (ns)	- 1% (ns)	- 3% (ns)
	P121	+ 14% (ns)	+ 20% (ns)	- 3% (ns)
380 ppm	Sauvage	+ 20% (ns)	- 12% (ns)	+ 37%
	P64	+ 9% (ns)	- 13% (ns)	+ 29%
	P118	+ 9% (ns)	- 4% (ns)	+ 16%
	P121	+ 37%	+ 1% (ns)	+ 37%
750 ppm	Sauvage	- 6% (ns)	- 16% (ns)	+ 8% (ns)
	P64	- 33%	- 16% (ns)	- 20%
	P118	+ 22% (ns)	- 20% (ns)	+ 55%
	P121	+ 15% (ns)	+ 1% (ns)	+ 10% (ns)

Chaque valeur représente le pourcentage moyen de variation entre les plantes ayant subi l'ablation et les plantes dont les racines nodulées sont restées intactes, calculé sur 8 plantes. Les variations suivies de « ns » ne sont pas significatives (test 2 à 2 de Student). Les cases colorées en rouge indiquent un effet positif de l'ablation, la couleur verte un effet négatif et les cases bleues une absence d'effet significatif.

7.2 *Impact sur la nutrition N en relation avec la croissance*

7.2.1 **Impact sur l'assimilation de C dans la biomasse**

L'assimilation de C dans la biomasse a été mesurée à l'aide d'un marquage isotopique au ¹³C réalisé 5 jours après le début du traitement CO₂, et analysé sur des plantes récoltées après 8 jours de traitement CO₂.

Nous avons vu dans la partie 6 que l'assimilation du C dans la biomasse et/ou la photosynthèse nette avaient varié sous l'effet de la modification de la teneur en CO₂. La diminution de la teneur en CO₂ de 380 ppm à 150 ppm a induit une diminution d'assimilation du C dans la biomasse. L'élévation de la teneur en CO₂ de 380 ppm à 750 ppm a induit une augmentation de la photosynthèse nette des parties aériennes pour tous les génotypes, et de l'assimilation du C dans la biomasse pour le génotype P64 seulement (+ 37 %).

Dans la partie 4, nous avons montré que l'ablation de la moitié des parties racinaires, bien qu'ayant un fort impact sur le prélèvement de N et la teneur en N des feuilles, avait peu modifié la vitesse d'accumulation du C dans la biomasse. Toutefois, suite à l'ablation des racines nodulées, une augmentation de l'assimilation du C a été observée pour le génotype P121 (+ 37 %), associée à une augmentation de l'activité spécifique de photosynthèse des feuilles pour l'assimilation du C dans la biomasse. Cette augmentation a été attribuée à la diminution des coûts respiratoires liée à la suppression d'une partie des racines nodulées ; pour les autres génotypes, la variation de l'activité spécifique de photosynthèse suite à l'ablation des racines nodulées était en tendance positive, mais non significative. Nous faisons l'hypothèse que l'effet pourrait être atténué à 150 ppm, et augmenté à 750 ppm.

A 150 ppm, comme à 380 ppm, l'impact de l'ablation des racines nodulées sur l'assimilation du C sur la biomasse a globalement été faible (Tableau 7.2).

- Dans l'expérience 150 ppm, l'ablation des racines nodulées n'a induit aucune variation significative de l'accumulation du C en réponse à l'ablation pour les 3 hypernodulants: pour ces génotypes, on peut considérer que la teneur en CO₂ a été le premier facteur limitant de l'accumulation du C dans la biomasse, à la fois pour les plantes témoins et les plantes ayant subi l'ablation.

- Chez le sauvage, l'ablation des racines nodulées dans l'expérience 150 ppm a induit une diminution supplémentaire de l'assimilation du C dans la biomasse de - 38 %, associée à une diminution de - 17% de l'activité spécifique de photosynthèse et de - 24% de la surface foliaire, en comparaison aux plantes aux racines intactes (Tableau 7.2). Ces diminutions peuvent être attribuées à un effet limitant de l'azote, dont l'acquisition a été la plus fortement diminuée en réponse à l'ablation chez le génotype sauvage (-72 %, Figure 7.1).

Dans l'expérience 750 ppm, contrairement à 380 ppm, l'augmentation d'accumulation de C dans la biomasse observée pour le génotype P121 suite à l'ablation des nodosités a été atténuée à 750 ppm, pour devenir 2 fois plus faible et non significative (Tableau 7.2). Pour le génotype P64, l'ablation des nodosités a été associée à une diminution de l'assimilation du C

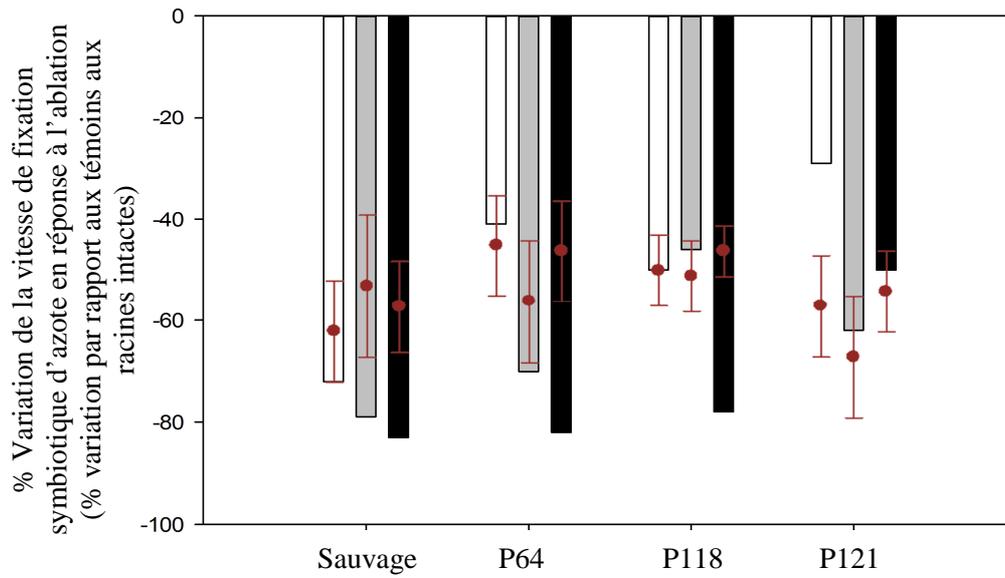


Figure 7.1 **Effet de la réponse de la vitesse de fixation symbiotique d’N à l’ablation d’une partie des racines nodulées sous 3 teneurs en CO₂ différentes, pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La vitesse de fixation symbiotique d’N des plantes ayant subi l’ablation a été mesurée en gN fixé. jour⁻¹. plante⁻¹, 5 jours après le début du traitement, par marquage isotopique au ¹⁵N et exprimée en variation par rapport aux plantes témoins aux racines intactes dans l’expérience 150 ppm (barres blanches), dans l’expérience 380 ppm (barres grises) et dans l’expérience 750 ppm (barres noires). Les points rouges indiquent le pourcentage d’ablation des racines nodulées avec leur écart type (barres verticales).

dans la biomasse, du même ordre de grandeur que l'augmentation induite pour ce génotype par l'utilisation d'une forte teneur en CO₂ de l'atmosphère (cf Tableau 6.3).

Dans l'expérience à 380 ppm, l'ablation des racines nodulées n'avait pas induit de variation de l'accumulation du C dans la biomasse pour les génotypes sauvage, P64, et P118, mais avait induit une augmentation de + 37 % pour le génotype P121.

Dans l'expérience 150 ppm, l'ablation des racines nodulées n'a pas eu d'impact sur l'assimilation du C dans la biomasse chez les hypernodulants mais a induit une diminution de - 38 % pour le génotype sauvage.

Dans l'expérience 750 ppm, l'ablation des racines nodulées n'a pas eu d'impact sur l'assimilation du C dans la biomasse chez le sauvage, P118 et P121, mais a induit une diminution de - 33 % pour le génotype P64.

7.2.2 Impact sur la fixation symbiotique

La fixation symbiotique a été mesurée à l'aide d'un marquage isotopique au ¹⁵N₂ réalisé 5 jours après l'ablation d'une partie des racines nodulées et analysé sur les plantes récoltées après 8 jours de traitement.

Dans l'expérience menée à 150 ppm, la vitesse de fixation symbiotique (en g N fixé. jour⁻¹. plante⁻¹) a diminué de -72 %, -41 %, -50 % et -35 % pour les génotypes sauvage, P64, P118 et P121, suite à l'ablation de la moitié des racines nodulées, par comparaison aux plantes dont les racines sont restées intactes (Figure 7.1).

Pour les génotypes **sauvage et P118**, cet impact a été du même ordre de grandeur que celui mesuré à 380 ppm, avec un impact de l'ablation des racines nodulées sur l'activité spécifique de fixation des nodosités également du même ordre de grandeur qu'à 380 ppm (diminution autour de -60 % pour le sauvage et de -10 % pour P118) (Figure 7.2).

Pour les génotypes **P64 et P121**, l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la vitesse de fixation symbiotique a été moindre d'environ -40 % par rapport à l'impact mesuré à 380 ppm. Ce moindre impact a été associé à un impact nul de l'ablation des racines nodulées sur l'activité spécifique de fixation des nodosités pour le génotype P64 et positif (+ 50 %) chez P121, alors que l'impact à 380 ppm était autour de -40 % pour ces 2 génotypes (Figure 7.2).

Dans l'expérience menée à 750 ppm, la vitesse de fixation symbiotique (en g N fixé. jour⁻¹. plante⁻¹) a diminué de -83 %, -82 %, -78 % et -50 % pour les génotypes sauvage, P64, P118 et P121, respectivement, suite à l'ablation de la moitié des racines nodulées, par comparaison aux plantes dont les racines sont restées intactes (Figure 7.1).

Chez le **sauvage**, l'impact de l'ablation de la moitié des racines nodulées sur la vitesse de fixation symbiotique d'N et sur l'activité spécifique des nodosités n'a pas varié entre les expériences 380 et 750 ppm (autour de -80% et -60 % pour ces 2 variables respectivement, par rapport aux plantes dont les racines sont restées intactes) (Figures 7.1 et 7.2).

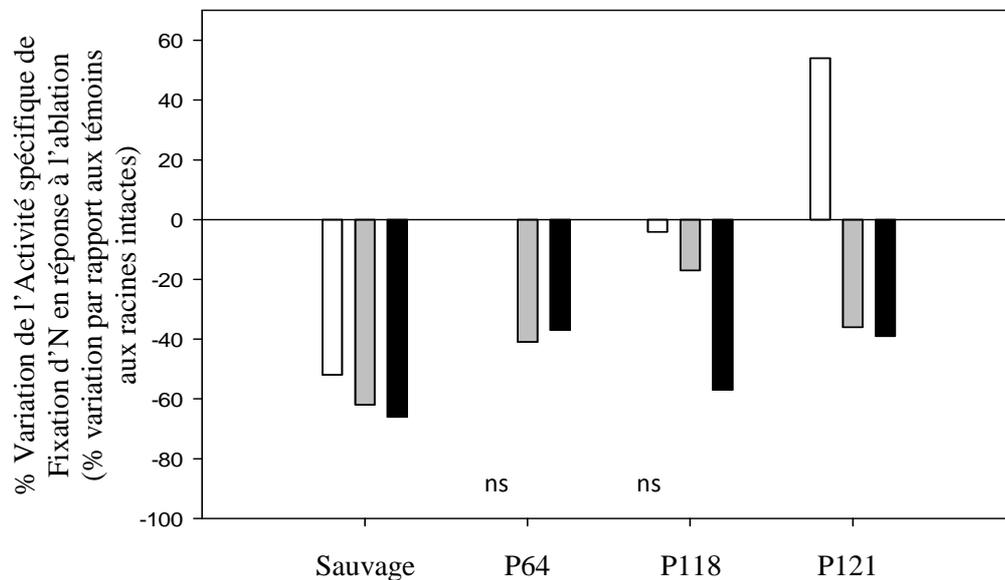


Figure 7.2 **Effet de la réponse de l'activité spécifique de fixation d'N à l'ablation d'une partie des racines nodulées, sous 3 différentes teneurs en CO₂, pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L'activité spécifique de fixation d'N des nodosités des plantes ayant subi l'ablation a été mesurée en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité, 5 jours après le début du traitement, par marquage isotopique au ¹⁵N et exprimée en variation par rapport aux plantes témoins aux racines intactes dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), dans l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750 ppm (barres noires). ns signifie que l'activité spécifique de fixation des plantes ayant subi l'ablation n'est pas significativement différente de celle des plantes aux racines intactes (test 2 à 2 de Student).

Pour **P64 et P121**, la diminution de la vitesse de fixation symbiotique en réponse à l'ablation a été du même ordre de grandeur qu'à 380 ppm bien que légèrement plus élevée chez P64 (-80 % vs -70 %), et légèrement plus faible chez P121 (-50 % vs -62 %) (Figure 7.1), avec une chute d'activité spécifique du même ordre de grandeur à 750 ppm qu'à 380 ppm (autour de -40 % pour les 2 génotypes) (Figure 7.2).

Pour **P118**, la diminution de la vitesse de fixation symbiotique en réponse à l'ablation a été beaucoup plus élevée qu'à 380 ppm (-78 % vs -46 %), avec une forte chute de l'activité spécifique de fixation à 750 ppm (-57 %) alors que la diminution n'était que de -17 % à 380 ppm (Figure 7.2).

7.2.3 Impact sur le statut N

L'étude de l'Indice de Nutrition Azotée (INN) indique le statut N de la plante, et permet d'analyser le niveau de satisfaction des besoins en N pour la croissance de la plante. Suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées, nous avons montré que l'acquisition d'N a diminué pour tous les génotypes (partie 4). Nous avons également montré que l'exposition à différentes teneurs atmosphériques en CO₂ a induit des variations de croissance (partie 6), modifiant par conséquent les besoins en N associés et donc le statut azoté de la plante. Par ailleurs, la dérégulation de la formation des nodosités chez les mutants hypernodulants est associée à une dérégulation de la perception du statut azoté par ces plantes.

Nous pouvons faire l'hypothèse que la nutrition azotée et la réponse de la fixation symbiotique aux variations de statut N induite par la combinaison des traitements « ablation des racines nodulées » et « modification des teneurs en CO₂ » pourra être différemment affectée par l'ablation d'une partie des racines nodulées sous différentes teneurs en CO₂ chez les mutants hypernodulants comparés à un sauvage, et que la réponse adaptative des génotypes sera différente.

Chez le sauvage, la diminution de la fixation symbiotique d'azote, suite à l'ablation, était relativement proche entre expériences menées à des teneurs en CO₂ différentes (entre -72 et -83 %) (Figure 7.1). On observe que l'exposition à des teneurs atmosphériques en CO₂ différentes n'a pas impacté la réponse de l'INN à l'ablation des racines nodulées. En effet, en réponse à l'ablation et à la baisse de la fixation d'azote associée, l'INN a diminué de -14 à -17 % quelle que soit la teneur en CO₂ de l'atmosphère (Figure 7.3). Ainsi, suite à l'ablation, l'INN est devenu inférieur à 1 (entre 0.74 et 0.88 pour les 3 expériences), signifiant que la nutrition azotée est devenue légèrement insuffisante et limite ainsi la croissance du génotype sauvage, celui-ci étant en état de carence en azote. A 750 ppm, le cumul des effets négatifs des traitements « forte teneur en CO₂ » et « ablation des racines nodulées » ont conduit à l'INN le plus bas (0.74).

Chez le mutant P64, à l'inverse du sauvage, la réponse de l'INN à l'ablation des racines nodulées a été différente selon les teneurs en CO₂ expérimentées (Figure 7.3). A 380 ppm, l'ablation avait induit une diminution de -24 % de l'INN passant de 0.94 à 0.72 induisant ainsi une nutrition très insuffisante en N (figure 7.3 B.), alors qu'à 150 ppm et à 750

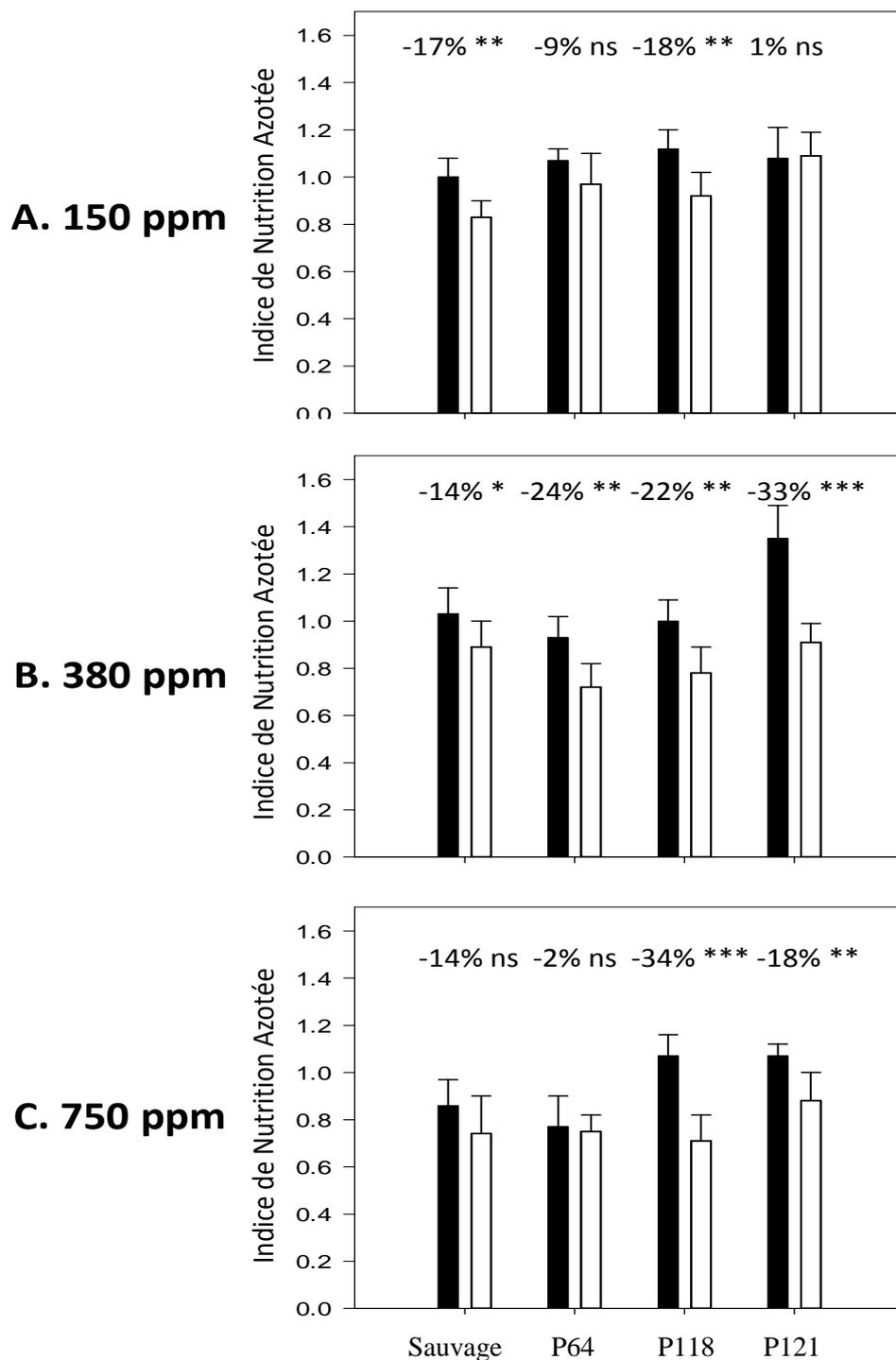


Figure 7.3 Effet de la réponse de l'Indice de Nutrition Azotée (INN) à l'ablation d'une partie des racines nodulées, sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. L'INN des plantes témoins dont les racines nodulées sont restées intactes (barres noires) et ayant subi l'ablation (barres blanches) a été mesuré 8 jours après le début du traitement dans A : l'expérience 150 ppm, B : l'expérience 380 ppm et C : dans l'expérience 750 ppm. Les barres verticales indiquent l'écart type. * représente une différence significative (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001).

ppm, l'ablation des nodosités a été associée à un maintien de l'INN, par rapport aux plantes témoins aux racines intactes (Figure 7.3 A. et B.).

Dans l'expérience 150 ppm, par rapport à l'expérience menée à 380 ppm, l'ablation d'une partie des racines nodulées n'a pas induit de diminution de l'INN, permettant au P64 de conserver un INN légèrement supérieur à 1 (1.07) signifiant une nutrition azotée faiblement supra-optimale (Figure 7.3 A.). Ces résultats sont à mettre en relation avec le maintien de l'activité spécifique de fixation observé chez P64, suite à l'ablation à 150 ppm (Figure 7.2), alors que l'activité spécifique de fixation avait diminué en réponse à l'ablation à 380 ppm (Figure 7.1).

A 750 ppm, la diminution de la vitesse de fixation d'azote suite à l'ablation (Figure 7.1) s'est accompagnée d'une diminution de l'assimilation de C dans la biomasse chez P64 (-33 %) (cf. Tableau 7.2), résultant en un maintien de l'INN par comparaison aux plantes aux racines intactes à 750 ppm (Figure 7.3 C.). Or l'exposition des plantes témoins (aux racines intactes) de P64 à une teneur élevée de 750 ppm avait induit une diminution de l'INN à une valeur inférieure à 1 (0.76 ; Figure 7.3 C.). Celle-ci résultait de l'augmentation de l'assimilation de C dans la biomasse en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, par contre associée à une faible diminution de la fixation d'azote (Tableau 6.3). Cette faible valeur d'INN traduisant une nutrition N insuffisante a été maintenue suite à l'ablation des racines nodulées (Figure 7.3 C.).

Chez le mutant P118, l'impact de l'ablation des nodosités sur l'INN a été similaire à 150 ppm et 380 ppm, avec une baisse de l'INN de l'ordre de -20 % dans les 2 conditions de CO₂ atmosphérique, avec des valeurs diminuant de 1 à 0.92 et 0.78 respectivement, et donc une nutrition azotée très légèrement insuffisante dans ces 2 expériences (Figure 7.3 A. et B.). Cependant l'impact de l'utilisation d'une teneur en CO₂ de 750 ppm a été plus important. Contrairement aux expériences à 150 ppm et à 380 ppm dans lesquelles l'activité spécifique de fixation des nodosités avait peu diminué (voire avait été maintenue) suite à l'ablation (Figure 7.2), à 750 ppm, la chute de -57 % de l'activité spécifique de fixation par rapport aux plantes aux racines intactes a négativement impacté la nutrition azotée, résultant en une diminution de -34% de l'INN (passant de 1.07 à 0.71), la nutrition azotée devenant fortement carencée en azote pour les plantes ayant subi l'ablation de la moitié de leurs racines (Figure 7.3).

Pour le mutant P121, à 380 ppm, la forte biomasse des nodosités des plantes témoins aux racines intactes étant associée à un INN très supérieur à 1 (1.35), la nutrition azotée était alors supra optimale. A 380 ppm, l'ablation de la moitié des nodosités avait rétabli l'équilibre entre offre et besoins en N pour la croissance, résultant en un INN de 0.9 (Figure 7.3 B.). Chez les plantes témoins, l'utilisation d'une faible teneur en CO₂ avait réduit de manière importante l'assimilation de C dans la biomasse chez le P121 (Partie 6, Tableau 6.1), et avait été associée à une plus forte diminution de la vitesse de fixation d'azote (Partie 6, Figure 6.1) et donc à une diminution de l'indice de nutrition azotée (Partie 6, Figure 6.3). A 150 ppm, suite à l'ablation de la moitié des racines nodulées, on a observé une forte augmentation de l'activité spécifique de fixation (+ 54%) comparée aux plantes témoins aux racines intactes

(Figure 7.2), associée à une diminution de la vitesse de fixation symbiotique moins élevée qu'à 380 ppm (Figure 7.1), et du même ordre de grandeur que la diminution de croissance induite par la diminution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère. Ainsi, à 150 ppm, la nutrition azotée du P121 n'a pas été impactée par l'ablation des racines nodulées, comme en témoigne l'absence de variation de l'INN entre plantes ayant subi l'ablation et plantes témoins aux racines intactes, pour une valeur de 1.08 en moyenne (Figure 7.3 A.). Dans l'expérience 750 ppm, la fixation d'azote des plantes témoins est fortement diminuée, avec un INN passant de 1.35 à 380 ppm à 1.07 à 750 ppm (Partie 6, Figure 6.3). Suite à l'ablation, l'activité spécifique de fixation (Figure 7.2) et donc la vitesse de fixation d'azote (Figure 7.1) ont encore chuté, induisant une nutrition azotée légèrement insuffisante (INN de 0.88) (Figure 7.3 C.).

7.2.4 Synthèse sur l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la nutrition azotée en relation avec la croissance

L'impact des variations de teneur en CO₂ sur la réponse de la fixation symbiotique à l'ablation de la moitié des racines nodulées a été globalement plus important chez les mutants hypernodulants que chez le génotype sauvage.

A 150 ppm, en réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées, la diminution de la biomasse des nodosités a logiquement entraîné une diminution de la vitesse de fixation d'azote chez tous les génotypes, de -72 % chez le sauvage et de -29 % à -50 % chez les hypernodulants. L'impact de l'ablation des racines nodulées sur la vitesse de fixation symbiotique a ainsi été du même ordre de grandeur qu'à 380 ppm pour les génotypes sauvage et P118, mais moindre pour P64 et P121.

A 150 ppm, comme à 380 ppm, l'activité spécifique de fixation a diminué chez le **sauvage** en réponse à l'ablation, et a été maintenue pour **P118**. L'ablation des racines nodulées a induit une diminution de l'indice de nutrition azotée à une valeur sub-optimale chez le sauvage et P118, de manière similaire à celle observée à 380 ppm.

Pour **P64** et **P121**, à 150 ppm, contrairement à 380 ppm, l'activité spécifique de fixation n'a pas diminué suite à l'ablation des racines nodulées, mais maintenue pour P64, et augmentée pour P121. Pour ces génotypes, l'ablation des racines nodulées n'a pas induit de variation de l'indice de nutrition azotée, avec un maintien à une nutrition azotée optimale, alors que l'on avait observé une diminution de l'INN à 380 ppm.

A 750 ppm, en réponse à l'ablation des racines nodulées, la vitesse de fixation d'azote a fortement diminué chez le sauvage et les mutants P64 et P118 (entre -78 % et -83 %), alors que la diminution a été plus modérée chez le P121 (-50 %).

Ainsi, l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la vitesse de fixation symbiotique a été du même ordre de grandeur qu'à 380 ppm pour le génotype **sauvage**, légèrement plus élevée pour **P64**, et légèrement moindre pour **P121**, sans modification substantielle sur l'activité spécifique des nodosités avec l'élévation de la teneur en CO₂ pour ces 3 génotypes.

Pour P118, l'impact de l'ablation des nodosités sur la vitesse de fixation symbiotique a été beaucoup plus élevé à 750 ppm qu'à 380 ppm, avec une plus forte diminution de la vitesse de fixation symbiotique et de l'activité spécifique des nodosités qu'à 380 ppm.

L'exposition à une forte teneur en CO₂ associée à l'ablation d'une partie des racines ont résulté en *une nutrition azotée insuffisante pour tous les génotypes*. Pour les génotypes **P118** et **P121**, l'INN a diminué suite à l'ablation des racines nodulées à 750 ppm, en raison d'une diminution de l'activité spécifique des nodosités, plus forte pour P118 que pour P121 (et associée à une légère (mais non significative) augmentation de l'assimilation du C dans la biomasse). **Pour P64**, la diminution d'activité spécifique de fixation des nodosités suite à l'ablation des racines nodulées a été compensée par une diminution de l'assimilation du C dans la biomasse du même ordre de grandeur, résultant en un INN équivalent pour les plantes témoins et les plantes ayant subi l'ablation. Pour le génotype sauvage, l'INN a légèrement diminué suite à l'ablation des racines nodulées, en cohérence avec la diminution de l'activité spécifique de fixation des nodosités, par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes.

7.2.5 Discussion sur l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la nutrition N en relation avec la croissance

A 150 ppm : Pour les plantes témoins des mutants hypernodulants **P64** et **P121**, la diminution d'assimilation du carbone dans la biomasse dans l'expérience à 150 ppm avait été associée à une activité spécifique de fixation globalement plus faible, comparée à l'expérience 380 ppm, induisant une fixation d'azote significativement plus faible chez P121 et légèrement diminuée chez P64. Chez P64 et P121, la diminution de l'activité spécifique en réponse à la diminution de la teneur en CO₂ a été interprétée dans la partie 6 comme une limitation par les assimilats carbonés, résultat d'une augmentation de la compétition pour le C entre l'allocation vers des dépenses énergétiques liées à l'activité spécifique de fixation de N₂ et l'allocation du C vers la croissance des nodosités. L'ablation de la moitié des racines nodulées a entraîné une diminution importante de la biomasse des racines nodulées, induisant ainsi une forte diminution des dépenses en C pour la formation, l'entretien et le fonctionnement des nodosités. En cohérence avec les hypothèses réalisées dans la partie 6, cette diminution des dépenses en C induite par l'ablation de la moitié des parties racinaires pourrait expliquer l'augmentation de l'activité spécifique en réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées à 150 ppm, la réponse étant d'autant plus forte que la quantité de nodosités « retirées » était plus importante (P121 par rapport à P64). Cette réponse expliquerait le maintien de l'INN suite à l'ablation des racines nodulées pour ces 2 génotypes (P64, P121).

Pour P118, à 150 ppm, l'activité spécifique des nodosités a été maintenue au même niveau qu'à 380 ppm, pour les plantes témoins comme pour les plantes ayant subi l'ablation ; pour ce génotype, la diminution de vitesse de fixation symbiotique suite à l'ablation a par conséquent été du même ordre de grandeur que le pourcentage d'ablation des nodosités, induisant une réponse de la fixation symbiotique à l'ablation similaire à 380 ppm et 150 ppm, avec en conséquence une diminution de l'INN en réponse à l'ablation dans les 2 conditions de CO₂.

Chez le **sauvage**, en réponse à l'abaissement de la teneur en CO₂ à 150 ppm, la vitesse de fixation symbiotique des plantes témoins avait diminué dans les mêmes proportions que la diminution d'assimilation du C dans la biomasse, en accord avec l'hypothèse d'une régulation de la fixation symbiotique par le statut azoté de la plante, avec un maintien de l'INN à 1. A 150 ppm, comme à 380 ppm, l'ablation des racines nodulées a induit une diminution de l'activité spécifique des nodosités, de l'ordre de 50 à 60 %. Comme à 380 ppm, cette diminution de l'activité spécifique de fixation avec l'ablation des parties racinaires pourrait être attribuée à une limitation du prélèvement en eau ou en autres éléments minéraux, du fait de la perte d'une moitié du système racinaire. Le moindre effet négatif de l'ablation sur l'activité spécifique de fixation effet à 150 ppm (-52 %) par rapport à 380 ppm (-62 %) pourrait s'expliquer par la moindre croissance à 150 ppm (assimilation de C dans la biomasse réduite de - 24 %), générant de moindres besoins en eau et minéraux.

Ainsi, pour les génotypes **sauvage et P118**, contrairement à nos hypothèses de départ, (et pour des raisons différentes), l'exposition à une faible teneur en CO₂ de l'atmosphère n'a pas atténué les effets d'une ablation des racines nodulées sur le statut azoté de la plante : en effet, à 150 ppm comme à 380 ppm, par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes, l'ablation des racines nodulées a été associée à une diminution de la fixation symbiotique, sans modification substantielle de l'assimilation du C dans la biomasse, résultant en une carence azotée pour les plantes ayant subi l'ablation. En effet, l'impact négatif de l'ablation sur l'activité spécifique de fixation (impact fort pour le sauvage, mais faible pour P118) a été similaire à 380 ppm et 150 ppm, et par conséquent l'impact à l'échelle de la plante sur la vitesse de fixation symbiotique a été également similaire pour les 2 teneurs en CO₂ de l'atmosphère, proportionnel au pourcentage d'ablation des racines nodulées pour P118, et plus que proportionnel pour le génotype sauvage.

Pour les génotypes **P64 et P121**, conformément à nos hypothèses de départ, l'exposition à une faible teneur en CO₂ a atténué les effets de l'ablation sur le statut azoté de la plante, avec un maintien de l'INN à 1. Toutefois, contrairement à nos hypothèses, cette atténuation n'a pas été attribuée à la diminution des besoins en azote pour la croissance, mais plutôt à une relative « levée » de la limitation de l'activité spécifique des nodosités (maintien de l'activité spécifique pour P64, augmentation pour P121) par les assimilats carbonés alloués à la croissance des nodosités en réponse à l'ablation, cette moindre limitation étant attribuée à la diminution des dépenses énergétiques au sein du système racinaire du fait de la suppression de la moitié du système racinaire (et donc des nodosités, puits fort en C).

A 750 ppm : Précédemment, on avait mentionné que de nombreuses études chez le haricot (Haase et al. 2007), le soja (Cen et Layzell 2004; Prévost et al. 2009) ont montré qu'une teneur en CO₂ élevée induisait une augmentation de la fixation d'azote par augmentation de la croissance des nodosités et/ou augmentation de l'activité nitrogénase (Hartwig 1998; Zanetti et al. 1998; Cen et Layzell 2004; Prévost et al. 2009; Rogers et al. 2009). Nos résultats sur plusieurs génotypes de pois (partie 6) ont cependant montré que la fixation d'azote était similaire, voire plus faible à forte teneur en CO₂ comparée à une teneur en CO₂ ambiante. Nous avons fait l'hypothèse d'une compétition entre le C alloué à la croissance des nodosités, augmenté en réponse à l'élévation de la teneur en CO₂, et celui

nécessaire à leur fonctionnement. Nous avons mis en évidence une interaction négative entre l'activité spécifique de fixation des nodosités et la quantité de C allouée à leur croissance (Partie 6. Figure 6.5).

Dans notre étude, pour les génotypes sauvage, P118 et P121, conformément à notre hypothèse de départ, les effets négatifs de l'élévation de la teneur en CO₂ et de l'ablation des nodosités sur le statut azoté de la plante se sont cumulés, résultant à 750 ppm en une diminution de l'INN des plantes aux racines coupées, par rapport aux plantes intactes, i.e en une augmentation de la carence en azote suite à l'ablation pour ces génotypes. Pour le génotype P64 en revanche, la diminution de fixation symbiotique des nodosités suite à l'ablation des racines nodulées a été associée à 750 ppm à une diminution de l'assimilation du C dans la biomasse du même ordre de grandeur, résultant en un INN équivalent pour les plantes témoins et les plantes ayant subi l'ablation.

Les études expérimentales analysant l'impact d'une forte teneur en CO₂ sur la fixation d'azote n'incluent pas l'impact de stress biotiques comme les ravageurs, conduisant comme l'ablation, à une modification des capacités de fixation d'azote. Haase et al. (2007) dans son étude sur l'impact d'une augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et Kirschbaum (2011) dans sa review sur les effets d'une augmentation de la photosynthèse sur la croissance des plantes, montraient qu'à forte teneur en CO₂, les limitations provoquées par le manque de nutriments ou d'eau pouvaient être exacerbées. Dans notre étude, à forte teneur en CO₂, l'effet multi stress suite à l'ablation (déficience en N, P, K, S et stress hydrique) a pu être un facteur limitant la réponse du système fixateur.

Enfin, Guo et al. (2012) ont analysé l'impact d'une forte teneur en CO₂ sur la résistance (capacité à empêcher un dommage) et la tolérance (capacité à répondre et à compenser par la croissance suite à un dommage) à un stress biotique chez un génotype sauvage de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de 5 semaines. Leurs résultats suggèrent que l'impact de dommages causés par un stress biotique comme les ravageurs est plus important à teneur en CO₂ élevée, confirmant les observations faites par Haase et al. (2007) et Kirschbaum (2011).

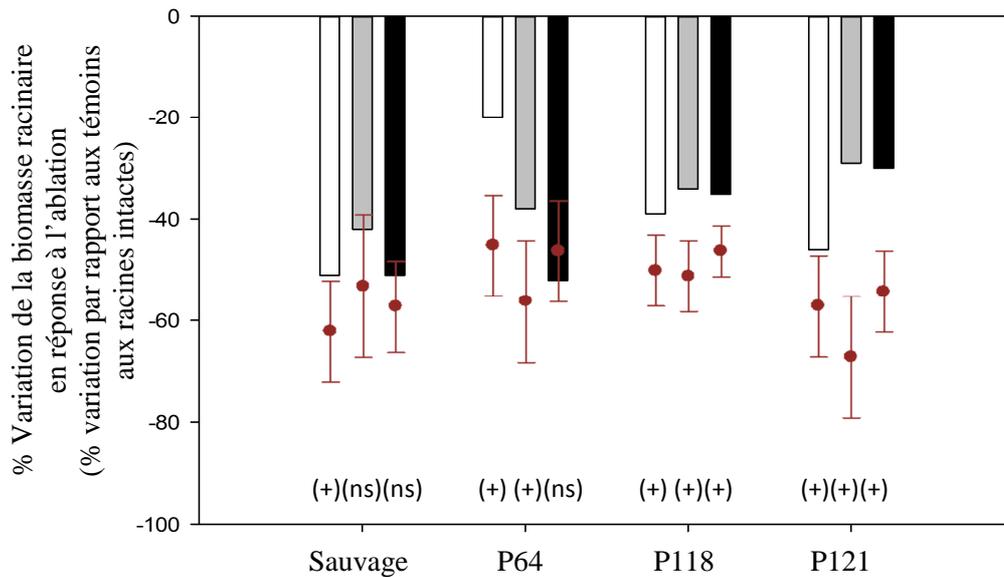


Figure 7.4 **Effet de la réponse de la croissance des racines à l'ablation d'une partie des racines nodulées, sous 3 différentes teneurs en CO₂ pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La biomasse des racines a été mesurée en g. plante⁻¹, 8 jours après le début du traitement, et exprimée en variation par rapport aux plantes témoins aux racines intactes dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), dans l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750 ppm (barres noires). Les points rouges indiquent le pourcentage d'ablation des racines nodulées avec leur écart type (barres verticales). L'impact de l'ablation sur la croissance des racines a été décrit en comparant le % de variation aux pourcentages d'ablation des racines nodulées (cf matériels et méthode 3.6), et noté à l'aide des signes (+), (ns) et (-). Ainsi un pourcentage de variation supérieur au pourcentage d'ablation des racines nodulées (par ex > - 50 %) indique un effet positif de l'ablation sur la croissance des racines, un pourcentage de variation autour du pourcentage d'ablation des racines nodulées une absence d'effet et un pourcentage de variation inférieur au pourcentage d'ablation des racines nodulées (par ex < - 50 %) indique un effet négatif.

7.3 Impact sur la croissance

Nous avons montré dans la partie 4 que l'ablation d'une partie des racines nodulées a induit une modification précoce des flux de C entre compartiments, associée à des modifications de force de puits des compartiments souterrains, associées ou non à des modifications de croissance des racines et des nodosités observables 8 jours après ablation. Nous avons cherché à comprendre quelles sont les réponses adaptatives mises en place par les 4 géotypes en réponse à l'ablation via des modifications de croissance, et leurs variations sous l'effet de modifications de la teneur en CO₂ de l'atmosphère.

7.3.1 Impact sur la croissance des nodosités et des racines

Comme dans la partie 4, nous avons analysé l'effet de l'ablation de la moitié des racines nodulées sur la croissance des nodosités (ou des racines) au cours des 8 jours de traitements (voir Matériels et Méthodes). Ainsi lorsque les variations de biomasse de nodosités (ou de racines) - entre plantes ayant subi l'ablation et plantes témoins aux racines intactes - étaient supérieures au pourcentage d'ablation (\pm l'écart type), nous avons conclu à une diminution de leur croissance suite à l'ablation ; à l'inverse, des variations inférieures au pourcentage d'ablation (\pm l'écart type) nous ont amené à conclure à une augmentation de leur croissance suite à l'ablation.

Pour le géotype sauvage, par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes, la croissance des racines (Figure 7.4) et des nodosités (Figure 7.5) n'a pas significativement varié suite à l'ablation des racines nodulées à 380 ppm et à 750 ppm alors que dans l'expérience à 150 ppm, la croissance des racines et des nodosités a faiblement augmenté suite à l'ablation des racines nodulées.

Pour P64, suite à l'ablation des racines nodulées, la réponse de la croissance des racines a été supérieure à la réponse de la croissance des nodosités aux 3 teneurs en CO₂. Ainsi, l'augmentation de la croissance des racines suite à l'ablation à 380 ppm, a été forte à 150 ppm, alors que la croissance des nodosités n'a pas varié suite à l'ablation. A 750 ppm, suite à l'ablation, la croissance des racines a été maintenue alors que celle des nodosités a ralenti, par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes (Figures 7.4 et 7.5).

Pour P118, la réponse à l'ablation des racines nodulées a été similaire à 150 ppm et à 750 ppm, avec une augmentation modérée de la croissance des racines, sans modification de la croissance des nodosités. A 380 ppm, en réponse à l'ablation des racines nodulées, la croissance des racines et des nodosités a augmenté modérément, et dans les mêmes proportions (Figures 7.4 et 7.5).

P121 est le seul géotype pour lequel la réponse à l'ablation des racines nodulées a été similaire en tendance aux 3 teneurs en CO₂, avec une augmentation conjointe de la croissance des racines et des nodosités suite à l'ablation. Toutefois l'augmentation de la croissance a été forte et du même ordre de grandeur pour les racines et les nodosités à 380 ppm mais la plus forte pour les racines à 750 ppm et la plus forte pour les nodosités à 150 ppm (Figures 7.4 et 7.5).

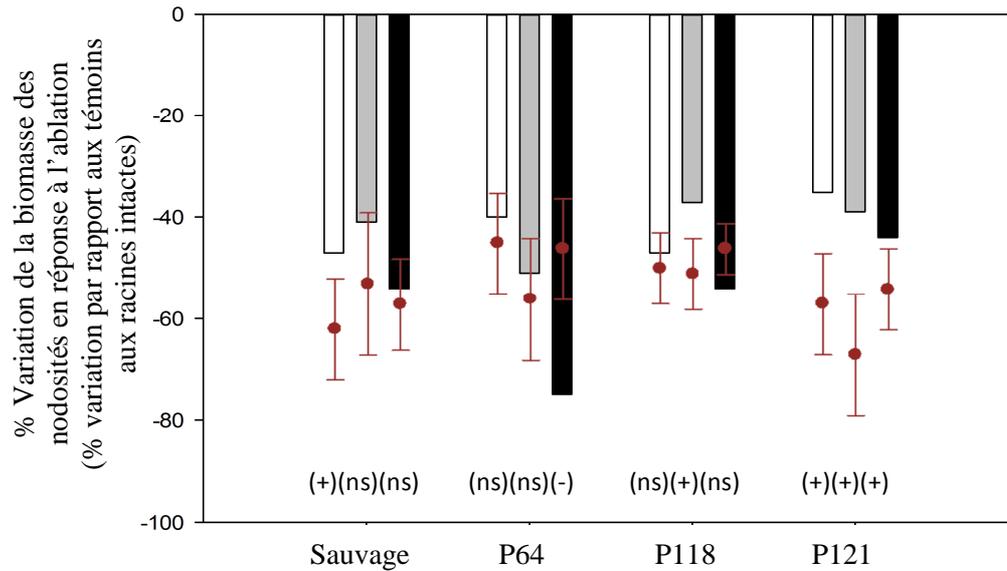


Figure 7.5 **Effet de la réponse de la croissance des nodosités à l'ablation d'une partie des racines nodulées, sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** La biomasse des nodosités a été mesurée en g. plante⁻¹, 8 jours après le début du traitement, et exprimée en variation par rapport aux plantes témoins aux nodosités intactes dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), dans l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750 ppm (barres noires). Les points rouges indiquent le pourcentage d'ablation des nodosités nodulées avec leur écart type (barres verticales). L'impact de l'ablation sur la croissance des nodosités a été décrit en comparant le % de variation aux pourcentages d'ablation des nodosités nodulées (cf matériels et méthode 3.6), et noté à l'aide des signes (+), (ns) et (-). Ainsi un pourcentage de variation supérieur au pourcentage d'ablation des nodosités nodulées (par ex > - 50 %) indique un effet positif de l'ablation sur la croissance des nodosités, un pourcentage de variation autour du pourcentage d'ablation des nodosités nodulées une absence d'effet et un pourcentage de variation inférieur au pourcentage d'ablation des nodosités nodulées (par ex < - 50 %) indique un effet négatif.

7.3.2 Impact sur la croissance des parties aériennes

Dans l'expérience 150 ppm, on a observé un ralentissement de la croissance des parties aériennes du sauvage de -19 % suite à l'ablation de la moitié des racines nodulées. Ce résultat est opposé à celui observé dans l'expérience 380 ppm où suite à l'ablation, il y avait eu une légère accélération de la croissance des parties aériennes chez le sauvage. En revanche, les hypernodulants ont montré une réponse similaire entre les expériences 150 et 380 ppm, soit aucune variation significative de la croissance des parties aériennes en réponse à l'ablation (Figure 7.6).

Dans l'expérience 750 ppm, la croissance des parties aériennes n'a été modifiée significativement chez aucun génotype suite à l'ablation (Figure 7.6).

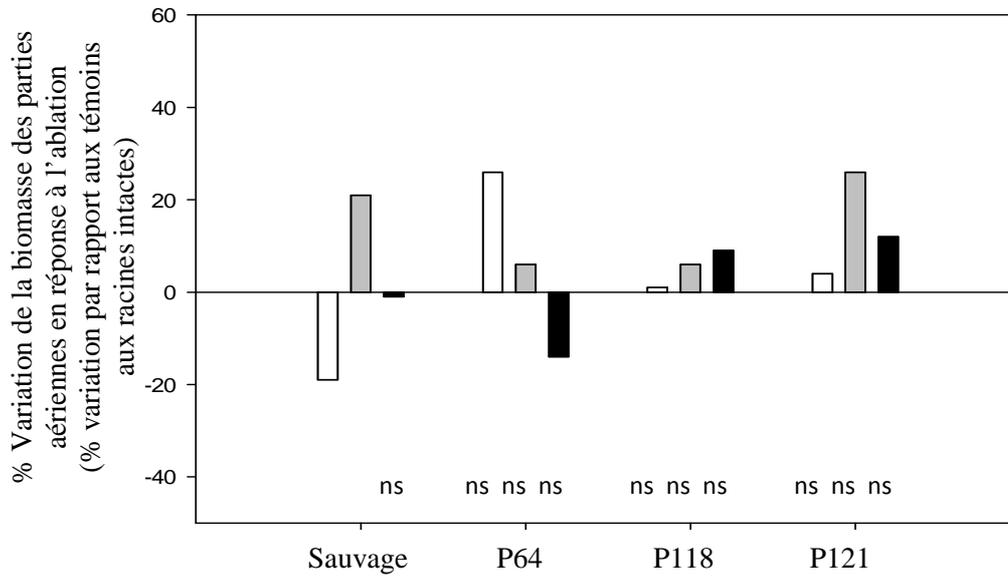


Figure 7.6 Effet de la réponse de la croissance des parties aériennes à l'ablation d'une partie des racines nodulées, sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 géotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La biomasse des parties aériennes a été mesurée en g. plante⁻¹, 8 jours après le début du traitement et exprimée en variation par rapport aux plantes témoins aux nodosités intactes dans l'expérience 150 ppm (barres blanches), dans l'expérience 380 ppm (barres grises) et dans l'expérience 750 ppm (barres noires). ns indique qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'ablation sur la croissance des parties aériennes (test 2 à 2 de Student).

7.4 Impact sur la répartition du C entre les compartiments

La répartition du C entre les compartiments de la plante a été analysée en considérant d'une part l'allocation du C nouvellement assimilé dans la biomasse entre les parties aériennes et racinaires, et d'autre part entre racines et nodosités, en considérant la force de puits pour le carbone des différents compartiments : parties aériennes, racines et nodosités.

7.4.1 Allocation du C entre parties aériennes et parties racinaires

Comme pour la croissance des racines et des nodosités, les variations du ratio d'allocation du carbone entre parties aériennes et parties racinaires (calculé comme le ratio de la quantité de C allouée aux parties racinaires ou aux nodosités divisé par la quantité totale de C accumulée dans la plante entière) doivent s'analyser par rapport au pourcentage d'ablation des parties racinaires.

Ainsi, à 380 ppm, pour tous les génotypes, la diminution de ce ratio suite à l'ablation des parties racinaires, dans une proportion inférieure au pourcentage d'ablation des racines nodulées, a indiqué une augmentation (faible) de l'allocation du C à la biomasse des racines nodulées en réponse à l'ablation (mais légèrement plus importante pour P118) (Tableau 7.3).

A 150 ppm, les variations de ratios, positives ou nulles pour tous les génotypes, indiquent une forte augmentation de l'allocation du C à la biomasse des racines nodulées suite à l'ablation, par comparaison aux plantes aux racines intactes, en cohérence avec la faible diminution de la force de puits aériennes et la très forte augmentation de la force des puits des racines et des nodosités (Tableau 7.3). L'augmentation du ratio d'allocation du carbone aux parties racinaires en réponse à l'ablation a été très élevée pour le sauvage, élevée pour P64 et P118, et moins forte pour P121 (Tableau 7.3).

Il faut rappeler que la diminution de la teneur en CO₂ à 150 ppm avait induit chez les plantes témoins une baisse de l'allocation du C aux parties racinaires pour le sauvage et P64, et une augmentation pour P118 et P121 (cf partie 6.).

A 750 ppm, les variations du ratio d'allocation du carbone aux parties racinaires et aux nodosités ont été négatives pour tous les génotypes. Pour le sauvage et P64, ces variations ont été du même ordre de grandeur que le pourcentage d'ablation des racines nodulées, indiquant une absence de variation de l'allocation du C aux racines nodulées pour ces génotypes en réponse à l'ablation à 750 ppm. Du fait de l'ablation de la moitié des parties racinaires, l'absence de variation de l'allocation du C aux parties racinaires est en cohérence avec la faible variation des forces de puits des différents compartiments. (Tableau 7.3).

Pour les génotypes P118 et P121, la variation a été légèrement inférieure au pourcentage d'ablation, indiquant une légère augmentation de l'allocation du C à la biomasse des racines nodulées pour ce génotype en réponse à l'ablation à 750 ppm, en cohérence avec l'augmentation modérée de la force de puits des racines (mais pas des nodosités) (Tableau 7.3).

Tableau 7.3 Impact de l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes sur la répartition du C nouvellement photosynthétisé dans la biomasse des parties aériennes, des racines et des nodosités des 4 géotypes de pois : le Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121. Mesures effectuées 8 jours après le début du traitement.

Teneur en CO ₂ atmosphérique	Géotype	Répartition du carbone nouvellement photosynthétisé			Force de puits		
		Racines nodulées / Plante entière	Nodosités / Racines nodulées	Nodosités / Plante entière	Partie aérienne	Racine	Nodosité
150 ppm	Sauvage	*+ 61%	-3% (ns)	*+ 59%	-32%	+ 112%	+ 89%
	P64	*+ 24%	-45%	*-27%	-19%	+ 176%	+ 30%
	P118	*+ 29%	-24%	*-2% (ns)	-11%	+ 209%	+ 82%
	P121	*-2% (ns)	-3% (ns)	*-3% (ns)	+ 12%	+ 127%	+ 75%
380 ppm	Sauvage	*-34%	-2% (ns)	*-35%	+ 12%	+ 40%	+ 38%
	P64	*-21%	-25%	*-40%	+ 14%	+ 100%	+ 30%
	P118	*+ 9% (ns)	-9%	*-1% (ns)	-1% (ns)	+ 119%	+ 74%
	P121	*-17%	-7%	*-24%	+ 14%	+153%	+ 80%
750 ppm	Sauvage	*-47%	-3% (ns)	*-47%	+ 6% (ns)	+ 4% (ns)	+ 7% (ns)
	P64	*-56%	-37%	*-73%	-10%	-8% (ns)	-18%
	P118	*-40%	-26%	*-55%	+ 22%	+ 55%	+ 19%
	P121	*-38%	-9%	*-43%	+ 19%	+ 61%	+ 14%

Chaque valeur représente le pourcentage moyen de variation entre les plantes ayant subi l'ablation et les plantes témoins dont les racines nodulées sont restées intactes, calculé sur 8 plantes. Pour chaque teneur atmosphérique en CO₂, l'impact de l'ablation a été testé en utilisant une comparaison 2 à 2 par un test de Student. « ns » représente une différence non significative. Les cases colorées en rouge indiquent un effet positif de l'ablation, la couleur verte un effet négatif et les cases bleues une absence d'effet. Pour les variables « racines nodulées / plantes entière » et « nodosités / plante entière », le signe * signifie qu'il a été tenu compte de la proportion de racines nodulées perdues lors de l'ablation dans l'indication de l'effet de l'ablation par les couleurs : ainsi, un pourcentage de variation supérieur au pourcentage d'ablation des racines nodulées (en moyenne > - 50 %) indique un effet positif de l'ablation (couleur rouge), un pourcentage de variation autour de - 50 % une absence d'effet et un pourcentage de variation < inférieur à - 50 % une effet négatif (couleur verte).

Il faut rappeler que l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm avait induit chez les plantes témoins une absence de variation de l'allocation du C aux parties racinaires pour le sauvage et P64, et une augmentation pour P118 et P121 (cf partie 6.).

7.4.2 Allocation du C entre racines et nodosités au sein des parties racinaires

Pour les géotypes sauvage et P121, l'allocation du C aux nodosités au sein des parties racinaires n'a pas varié en réponse à l'ablation des racines nodulées pour aucune des teneurs en CO₂, comme en témoignent les variations des forces de puits du même ordre de grandeur pour les racines et les nodosités en réponse à l'ablation (bien que supérieures pour P121 par rapport au sauvage) (Tableau 7.3).

Pour P64, l'allocation du C aux nodosités au sein des parties racinaires a toujours été réduite en réponse à l'ablation des racines nodulées, quelle que soit la teneur en CO₂, comme en témoignent l'augmentation de la force de puits des racines, toujours plus élevée que celle des nodosités pour ce géotype (Tableau 7.3).

Pour le géotype P118, l'allocation du C aux nodosités au sein des parties racinaires n'a pas varié suite à l'ablation à 380 ppm, avec des variations d'allocation du C aux racines et aux nodosités en réponse à l'ablation du même ordre de grandeur. Toutefois, à 150 ppm et à 750 ppm, l'allocation du C aux nodosités a diminué de 25 %, en faveur des racines, en cohérence avec une augmentation de la force de puits des racines beaucoup plus forte que celle des nodosités en réponse à l'ablation à ces teneurs en CO₂ (Tableau 7.3).

7.4.3 Synthèse sur la croissance et l'allocation du C entre compartiments

A 380 ppm, par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes, l'ablation de la moitié des racines nodulées a globalement induit pour tous les géotypes une augmentation assez importante du pourcentage d'allocation du C aux racines nodulées, du fait de la forte augmentation de la force de puits des racines et des nodosités en réponse à l'ablation. Cette réponse, plus faible chez le sauvage, n'a pas induit de modification de la croissance des racines nodulées 8 jours après l'ablation, alors qu'elle a induit une augmentation de la croissance des racines et des nodosités, modérée pour P118, forte pour P121, avec pour P64, une augmentation de la croissance des racines, mais pas des nodosités.

A 150 ppm, l'ablation de la moitié des racines nodulées a induit des variations des forces de puits des racines et des nodosités globalement dans le même sens que celles observées à 380 ppm, mais avec une amplitude plus élevée, se traduisant par une augmentation significative de la croissance des racines pour tous les géotypes, mais une augmentation significative de la croissance des nodosités 8 jours après ablation seulement pour le sauvage et P121. Cette augmentation de la force de puits des parties souterraines, à faible niveau de croissance (réduit pour tous les géotypes par la faible teneur en CO₂) a été associée à une diminution de la force de puits des parties aériennes. Cette diminution a été plus importante chez le sauvage, et s'est traduite chez ce géotype par une diminution de

croissance aérienne 8 jours après l'ablation. En effet, du fait d'effets opposés sur la modification de l'équilibre fonctionnel C-N des traitements « diminution de la teneur en CO₂ » et « ablation de la moitié des racines nodulées », on pouvait s'attendre à une atténuation de la réponse adaptative de la croissance à l'ablation des racines nodulées via l'augmentation de l'allocation du carbone à leur biomasse, par comparaison à l'expérience 380 ppm. A l'inverse, dans nos expériences, la réponse de la croissance à l'ablation des racines nodulées observée à 150 ppm a été supérieure à celle observée à 380 ppm.

A 750 ppm, les réponses de la croissance à l'ablation de la moitié des racines nodulées ont été beaucoup plus faibles qu'à 150 ppm et 380 ppm. Pour le génotype sauvage, l'ablation de la moitié des racines nodulées n'a pas induit de modification des forces de puits des différents compartiments et n'a donc pas (ou peu) induit de variations de croissance pour ce génotype.

A l'inverse, pour P64, la force de puits des parties aériennes et des nodosités a été réduite suite à l'ablation des nodosités, ce qui s'est traduit en une diminution de la croissance des nodosités, 8 jours après l'ablation, la diminution de croissance des parties aériennes n'étant pas significative. Pour P64, ces variations ont été associées à une diminution de l'assimilation totale du C dans la biomasse.

Pour les génotypes P118 et P121, l'ablation des racines nodulées a induit une faible augmentation de la force de puits des nodosités, et une augmentation un peu plus élevée de la force de puits des racines, se traduisant en une augmentation de la biomasse des racines et des nodosités pour P121, et seulement en une augmentation de la biomasse des racines pour P118.

A 750 ppm, les effets de l'ablation des racines nodulées et de l'élévation de la teneur en CO₂ déséquilibrant l'équilibre fonctionnel dans le même sens, on pouvait s'attendre à une accentuation de la réponse de la croissance des racines nodulées en réponse à l'ablation, comparée à celle observée à 380 ppm. A l'inverse, nous avons observé dans nos expériences que la réponse adaptative de la croissance des racines nodulées à l'ablation d'une partie des racines nodulées a été plus faible qu'à 380 ppm.

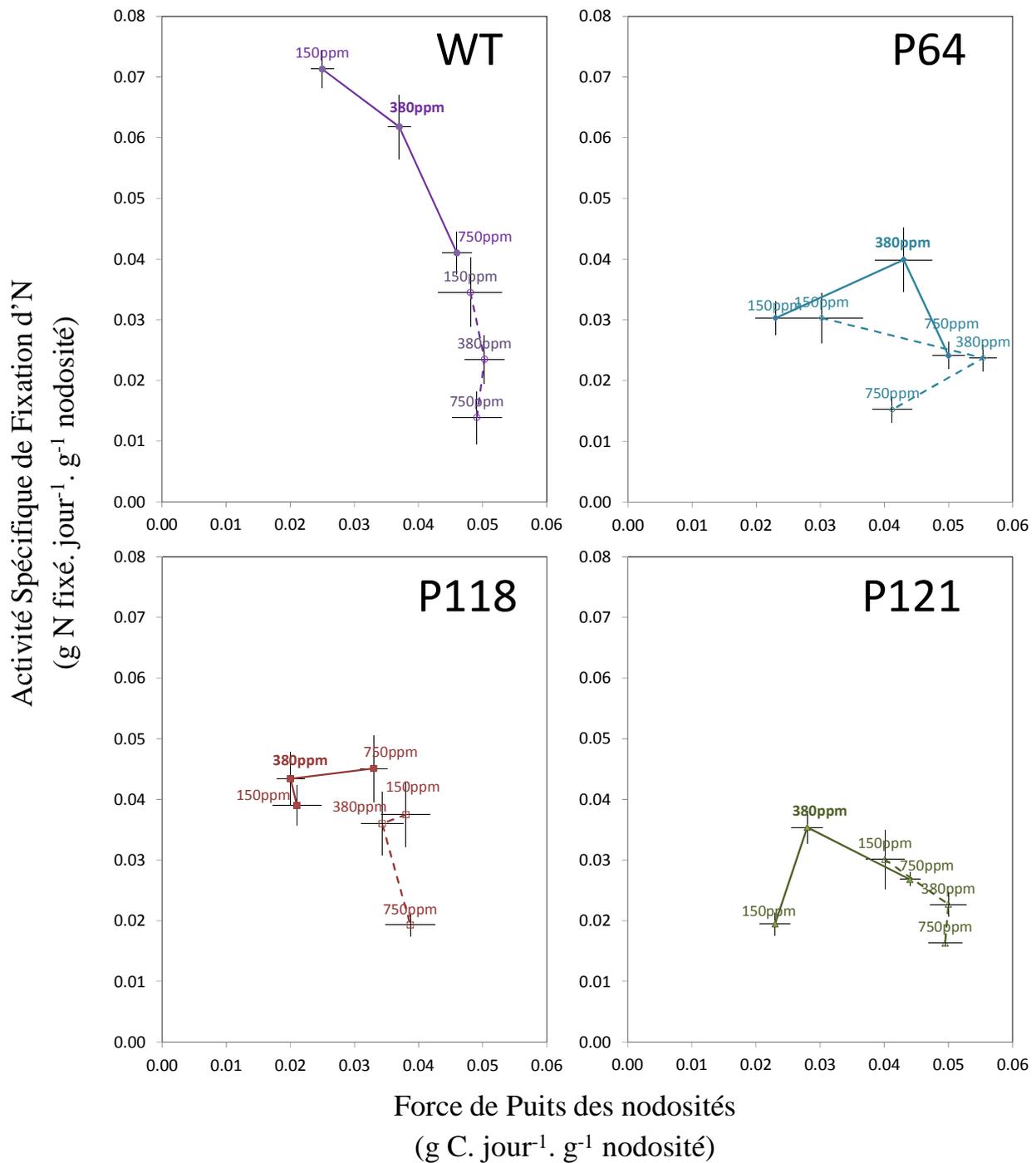


Figure 7.7 **Activité spécifique de fixation en fonction de la force de puits des nodosités suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 génotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L'activité spécifique de fixation (en $\text{g N fixé. jour}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ nodosité}$) en fonction de la force de puits des nodosités (en $\text{g C. jour}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ nodosité}$) a été mesurée 8 jours après le début du traitement chez des plantes dont les racines sont intactes (traits pleins) et des plantes ayant subi l'ablation (traits pointillés) chez le sauvage (ronds violets), P64 (losanges bleus), P118 (carrés rouges) et P121 (triangles verts) dans l'expérience 150 ppm, l'expérience 380 ppm et dans l'expérience 750ppm.

7.5 Synthèse globale sur les réponses de la fixation symbiotique et de la croissance à l'ablation de la moitié des racines nodulées

7.5.1 Impact de la teneur en CO₂ sur la réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées

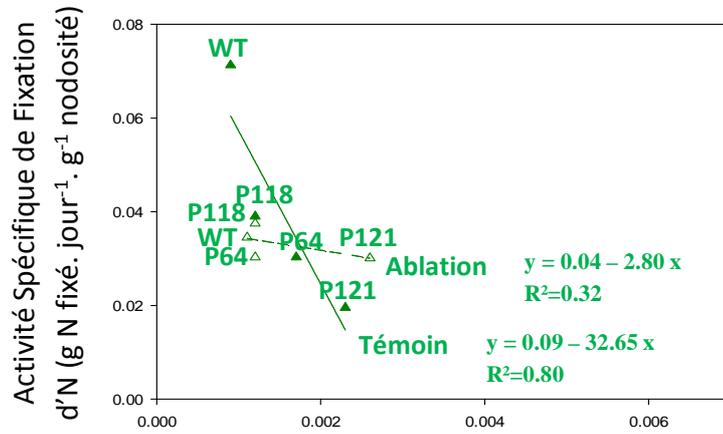
Globalement, sur l'ensemble des 4 géotypes étudiés, on a observé en tendance un impact négatif de l'ablation de la moitié des racines nodulées sur la fixation symbiotique par comparaison aux plantes aux racines intactes (Figure 7.1). Afin de synthétiser la réponse des composantes structurale et fonctionnelle de la fixation symbiotique de ces géotypes à l'ablation des racines nodulées sous différentes teneurs en CO₂, nous avons représenté d'une part l'activité spécifique des nodosités en fonction de leur force de puits pour le carbone (Figure 7.7), et d'autre part l'activité spécifique de fixation symbiotique en fonction de la quantité de C allouée à la biomasse des nodosités (Figure 7.8), pour les différents géotypes et traitements expérimentés.

En moyenne, pour les 4 géotypes, une réponse adaptative à l'ablation des racines nodulées de type « structurale » a été observée, via une augmentation de la force de puits des nodosités. Par comparaison aux plantes témoins (Tableau 7.3), cette réponse a été plus élevée à 150 ppm qu'à 380 ppm, la réponse ayant été la plus faible à 750 ppm (Tableau 7.3, Figure 7.7). Or, l'élévation de la teneur en CO₂, avait également conduit à une élévation de la force de puits des nodosités des plantes témoins. Globalement, quelle que soit la teneur en CO₂, la valeur atteinte suite à l'ablation des nodosités était proche de la valeur atteinte par les plantes témoins à 750 ppm ; ceci explique la moindre réponse de la croissance des nodosités à forte teneur en CO₂, par rapport aux plantes témoins, par comparaison aux autres teneurs en CO₂. Par ailleurs, la valeur maximale atteinte par la force de puits des nodosités était similaire entre géotypes, autour de 0.05 g C. g⁻¹ nodosité. jour⁻¹ (Figure 7.7), suggérant une valeur maximale pour le fond génétique Frisson.

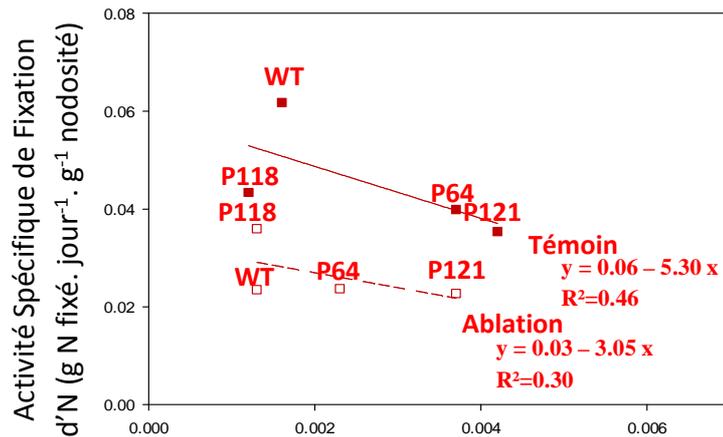
En moyenne sur l'ensemble des géotypes, l'impact négatif de l'ablation sur l'activité spécifique de fixation des nodosités (Figures 7.2) a été le plus faible à 150 ppm et le plus élevé à 750 ppm, avec un impact intermédiaire à 380 ppm. L'impact négatif de l'ablation des racines sur l'activité spécifique de fixation symbiotique avait été interprété dans les parties précédentes comme l'effet d'une limitation de l'activité de fixation symbiotique par une probable limitation du prélèvement d'éléments minéraux et d'eau par le système racinaire réduit de moitié. Cet effet a été d'autant plus important que la teneur en CO₂ était élevée, et donc que la croissance était élevée. En effet, pour les plantes ayant subi l'ablation de la moitié des racines nodulées, l'activité spécifique de fixation symbiotique était en moyenne d'autant plus faible que la teneur en CO₂ de l'atmosphère était forte (Figure 7.8).

Ainsi, globalement, sur l'ensemble des géotypes, une réponse adaptative de type « fonctionnelle » a également été observée suite à l'ablation des racines nodulées, via un éventuel maintien (ou moindre diminution) de l'activité spécifique des nodosités (Figure 7.2), par comparaison aux plantes témoins aux racines intactes. Cette réponse adaptative a été globalement plus « forte » à 150 ppm, qu'à 380 ppm, elle-même plus « forte » qu'à 750 ppm

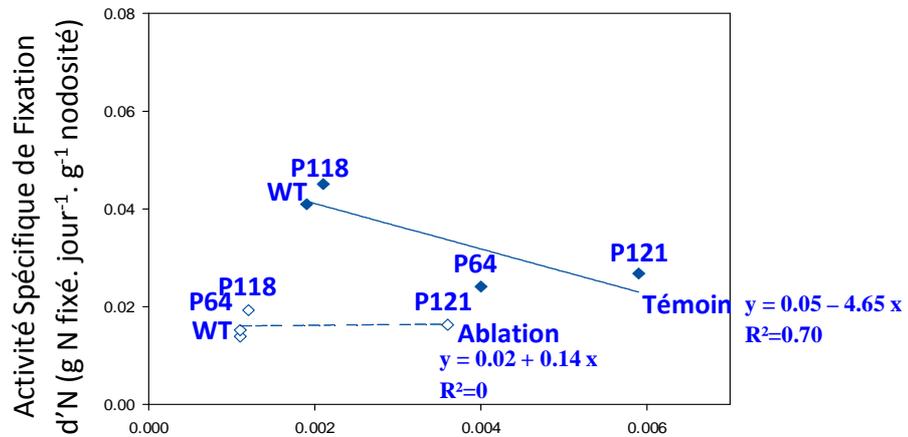
A. 150 ppm



B. 380 ppm



C. 750 ppm



Quantité totale de C assimilé dans la biomasse des nodosités (g C. jour⁻¹. g⁻¹ plante)

Figure 7.8 **Activité spécifique de fixation en fonction de l'assimilation du C dans la biomasse des nodosités suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 différents teneurs en CO₂ pour 4 génotypes de pois : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants P64, P118 et P121.** L'activité spécifique de fixation (en gN fixé. jour⁻¹. g⁻¹ nodosité) en fonction de la quantité totale de C assimilé dans la biomasse des nodosités (en g C. jour⁻¹. g⁻¹ plante) a été mesurée 8 jours après le début du traitement des plantes témoins dont les racines nodulées sont restées intactes (symboles pleins) et ayant subi l'ablation (symboles vides) dans l'expérience 150 ppm (A : triangles verts), l'expérience 380 ppm (B : carrés rouges) et dans l'expérience 750ppm (C : losanges bleus).

(Figure 7.2 et 7.7). Par ailleurs, chez les plantes témoins aux racines intactes (partie 6), pour chaque teneur en CO₂, une corrélation négative avait été observée entre l'activité spécifique de fixation des nodosités et la quantité de C assimilé dans la biomasse des nodosités (Figure 7.8), suggérant une compétition pour les assimilats carbonés (plus forte pour la teneur en CO₂ la plus faible). Suite à l'ablation des nodosités, une corrélation négative entre les 2 variables a été obtenue à 150 ppm et à 380 ppm ; à 150 ppm, la pente a été beaucoup plus faible que celle obtenue pour les plantes témoins aux racines intactes, alors qu'à 380 ppm, la pente a été similaire à celle des plantes témoins ; mais aucune corrélation n'a été obtenue à 750 ppm pour les plantes ayant subi l'ablation (Figure 7.8). Ces résultats suggèrent que pour les plantes ayant subi l'ablation, la compétition pour les assimilats C avec la croissance des racines nodulées n'a pas été un facteur limitant de l'activité spécifique de fixation symbiotique à 750 ppm, mais qu'elle a limité – quoi que faiblement – l'activité fixatrice à 150 ppm et 380 ppm.

Pour les plantes ayant subi l'ablation des racines nodulées, nos résultats indiquent donc que le facteur limitant majeur de l'activité spécifique de fixation symbiotique était la compétition pour le C avec la croissance des nodosités à 150 ppm et le niveau de croissance élevé à 750 ppm, les 2 facteurs entrant en jeu à 380 ppm.

Toutefois, l'implication relative des réponses structurales a différé selon les génotypes. Ainsi, chez le sauvage, la composante structurale a été la composante majoritaire de la réponse adaptative alors que la réponse a été essentiellement fonctionnelle chez P118, et « mixte » chez P121 et P64, avec des variations selon la teneur en CO₂ de l'atmosphère.

7.5.2 Stratégies adaptatives des génotypes à l'ablation de la moitié des racines nodulées

Pour le **génotype sauvage**, à 150 ppm et à 380 ppm, en réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées, la force de puits des racines et des nodosités a augmenté dans les mêmes proportions, mais avec une augmentation 2 fois plus élevée à 150 ppm qu'à 380 ppm.

- A 150 ppm ceci a induit une légère augmentation de la vitesse de croissance des racines et des nodosités, associée à une diminution de la croissance aérienne.
- A 380 ppm, les faibles augmentations des forces de puits des racines nodulées en réponse à l'ablation n'ont pas pu induire de variation de la croissance des racines nodulées 8 jours après ablation.
- A 750 ppm, l'ablation des racines nodulées n'a induit aucune variation de croissance des racines nodulées ou des parties aériennes.

Quelle que soit la teneur en CO₂, l'impact de l'ablation sur la vitesse de fixation symbiotique et sur l'activité spécifique de fixation symbiotique a été similaire avec une forte diminution de la vitesse de fixation symbiotique (-80%) et de l'activité spécifique de fixation (-60%). Ceci a induit une carence azotée, car sur ce court terme de 8 jours après l'ablation des racines, la faible augmentation de la croissance des racines et des nodosités n'a pas été suffisante pour rétablir l'équilibre fonctionnel entre nutrition azotée et carbonée.

Toutefois, l'impact de l'ablation des racines nodulées sur la fixation symbiotique, bien que similaire entre teneurs en CO₂, a été croissant avec la teneur en CO₂. En effet, la diminution de la teneur en CO₂ à 150 ppm avait été associée à un maintien de l'activité spécifique par rapport à 380 ppm (en relation avec une baisse de la quantité totale de C alloué à la biomasse des nodosités, dans un contexte d'assimilats C limitants), alors que l'élévation de la teneur en CO₂ à 750 ppm avait été associée à une baisse de l'activité spécifique (en relation avec l'augmentation de l'allocation totale de C allouée à la biomasse des nodosités, dans un contexte de photosynthèse augmentée) (cf. figure 6.5 de la partie 6.). Ainsi, les effets de la teneur en CO₂ sur l'activité spécifique de fixation symbiotique, bien que de plus faible amplitude, se sont additionnés à l'effet majeur de l'ablation sur l'activité spécifique des nodosités.

Pour le **génotype P64** : à 150 ppm et à 380 ppm, en réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées, la force de puits des nodosités a augmenté, cependant dans une bien moindre proportion que celles des racines, et avec une réponse plus forte à 150 ppm qu'à 380 ppm. Ceci a induit une augmentation de la vitesse de croissance des racines 8 jours après ablation, élevée à 150 ppm, faible à 380 ppm, et nulle à 750 ppm. La faible augmentation de la force de puits des nodosités a été associée à une faible augmentation de la croissance des nodosités à 150 ppm, et par un maintien de la croissance de leurs racines à 380 ppm, comparée aux plantes aux racines intactes. A 750 ppm, l'ablation des racines nodulées n'a pas induit de variation de croissance des racines mais un ralentissement de la croissance des nodosités.

L'impact de l'ablation sur l'activité spécifique de fixation symbiotique a été globalement similaire à 380 ppm et 750 ppm, avec une diminution de l'activité spécifique de fixation de l'ordre de - 40 % alors qu'à 150 ppm, l'activité spécifique de fixation symbiotique a été maintenue. Ainsi, comme pour le génotype sauvage, l'impact négatif de l'ablation sur la fixation symbiotique a été croissant, de 150 ppm à 750 ppm. Contrairement au sauvage pour lequel la réponse adaptative a été seulement structurale, la réponse adaptative du génotype P64 a combiné au niveau des nodosités une réponse structurale (via leur force de puits) et fonctionnelle (via leur activité spécifique de fixation), toutes deux en interaction négative. De 150 ppm à 750 ppm, la réponse adaptative du génotype P64 à l'ablation a été de faiblement réduire à la fois son activité spécifique de fixation et la croissance des nodosités par rapport à celle des racines. Contrairement au sauvage, cette réponse, combinée à des variations de croissance aérienne (baisse de l'acquisition du C dans la biomasse à faible teneur en CO₂, augmentation à 750 ppm, mais diminution dans les mêmes proportions à cette teneur suite à l'ablation), a permis, seulement 8 jours après ablation, d'ajuster nutrition azotée et carbonée, quelle que soit la teneur en CO₂, à un niveau similaire à celui de plantes témoins aux racines intactes, déterminé par la teneur en CO₂ : INN proche de 1 à 150 ppm, légèrement inférieur à 1 à 380 ppm et significativement inférieur à 1 à 750 ppm.

Le génotype P64 a donc présenté une réponse adaptative proche celle du génotype sauvage à l'ablation des racines nodulées, sous différentes teneur en CO₂, avec un impact sur la fixation symbiotique et sur la croissance allant globalement dans le même sens et étant de même amplitude. La différence majeure entre le génotype sauvage et le

génotype P64 réside dans une moindre réponse de la croissance des nodosités par rapport à celle des racines à l'ablation des racines ou aux variations des teneurs en CO₂. Ainsi, pour le génotype P64, contrairement au sauvage, la croissance des racines a toujours été favorisée par rapport à celle des nodosités ; il en résulte une moindre limitation de l'activité spécifique de fixation symbiotique par les dépenses en C pour la croissance des nodosités, et de fait un moindre impact de l'ablation des racines nodulées sur l'activité spécifique de fixation chez P64. Contrairement au sauvage, la réponse fonctionnelle du génotype P64 est aussi caractérisée par l'implication d'une réponse fonctionnelle des nodosités, complémentaire à leur réponse structurale (la corrélation entre ces réponses étant interaction négative).

P118 : En réponse à l'ablation de la moitié des racines nodulées, la force de puits des nodosités a augmenté dans la même proportion que celles des racines à 380 ppm, mais moins que celle des racines à 150 ppm et 750 ppm, décroissant de 150 ppm à 750 ppm. Huit jours après ablation, cette réponse s'est traduite par i) une augmentation modérée de la vitesse de croissance des racines et des nodosités à 380 ppm, ii) une augmentation modérée uniquement de la croissance des racines sans aucune modification de la croissance des nodosités à 150 ppm et 750 ppm.

L'impact de l'ablation sur l'activité spécifique de fixation de P118 a été très faible à 150 ppm et 380 ppm ce qui n'a donc pas plus modifié la vitesse de fixation symbiotique que le niveau d'ablation des racines nodulées. Au contraire, à 750 ppm l'ablation des racines a fortement réduit l'activité spécifique de fixation au même niveau que pour les autres génotypes. Pour ce génotype, cette réponse a induit une diminution de l'activité spécifique de fixation de -60 %, amplifiant ainsi l'impact négatif de l'ablation des racines nodulées, en réduisant de 80 % la vitesse de fixation symbiotique.

Pour P118, la réponse fonctionnelle associée à une réponse structurale faible à modérée n'a toutefois pas permis de maintenir l'équilibre fonctionnel entre nutrition C et N suite à l'ablation, avec une carence azotée mesurée 8 jours après l'ablation. Cette carence a été la plus forte à 750 ppm du fait de la diminution de l'activité spécifique en réponse à l'ablation à 750 ppm, alors qu'elle avait été maintenue aux autres teneurs.

P121 : Quel que soient les teneurs en CO₂, en réponse à l'ablation des racines nodulées, la force de puits des nodosités et des racines ont augmenté de manière similaire, décroissante de 150 ppm à 750 ppm. Cette réponse s'est traduite par une augmentation de la vitesse de croissance des racines et des nodosités en réponse à l'ablation.

L'impact de l'ablation sur l'activité spécifique de P121 a été modéré à 380 ppm et 750 ppm (environ - 40 %), avec une diminution de la vitesse de fixation symbiotique plus faible à 750 ppm (environ -60 %) qu'à 380 ppm (environ -70 %), car associée à une augmentation plus importante de la croissance des nodosités à 750 ppm. Cette réponse a induit une baisse de l'INN à 380 ppm et 750 ppm suite à l'ablation. Toutefois, l'INN des plantes aux racines intactes étant d'une valeur supérieure ou égale à 1, l'INN des plantes ayant subi l'ablation était d'une valeur seulement légèrement inférieure à 1. Ainsi, la nutrition azotée est devenue légèrement insuffisante suite à l'ablation à ces 2 teneurs en CO₂.

La réponse à l'ablation a différé pour ce génotype à 150 ppm. En effet, l'ablation a été associée à une augmentation de l'activité spécifique des nodosités de l'ordre de 40 %, du fait de la moindre dépense en C engendrée par l'ablation de la moitié des nodosités, puits fort pour les assimilats. En effet, pour P121 la proportion de biomasse de nodosité par rapport à la biomasse totale de la plante est la plus élevée de tous les génotypes. Cette moindre dépense en C a permis de lever la limitation de la fixation symbiotique par l'allocation du C aux nodosités, en conditions d'assimilats C limitants. Ainsi, pour le génotype P121, ces réponses structurales et fonctionnelles de la fixation symbiotique à l'ablation des racines nodulées ont été associées au maintien de l'INN à 1 à 150 ppm, au même niveau que les plantes aux racines intactes.

Les génotypes P118 et P121 ont ainsi présenté des réponses adaptatives proches entre elles, avec une augmentation systématique de la force de puits des nodosités en réponse à l'ablation, quelle que soit la teneur en CO₂. Toutefois, cette réponse structurale de la fixation symbiotique à l'ablation a été associée à une réponse fonctionnelle chez P118. Chez P121, la réponse fonctionnelle a été limitée par la forte allocation du C à la biomasse des nodosités, du fait de la forte proportion de nodosités dans la biomasse totale de la plante, associée à leur force de puits très élevée. Cette limitation a toutefois été partiellement levée à 150 ppm, du fait de l'ablation de la moitié des racines nodulées, entrant fortement en compétition avec l'activité de fixation en condition de disponibilité en assimilats limitante.

**CONCLUSION
GENERALE
Et PERSPECTIVES**

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

Les principaux objectifs de cette thèse étaient d'analyser la réponse du pois lorsqu'une partie de son système racinaire subit une ablation. Cette réponse a été étudiée en considérant l'effet de l'ablation d'une part sur la fixation symbiotique d'azote réalisée par le couple plante-rhizobium et d'autre part en évaluant les conséquences sur la croissance de la plante et de ses différents compartiments. Afin de comprendre les relations d'ajustement potentielles entre métabolisme carboné et azoté, nous avons de plus testé, au sein de notre dispositif expérimental, l'impact de variations de la disponibilité en carbone sur la réponse de la plante à l'ablation. Ceci a été réalisé i) en modulant la photosynthèse par exposition transitoire des plantes à différentes teneurs atmosphériques en CO₂ et ii) par variation génétique de la quantité de nodosités, impactant potentiellement sur le métabolisme carboné des plantes, via l'utilisation du géotype de pois Frisson (variété sauvage) et de trois géotypes hypernodulants, mutés dans le fond génétique Frisson. L'utilisation de mutants hypernodulants visait de plus à évaluer si le nombre surnuméraire de nodosités qu'ils développent leur permettait de restaurer leur statut azoté plus efficacement qu'un géotype sauvage, en cas de contraintes résultant de la perte d'une partie du système souterrain.

BILAN DES RESULTATS OBTENUS

➤ Réponse des géotypes à l'ablation d'une partie du système racinaire lors de l'exposition à une teneur atmosphérique en CO₂ ambiante de 380 ppm

Nos résultats ont montré que *l'ablation de la moitié du système racinaire diminuait chez chacun des géotypes étudiés l'activité spécifique de fixation symbiotique par les nodosités*. Une explication possible de ces résultats est que la perte d'une partie des racines nodulées induisait une déficience dans l'acquisition des nutriments et de l'eau, essentiels à la croissance de la plante, résultant ainsi en une diminution de l'activité spécifique de fixation.

La réponse des plantes à une ablation d'une partie de leur système racinaire a différencié selon le géotype.

Chez le géotype sauvage, on a observé un impact important de l'ablation d'une partie des racines nodulées sur la composante fonctionnelle de la fixation symbiotique d'azote. En effet, l'activité spécifique de fixation d'azote a fortement diminué en réponse à l'ablation. Cette réponse, associée à une absence de variation de la vitesse de croissance des nodosités, a résulté en une diminution importante de la vitesse de fixation symbiotique d'azote suite à l'ablation chez le géotype sauvage.

Les mutants hypernodulants ont montré une réactivité à l'ablation d'une partie de leur système racinaire globalement supérieure de celle du sauvage, via une modulation plus forte

des composantes structurales et fonctionnelles de leur système symbiotique de fixation d'azote. Les réponses ont *cependant différencié entre mutants hypernodulants* :

- le mutant P118 a montré la plus forte réactivité à l'ablation car son activité spécifique de fixation d'azote a très peu diminué en réponse à l'ablation. En conséquence, cette réponse, associée à une faible augmentation de la croissance des nodosités, a résulté en une réduction de la vitesse de fixation symbiotique d'azote dans la même proportion que la proportion de racines nodulées retirées lors de l'ablation.

- le génotype P121 a montré une diminution de son activité spécifique de fixation supérieure à celle du P118. Cependant, l'augmentation de la croissance des nodosités a été la plus importante chez ce génotype en réponse à l'ablation ; et en conséquence la vitesse de fixation symbiotique du P121 a été diminuée (comme P118) dans la même proportion que l'ablation réalisée.

- le génotype P64 a montré une réactivité à l'ablation du système fixateur similaire à celle du sauvage. Suite à l'ablation, son activité spécifique de fixation a fortement diminué ; cette réponse, combinée à une absence d'augmentation de la croissance des nodosités à court terme, a entraîné une réduction de la vitesse de fixation symbiotique d'azote en proportion supérieure à celle de la proportion de racines nodulées supprimée par l'ablation. Ainsi, parmi les hypernodulants, le mutant P64 a ainsi montré la plus faible réactivité face à l'ablation d'une partie de son système racinaire.

L'ablation d'une partie des racines nodulées a induit une augmentation de la force de puits pour le C importante des compartiments racinaires et plus faible du compartiment aérien chez tous les génotypes, mais a impacté différemment leur croissance 8 jours après l'ablation.

- on a observé chez le génotype sauvage uniquement une faible accélération de la croissance des parties aériennes mais aucune modification de la croissance des parties racinaires ;

- chez le génotype P64, au sein du système racinaire seule la croissance des racines s'est accélérée suite à l'ablation ;

- chez les mutants hypernodulants P118 et P121 la croissance des racines et des nodosités a été augmentée à court terme (8 jours) après l'ablation.

➤ Réponse des génotypes à une modification de la teneur atmosphérique en CO₂

Pour les plantes témoin aux racines intactes, nous avons fait l'hypothèse que la disponibilité en carbone issue de la photosynthèse pouvait être un facteur limitant de l'activité spécifique de fixation symbiotique des nodosités. *La disponibilité en carbone a été modulée par utilisation de 3 teneurs différentes en CO₂ atmosphérique.* Et nous avons analysé la réponse de la fixation symbiotique et de la croissance des plantes témoins aux racines intactes aux variations de la teneur en CO₂.

Exposition à une teneur en CO₂ atmosphérique de 150 ppm : Elle a réduit en moyenne pour l'ensemble des géotypes la photosynthèse nette de - 49 % par rapport à la teneur en CO₂ atmosphérique ambiante de 380 ppm. En réponse à la diminution de la teneur en CO₂, l'activité spécifique de fixation a diminué modérément chez P64 et fortement chez P121, alors qu'elle a augmenté chez le sauvage, et est restée stable chez P118. L'exposition à une faible teneur en CO₂ atmosphérique a négativement impacté la force de puits des nodosités, entraînant une diminution forte chez le géotype sauvage et le mutant P64 et modérée chez P121. En revanche, chez P118, on n'a observé aucune variation de la force de puits des nodosités après 8 jours de traitements CO₂. Il en résulte ainsi une diminution de la vitesse de fixation symbiotique en réponse à la diminution de la teneur en CO₂ uniquement chez le mutant P121, celle des autres géotypes ayant été maintenue (P118) ou légèrement diminuée (P64 et sauvage)

Conformément à notre hypothèse de départ une disponibilité en carbone réduite a diminué l'activité spécifique de fixation d'azote des nodosités chez certains géotypes.

Exposition à une teneur en CO₂ atmosphérique de 750 ppm : Cette teneur en CO₂ atmosphérique élevée a augmenté la photosynthèse nette en moyenne de + 37 % par rapport à la teneur ambiante de 380 ppm. L'augmentation de l'activité spécifique photosynthétique a été la plus forte pour les géotypes sauvage et P64. Cependant seul le géotype P64 a assimilé plus de C dans la biomasse que lorsqu'il a été exposé à une teneur en CO₂ atmosphérique de 380 ppm. Une teneur atmosphérique en CO₂ élevée a réduit l'activité spécifique de fixation chez tous les géotypes sauf P118, chez qui elle est restée stable. En revanche, la force de puits des nodosités a augmenté chez tous les géotypes, mais de façon 2 à 3 fois plus élevée chez P118 et P121 que chez les géotypes sauvage et P64. En conséquence, une élévation de la teneur atmosphérique en CO₂ à 750 ppm a été associée à un maintien de la vitesse de fixation symbiotique à l'échelle de la plante entière chez les mutants P64 et P118, et à une diminution chez le sauvage et le P121.

Contrairement à ce que nous postulions, pour tous les géotypes, une disponibilité en carbone plus élevée n'a pas augmenté l'activité spécifique de fixation d'azote des nodosités.

➤ **Réponse des géotypes de pois à l'ablation d'une partie des racines nodulées sous 3 teneurs atmosphériques en CO₂ différentes**

Nous avons analysé la réponse des différents géotypes 8 jours après l'ablation d'une partie du système souterrain, sous exposition à trois teneurs atmosphériques en CO₂ différentes. Celles-ci peuvent avoir un effet synergique ou antagoniste de celui de l'ablation d'une partie du système racinaire, sur la fixation symbiotique d'azote et/ou sur la croissance des différents compartiments des géotypes étudiés.

Impact sur l'équilibre C-N et sur la carence azotée

Nous avons fait l'hypothèse qu'une teneur en CO₂ faible pourrait compenser les effets de l'ablation des racines sur la fixation symbiotique, en atténuant à court terme l'intensité de la carence azotée (mesurée par l'Indice de Nutrition Azotée ;INN), induite par l'ablation racinaire. En effet, l'ablation des racines nodulées et l'impact de l'exposition à une faible teneur en CO₂ étant approximativement du même ordre de grandeur mais d'un effet opposé, on pourra assister à une atténuation de l'impact de l'ablation des racines nodulées à 150 ppm, comparé à l'impact mesuré à la teneur en CO₂ de référence (380 ppm).

L'ablation d'une partie des racines nodulées à une teneur atmosphérique en CO₂ ambiante de 380 ppm avait induit une diminution de la vitesse fixation symbiotique d'azote à l'échelle de la plante par diminution de l'activité spécifique de fixation chez tous les génotypes (plus faible chez P118) associée à une accélération de la croissance des nodosités, uniquement chez P118 et P121.

Lors de l'utilisation d'une faible teneur en CO₂, seule la vitesse de fixation symbiotique d'azote à l'échelle de la plante du génotype P121 avait plus faiblement diminué que la proportion de racines nodulées retirée par l'ablation, alors qu'elle était du même ordre de grandeur pour les 3 autres génotypes. En parallèle, l'assimilation du C dans la biomasse a été négativement impactée par l'ablation uniquement chez le génotype sauvage, mais est restée stable chez les trois mutants hypernodulants. En conclusion, seuls les génotypes sauvage et P118 ont montré une diminution de l'INN en réponse à l'ablation, signifiant un état de carence azotée, comme à 380 ppm, alors que l'INN des mutants P64 et P121 n'a pas été modifié suite à l'ablation, la nutrition azotée restant optimale pour ces génotypes. Ainsi, l'exposition à une faible teneur en CO₂ a atténué à court terme l'impact de l'ablation chez les génotypes P64 et P121 alors qu'elle a eu le même effet de carence N qu'à 380 ppm chez les génotypes sauvage et P118.

L'exposition à une teneur en CO₂ élevée pourrait accentuer les effets négatifs de l'ablation des racines sur la nutrition N, en intensifiant à court terme la carence azotée induite par la suppression de la moitié des racines nodulées lors d'une exposition à une teneur élevée en CO₂, on a observé en réponse à l'ablation que la vitesse de fixation symbiotique d'azote à l'échelle de la plante des génotypes sauvage, P64 et P118 a chuté plus fortement que la proportion de racines nodulées retirée par l'ablation. En revanche, suite à l'ablation, chez le mutant P121, la diminution de la vitesse de fixation symbiotique d'azote a été du même ordre de grandeur que la proportion de racines nodulées perdues lors de l'ablation. De plus, on a observé que l'assimilation de C dans la biomasse a été réduite de manière importante chez P64 uniquement suite à l'ablation, alors qu'elle est restée stable chez les trois autres génotypes, par comparaison aux plantes aux racines intactes, à cette teneur en CO₂ élevée. Il en a ainsi résulté une faible diminution de la nutrition azotée chez le génotype sauvage en réponse à l'ablation (faible diminution de l'INN). Chez P64, suite à l'ablation, la réduction à la fois de la vitesse de fixation symbiotique et de l'assimilation de C dans la biomasse a permis un maintien de l'INN comparé aux plantes aux racines intactes, n'augmentant pas

l'état de carence azotée observé chez ces dernières. Chez P118, on a observé une diminution importante de l'INN, impliquant une carence azotée plus importante chez ce génotype à 750 ppm comparée à 150 ppm et 380 ppm. Enfin chez le mutant P121, la diminution de l'INN suite à l'ablation a été moins importante à 750 ppm qu'à 380 ppm, résultant en une nutrition azotée que légèrement insuffisante. Ainsi, l'exposition à une forte teneur en CO₂ a accentué la carence azotée provoquée par l'ablation chez tous les génotypes sauf P64 et avec un effet plus marqué chez le mutant P118.

Impact sur les composantes structurales et fonctionnelles de la fixation symbiotique

A faible teneur en CO₂, le génotype sauvage a répondu à l'ablation via une diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique par les nodosités, associée à une accélération de la croissance des nodosités ; à cette teneur en CO₂, les mutants hypernodulants ont mieux répondu à une ablation de leur système racinaire en maintenant (génotypes P64 et P118) voire en augmentant (génotype P121) leur activité spécifique de fixation symbiotique tandis qu'elle a chuté chez le sauvage. Chez les génotypes hypernodulants, la biomasse des nodosités représente une proportion de la biomasse totale beaucoup plus importante que pour le génotype sauvage. Ainsi pour ces génotypes, la diminution, inhérente à l'ablation, des dépenses en C pour l'entretien et le fonctionnement de la moitié des nodosités, a « levé » la limitation de l'activité spécifique des nodosités, en diminuant la compétition pour le C entre la formation et l'entretien des structures et leur fonctionnement. Ainsi, l'activité spécifique de fixation symbiotique a été maintenue en réponse à l'ablation chez P64 et P118, sans modification de la croissance des nodosités. Chez P121, génotype pour lequel la proportion de biomasse des nodosités par rapport à la biomasse totale de la plante est la plus forte, on a observé à faible teneur en CO₂ une augmentation de l'activité spécifique des nodosités suite à l'ablation, associée à une accélération de la croissance des nodosités,

A forte teneur en CO₂, on a observé une importante chute de l'activité spécifique de fixation du génotype sauvage suite à l'ablation, associée à une absence de variation de la croissance des nodosités. Chez les trois mutants hypernodulants, l'activité spécifique de fixation a chuté plus faiblement que chez le génotype sauvage. Contrairement aux résultats observés à 150 ppm et 380 ppm, le P118 a montré la plus faible réactivité des 3 mutants avec la diminution la plus importante de l'activité spécifique de fixation suite à l'ablation comparée à P64 et P121. Ces modifications de la composante fonctionnelle de la fixation symbiotique étaient associées à un ralentissement de la croissance des nodosités chez P64, un maintien chez P118 et une faible accélération chez le P121. Nos résultats ont montré que l'augmentation de la force de puits des nodosités suite à l'ablation a été la plus faible à 750 ppm par comparaison aux autres teneurs en CO₂ expliquant la moindre réponse de la croissance des nodosités à 750 ppm. La forte diminution de l'activité spécifique de fixation symbiotique à un même niveau faible pour tous les génotypes suggère que pour les plantes ayant subi l'ablation, la compétition pour les assimilats C avec la croissance des racines nodulées n'a pas été un facteur limitant de l'activité spécifique de fixation symbiotique à 750 ppm. Enfin, la force de puits des nodosités des plantes ayant subi l'ablation était proche de

celle des plantes témoins aux racines intactes, ce qui suggérait une valeur maximale ne pouvant être dépassée chez le fond génétique Frisson.

Quelle que soit la teneur en CO₂, la réponse adaptative des 4 génotypes a fait appel à différentes stratégies reposant à la fois sur une réponse structurale (variation de la croissance des nodosités) et sur une réponse fonctionnelle (variation de l'activité spécifique de fixation). Cependant, l'implication des deux types de réponses adaptatives a varié i) entre génotypes et ii) entre teneurs atmosphériques en CO₂. Enfin, on a pu observer une interaction négative entre les 2 types de réponses qui ont pu entrer en compétition l'une par rapport à l'autre. La réponse a été uniquement structurale chez le sauvage avec une accélération ou ralentissement de la croissance des compartiments. Chez les 3 mutants hypernodulants, la réponse à l'ablation était mixte (à la fois structurale et fonctionnelle) voire essentiellement fonctionnelle chez P118 et majoritairement structurale chez P121.

En conclusion, notre étude analysant la réponse adaptative de plantes fixatrices à une perte d'une partie de ses racines nodulées sous différents régimes de teneur atmosphérique en CO₂ est la première de ce genre, montrant la capacité plus importante de certains mutants hypernodulants à compenser l'ablation comparée à un génotype sauvage. Cependant, cette capacité des mutants devrait être plus finement analysée tout au long du cycle de croissance et lors de cultures en champ.

2. Perspectives de recherche

Au cours des travaux de thèse, nous avons émis çà et là la possibilité d'un effet « multi stress » provoqué par l'ablation d'une partie des racines nodulées et résultant en une déficience dans l'acquisition de l'eau ou de certains nutriments. D'autre part, nous avons pu voir la complexité liée à la comparaison de l'effet des traitements CO₂ sur les génotypes en fin d'expérimentation, en prenant en compte entre expériences, d'éventuelles différences des plantes à l'état initial avant l'application des traitements.

Par ailleurs ces travaux de thèse ouvrent la voie à plusieurs perspectives de recherche à court et/ou long terme. Il serait intéressant de réaliser une étude comparative de la réponse adaptative du Frisson sauvage et de ses 3 mutants hypernodulants :

- pour différents types de perturbation de la fixation symbiotique (ablation, remplacement du N₂ par de l'Argon, ..)
- en interaction avec différentes souches bactériennes.
- sur le long terme car au sein de nos travaux la réponse des 4 génotypes n'a été évaluée qu'à court terme.

Ces travaux pourraient être couplés à des études moléculaires des gènes affectés par l'ablation et leur implication dans la réponse adaptative.

2.1. Proposition de résolution des problèmes méthodologiques

2.1.1. Effet multi-stress de l'ablation

Nos travaux de thèse ont montré une diminution de l'activité spécifique de fixation suite à l'ablation d'une partie des racines nodulées à teneur ambiante en CO₂. Yang et al. (2012) ont également montré chez le Jujube chinois que l'ablation des racines nodulées induisait une diminution de la concentration en azote, phosphore et potassium dans les feuilles. Il est donc possible que la diminution du contenu de la plante en ces éléments ainsi que de son contenu hydrique, indispensables à la croissance des plantes, puissent avoir un effet délétère sur la fixation de N₂ (Schulze et al. 2006; Miao et al. 2007; Qiao et al. 2007; Chaudhary et al. 2008; Bargaz et al. 2011).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions réaliser une analyse du statut hydrique des génotypes suite à l'ablation, via la mesure du potentiel hydrique, ou bien de l'expression des Aquaporines (protéines transmembranaires responsables du passage des molécules d'eau au travers des membranes biologiques). Il serait également intéressant de mesurer la concentration en phosphore et en potassium chez les plantes ayant subi l'ablation afin d'évaluer la possible déficience de la plante en ces nutriments.

2.1.2. Caractérisation des plantes ayant subi l'ablation avant application des traitements

L'écueil majeur rencontré dans nos travaux a été d'évaluer les modifications de croissance des différents compartiments des plantes suite à l'ablation des racines nodulées. En effet, avant l'application des traitements, la caractérisation des plantes chez les 4 génotypes avait été réalisée sur un lot de plantes différent de celui ayant subi l'ablation malgré le fait que nous ayons sélectionné des lots les plus homogène entre eux. La nature destructive des

mesures de caractérisation (biomasse sèche des compartiments, nombre de nodosités) ne permettant en effet pas d'utiliser le même lot de plante.

Nous disposons depuis peu sur le Centre INRA de Dijon d'une plateforme de phénotypage. Celle-ci pourrait permettre sur un même lot de plante des mesures non destructives et dynamique par imagerie des plantes pour suivre l'effet des traitements.

2.2. Perspective de recherche à court et long terme

2.2.1. Analyse comparative de la réponse adaptative selon le mode de perturbation de la fixation

Dans la nature, les plantes font face à de nombreux facteurs biotiques ou abiotiques pouvant induire une limitation de la fixation symbiotique. Ainsi, une zone de la rhizosphère (environnement proche des racines) momentanément dépourvue d' N_2 ou riche en azote minéral induirait une inhibition de la fonction de fixation symbiotique alors que les structures responsables de la fixation du N_2 seraient toujours présentes. Lors d'une attaque de pathogène comme les Sitones ou *Aphanomyces*, les dommages causés au système racinaire induisent une perte d'une partie des structures et de la fonction de fixation associée. La nécessité de remplacer des structures partiellement détruites ou de simplement compenser la baisse du statut azoté en optimisant le fonctionnement de la fixation symbiotique (ex via l'activité spécifique de fixation symbiotique) ne nécessite pas la même demande d'énergie. La réponse adaptative qui en découle pourrait alors être différente.

Il serait ainsi intéressant de réaliser une analyse comparative des réponses adaptatives des plantes pour différents modes de perturbation de la fixation symbiotique impliquant seulement une perturbation de leur fonction fixatrice (par remplacement du N_2 disponible dans l'environnement des racines par de l'Argon) ou par perturbation de leurs structures et de leur fonction de prélèvement d' N (cas de l'ablation d'une partie des racines nodulées).

De la même manière que cela a été effectuée au cours de la thèse, une modification de la disponibilité en C par exposition à des teneurs atmosphériques en CO_2 différentes enrichirait l'analyse de ce type d'expérience. Ainsi, il serait possible d'évaluer la capacité des différents génotypes à répondre aux différents types de perturbation, en condition de disponibilité en C fluctuantes.

2.2.2. Analyse comparative de la réponse adaptative à l'ablation lors de l'utilisation de différentes souches bactériennes

Dans nos travaux, nous avons utilisé une seule souche de bactérie pour la symbiose avec le pois. Or, dans la nature, les plantes fixatrices sont en contact avec une multitude de partenaires bactériens pouvant entrer en symbiose avec elles.

Les plantes développent des mécanismes permettant de maintenir ou de promouvoir les interactions avec les partenaires bactériens les plus efficaces en termes de fixation d'azote (Simms et Taylor 2002; Kiers et Denison 2008; Oono et al. 2009). Lors d'une limitation en N_2 , la réponse adaptative de *Medicago truncatula* varie selon la souche bactérienne utilisée (Laguerre et al. 2012). Alors que l'activité spécifique de fixation symbiotique ne varie pas, le développement des nodosités hébergeant les souches bactériennes réputées efficaces est par contre plus important que pour celles contenant la souche de référence.

Ce type d'étude n'a par contre jamais été réalisé chez le pois lorsque la perturbation de la fixation symbiotique réside en une ablation d'une partie des racines nodulées. Il serait donc intéressant de comparer la réponse adaptative de différents génotypes de pois à une ablation en utilisant simultanément des souches bactériennes dont l'efficacité varie, soit en termes d'activité spécifique de la fixation symbiotique, soit en taille des nodosités formées.

2.2.3. Analyse de la réponse adaptative à une perturbation de la fixation symbiotique à long terme

Nos travaux ont été réalisés en étudiant la réponse à court terme (1 semaine) des génotypes à une ablation d'une partie des racines nodulées. Or la réponse de la composante structurale (augmentation de la biomasse des nodosités, formation d'une nouvelle vague de nodosités) nécessite en effet un délai supérieur afin d'être visible, et un délai plus grand encore avant d'entraîner une réponse fonctionnelle des nouvelles structures ainsi créées. Dans nos travaux, nous avons pu observer la réponse de la composante structurale de manière précoce par l'étude des flux de carbone après marquage isotopique.

En réponse à la limitation en N provoquée par l'ablation des racines nodulées, notre hypothèse était que les génotypes hypernodulants possédant déjà des nodosités en quantité surnuméraire réagiraient plus rapidement que le génotype sauvage face à une contrainte affectant leur statut azoté, en modulant la composante fonctionnelle de la fixation symbiotique d'azote (ie. l'activité spécifique de fixation). En effet, alors que la réponse de la composante fonctionnelle lors d'une limitation en N n'avait pas été observée chez le génotype sauvage par Ruffel et al. (2008) et Jeudy et al. 2010, l'activité spécifique de fixation d'un hypernodulant, inférieure à celle d'un génotype sauvage en absence de limitation en N, avait augmenté suite à une limitation en N₂ tout en restant cependant inférieure à celle du génotype sauvage (Jeudy et al, 2010). Il serait intéressant de poursuivre ces expériences en réalisant les observations sur plusieurs semaines, afin de mettre en évidence la mise en œuvre des différentes composantes structurales et fonctionnelles de la réponse adaptative à long terme, et leurs éventuelles compensations, pour rétablir le statut azoté de la plante à son optimum. Comme précédemment, il serait intéressant de faire varier le mode de perturbation de la fixation symbiotique (ablation des racines nodulées, inhibition de la fixation symbiotique).

Dans notre expérience à teneur en CO₂ ambiante de 380 ppm, l'ablation des racines nodulées, bien qu'ayant induite une forte baisse de l'acquisition de N et du statut N des plantes, n'a eu que peu d'impact à court terme sur la photosynthèse et l'assimilation de C dans la biomasse de la plante. Au contraire, l'activité spécifique des feuilles –ou efficacité d'assimilation du C dans la biomasse- a augmenté suite à l'ablation des nodosités. Or à niveau de photosynthèse brute égal, l'efficacité d'assimilation du C dans la biomasse dépend de la quantité de carbone respiré. Ainsi, l'augmentation de l'efficacité de photosynthèse suite à l'ablation de la moitié du système racinaire a été interprétée comme le résultat de la baisse des coûts respiratoires associés à la synthèse, l'entretien et le fonctionnement des nodosités, puits fort pour les assimilats C. Or l'évolution de l'impact de l'ablation sur la croissance globale de la plante est difficile à prévoir à long terme. En effet, sur le long terme, à une teneur ambiante

en CO₂, l'augmentation de la force de puits pour le C des nodosités que l'on avait observée en réponse à l'ablation pourrait d'un côté induire une augmentation de la croissance des nodosités et des importants coûts en C pour la respiration, et donc induire une diminution de l'efficacité de photosynthèse. D'un autre côté, l'accélération de la croissance des nodosités résultera à terme en une plus forte fixation symbiotique d'azote, résultant en une augmentation de la synthèse des protéines foliaires, tendant à augmenter l'efficacité de photosynthèse des feuilles. L'exposition à une teneur atmosphérique en CO₂ élevée ou faible et la modification de la disponibilité en C qui en résulte serait alors un facteur supplémentaire de variation de la réponse adaptative des plantes.

2.2.4. Modélisation de la réponse adaptative à une perturbation de la fixation symbiotique

Notre analyse pourrait être complétée par une démarche de modélisation. En effet, le modèle Pea-Nod, actuellement en cours de développement aux centres INRA de Dijon et d'Avignon (Voisin et Pagès 2010), permet de comprendre et de simuler la formation des nodosités et l'évolution de la nutrition azotée chez le Pois en tenant compte de toutes les sources et puits pour le C et l'N au sein des plantes. Ce modèle pourrait rendre compte de l'effet de l'ablation des racines nodulées sur la nutrition et la croissance des nodosités, et ainsi nous permettre de tester nos hypothèses ainsi que l'évolution à long terme de la réponse adaptative.

2.2.5. Etude moléculaire des gènes et des mécanismes affectés lors de l'ablation

Nos résultats amènent à de nouvelles perspectives d'études des mécanismes et des gènes impliqués dans la régulation de la nodulation de la fixation symbiotique, et affectés ici par l'ablation d'une partie des racines nodulées. De plus, une étude moléculaire de la réponse adaptative des légumineuses à une ablation des racines nodulées permettrait de mettre en évidence la nature des gènes affectés et/ou impliqués dans la réponse adaptative. Cette analyse moléculaire pourrait permettre de mieux mettre en évidence les éventuels stress hydriques ou nutritionnels que nous avons supposés suite à l'ablation.

Enfin, il serait envisageable d'analyser la variabilité génétique associée à ces mécanismes en étudiant la variabilité de la réponse d'une gamme élargie de génotypes, provenant par exemple de la collection de ressources génétiques de Pois disponible à l'INRA de Dijon, par des approches expérimentales et/ou de modélisation. En effet, dans le modèle Pea-Nod, il est possible de représenter la variabilité génétique, chaque génotype étant caractérisé par un jeu de paramètres du modèle.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abdel-Mawly SE, El-Sayed SAM (1999) Relationship between alkalinity and iron deficiency on the growth, nodulation and nitrogen fixation of mungbeans inoculated with different Bradyrhizobium strains. *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 30 (3):81-100
2. Aldahadha AM, Warwick NWM, Backhouse D (2012) Effects of Pythium irregulare and Root Pruning on Water-Use Efficiency of Hydroponically Grown Wheat under PEG-Induced Drought. *Journal of Phytopathology* 160 (7-8):397-403. doi:10.1111/j.1439-0434.2012.01917.x
3. Bacanamwo M, Harper JE (1997) The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiol Plantarum* 100 (2):371-377. doi:10.1034/j.1399-3054.1997.1000220.x
4. Bais HP (2004) Biocontrol of Bacillus subtilis against Infection of Arabidopsis Roots by Pseudomonas syringae Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology* 134 (1):307-319. doi:10.1104/pp.103.028712
5. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
6. Bandyopadhyay AK, Jain V, Nainawatee HS (1996) Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L). *Biology and Fertility of Soils* 21 (3):189-192
7. Bargaz A, Drevon JJ, Oufdou K, Mandri B, Faghire M, Ghoulam C (2011) Nodule phosphorus requirement and O-2 uptake in common bean genotypes under phosphorus deficiency. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 61 (7):602-611. doi:10.1080/09064710.2010.533188
8. Bauer WD (1981) Infection of legumes by Rhizobia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 32:407-449. doi:10.1146/annurev.pp.32.060181.002203
9. Beuve N, Rispaill N, Laine P, Cliquet JB, Ourry A, Le Deunff E (2004) Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a longdistance signal in up-regulation of nitrate uptake in Brassica napus L. *Plant Cell and Environment* 27 (8):1035-1046. doi:10.1111/j.1365-3040.2004.01208.x
10. Bollman MI, Vessey JK (2006) Differential effects of nitrate and ammonium supply on nodule initiation, development, and distribution on roots of pea (*Pisum sativum*). *Canadian Journal of Botany* 84 (6):893-903. doi:10.1139/b06-027
11. Bourion V, Laguerre G, Depret G, Voisin AS, Salon C, Duc G (2007) Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Annals of Botany* 100 (3):589-598
12. Brouwer R (1983) Functionnal equilibrium - sense or nonsense. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 31 (4):335-348
13. CaetanoAnolles G (1997) Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. *Field Crop Res* 53 (1-3):47-68. doi:10.1016/s0378-4290(97)00022-1
14. Caetanoanollés G, Gresshoff PM (1990) Early Induction of Feedback Regulatory Responses Governing Nodulation in Soybean. *Plant Science* 71 (1):69-81
15. Caetanoanollés G, Gresshoff PM (1991) Plant Genetic-Control of Nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45:345-382
16. Cantot P (1986) Estimation of the adult and larval population of *Sitona lineatus* in pea crops and attacks by them. *Agronomie* 6 (5):481-486. doi:10.1051/agro:19860509

17. Cantot P (1989) Effects of the larvae of *Sitona lineatus* L. on some productivity factors in proteaginous pea (*Pisum sativum* L.). *Agronomie* 9 (8):765-770. doi:10.1051/agro:19890803
18. Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM (1985) Isolation and properties of soybean *Glycine max* L. merr mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *P Natl Acad Sci USA* 82 (12):4162-4166. doi:10.1073/pnas.82.12.4162
19. Cen Y-P, Layzell DB (2004) Does oxygen limit nitrogenase activity in soybean exposed to elevated CO₂? *Plant, Cell & Environment* 27:1229-1238
20. Chapin FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *Bioscience* 37 (1):49-57
21. Chaudhary MI, Adu-Gyamfi JJ, Saneoka H, Nguyen NT, Suwa R, Kanai S, El-Shemy HA, Lightfoot DA, Fujita K (2008) The effect of phosphorus deficiency on nutrient uptake, nitrogen fixation and photosynthetic rate in mashbean, mungbean and soybean. *Acta Physiologiae Plantarum* 30 (4):537-544. doi:10.1007/s11738-008-0152-8
22. Corre-Hellou G, Crozat Y (2005) N₂ fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). *European Journal of Agronomy* 22 (4):449-458. doi:10.1016/j.eja.2004.05.005
23. Crozat Y, Dore T (2010) Biotic stresses. In: Munier-Jolain N, Biarnes V, Chaillet I, Lecoœur J, Jeuffroy M-H (eds) *Physiology of the pea crop*. QUAE edn. CRC Press, pp 193-196
24. Crozat Y, Fustec J (2006) Assessing the role of grain legumes in crop rotation: some agronomic concepts that can help! In: AEP (ed) *Grain legumes and the environment: how to assess benefits and impacts*. Proceedings of the AEP workshop. Zürich, Switzerland, pp 55-60
25. Das S, Bhattacharyya P, Adhya TK (2010) Impact of elevated CO₂, flooding, and temperature interaction on heterotrophic nitrogen fixation in tropical rice soils. *Biology and Fertility of Soils* 47 (1):25-30. doi:10.1007/s00374-010-0496-2
26. Davidson EA, de Carvalho CJR, Figueira AM, Ishida FY, Ometto JPHB, Nardoto GB, Saba RT, Hayashi SN, Leal EC, Vieira ICG, Martinelli LA (2007) Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. *Nature* 447 (7147):995-U996. doi:10.1038/nature05900
27. Day DA, Copeland L (1991) Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. *Plant Physiology and Biochemistry* 29 (2):185-201
28. Dazzo FB, Brill WJ (1978) Regulation by fixed nitrogen of host symbiont recognition in *Rhizobium* clover symbiosis. *Plant Physiology* 62 (1):18-21. doi:10.1104/pp.62.1.18
29. Delves AC, Carroll BJ, Gresshoff PM (1988) Genetic analysis and complementation studies on a number of mutant supernodulating soybean lines. *Journal of Genetics* 67 (1):1-8. doi:10.1007/bf02927732
30. Delves AC, Mathews A, Day DA, Carter AS, Carroll BJ, Gresshoff PM (1986) Regulation of the soybean-rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors
Plant Physiology 82 (2):588-590. doi:10.1104/pp.82.2.588
31. Denarie J, Debelle F, Prome JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65:503-535. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002443
32. Dore T, Meynard JM (1995) On-farm analysis of attacks by the pea weevil (*Sitona lineatus* L. Col, *Curculionidae*) and the resulting damage to pea (*Pisum sativum* L.) crops. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* 119 (1):49-54

34. Duc G, Messenger A (1989) Mutagenesis of pea (*Pisum sativum* L.) and the isolation of mutants for nodulation and nitrogen fixation. *Plant Science* 60 (2):207-213. doi:10.1016/0168-9452(89)90168-4
35. Eavis BW (1972) Soil physical conditions affecting seedling root growth. *Plant and Soil* 36 (1-3):613-622. doi:10.1007/BF01373511
36. Evans JR, Seemann JR (1989) The allocation of protein-nitrogen in the photosynthetic apparatus : costs, consequences and control. In: Briggs W (ed) *Toward a broad understanding of photosynthesis*. New York: ARLiss, pp 183-205
37. Faure JD, Vincentz M, Kronenberger J, Caboche M (1991) Co-regulated expression of nitrate and nitrite reductases. *Plant Journal* 1 (1):107-113. doi:10.1111/j.1365-313X.1991.00107.x
38. Ferguson BJ, Foo E, Ross JJ, Reid JB (2011) Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytol* 189 (3):829-842. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03542.x
39. Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM (2010) Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1):61-76. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x
40. Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB (2005) Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology* 138 (4):2396-2405. doi:10.1104/pp.105.062414
41. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 326 (2):99-108. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x
42. Fischinger SA, Hristozkova M, Mainassara ZA, Schulze J (2010) Elevated CO₂ concentration around alfalfa nodules increases N₂ fixation. *J Exp Bot* 61 (1):121-130
43. Francisco PB, Harper JE (1995) Translocatable leaf signal autoregulates soybean nodulation. *Plant Science* 107 (2):167-176. doi:10.1016/0168-9452(95)04107-6
44. Frings JFJ (1976) *The Rhizobium-Pea symbiosis as affected by high temperatures*. Medelingen Landbouwhoges School, Wageningen, Netherland.
45. Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A (2001) Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant Journal* 26 (2):143-155. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01016.x
46. Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Molecular Plant Pathology* 8 (5):539-548. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00413.X
47. Gerard PJ (2002) Nodule damage by clover root weevil larvae in white clover swards. In: *New Zealand Plant Protection, Vol 55, vol 55*. New Zealand Plant Protection-Series. New Zealand Plant Protection Soc, Rotorua, pp 246-251
48. Gladish DK, Rost TL (1993) The effects of temperature on primary root growth dynamics and lateral root distribution in garden pea (*Pisum sativum* L., CV Alaska). *Environmental and Experimental Botany* 33 (2):243-258. doi:10.1016/0098-8472(93)90070-v
49. Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell* 18 (10):2680-2693. doi:10.1105/tpc.106.043778
50. Gregory PJ (2006) *Plant Roots: Growth, Activity and Interactions with the Soil*. Blackwell Publishing,

51. Guérin V, Trinchant J-C, Rigaud J (1990) Nitrogen Fixation (C_2H_2 Reduction) by Broad Bean (*Vicia faba* L.) Nodules and Bacteroids under Water-Restricted Conditions. *Plant Physiology* 92:595-601
52. Guilioni L, Wery J, Lecoq J (2003) High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Functional Plant Biology* 30 (11):1151-1164. doi:10.1071/fp03105
53. Guo HJ, Sun YC, Ren Q, Zhu-Salzman K, Kang L, Wang CZ, Li CY, Ge F (2012) Elevated CO₂ Reduces the Resistance and Tolerance of Tomato Plants to *Helicoverpa armigera* by Suppressing the JA Signaling Pathway. *PLoS ONE* 7 (7). doi:e4142610.1371/journal.pone.0041426
54. Haase S, Neumann G, Kania A, Kuzyakov Y, Römhild V, Kandeler E (2007) Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology and Biochemistry* 39 (9):2208-2221. doi:10.1016/j.soilbio.2007.03.014
55. Hacin JI, Bohlool BB, Singleton PW (1997) Partitioning of C-14-labelled photosynthate to developing nodules and roots of soybean (*Glycine max*). *New Phytol* 137 (2):257-265. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00812.x
56. Halford NG, Curtis TY, Muttucumaru N, Postles J, Mottram DS (2011) Sugars in crop plants. *Annals of Applied Biology* 158 (1):1-25. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00443.x
57. Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, McGee RJ, Le Goff I, L'Anthoene V, Esnault R, Riviere JP, Klein A, Mangin P, McPhee KE, Roux-Duparque M, Porter L, Miteul H, Lesne A, Morin G, Onfroy C, Moussart A, Tivoli B, Delourme R, Pilet-Nayel ML (2011) New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and Applied Genetics* 123 (2):261-281. doi:10.1007/s00122-011-1582-z
58. Harper JE, Corrigan KA, Barbera AC, Abdalla MH (1997) Hypermodulation of soybean, mung bean, and hyacinth bean is controlled by a common shoot signal. *Crop Science* 37 (4):1242-1246
59. Hartwig UA (1998) The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1 (1):92-120. doi:10.1078/1433-8319-00054
60. Hayashi M, Saeki Y, Haga M, Harada K, Kouchi H, Umehara Y (2012) Rj (rj) genes involved in nitrogen-fixing root nodule formation in soybean. *Breeding Science* 61 (5):544-553. doi:10.1270/jsbbs.61.544
61. Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science* 11 (12):610-617. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007>
62. Hinson K (1975) Nodulation responses from nitrogen applied to soybean half root systems. *Agronomy Journal* 67 (6):799-804
63. Hirsch AM (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol* 122 (2):211-237. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb04227.x
64. Horiuchi J-i, Prithiviraj B, Bais HP, Kimball BA, Vivanco JM (2005) Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria. *Planta* 222 (5):848-857. doi:10.1007/s00425-005-0025-y
65. Hu Y, Ribbe MW (2011) Biosynthesis of nitrogenase FeMoco. *Coordination Chemistry Reviews* 255 (9-10):1218-1224. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.018

66. Hungria M, Vargas MAT (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res* 65 (2-3):151-164. doi:10.1016/s0378-4290(99)00084-2
67. Jacobsen E, Feenstra WJ (1984) A new pea mutant with efficient nodulation in the presence of nitrate. *Plant Science Letters* 33 (3):337-344. doi:10.1016/0304-4211(84)90025-7
68. Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H (2003) How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil* 252 (1):177-186. doi:10.1023/a:1024189029226
69. Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, Alves BJR, Morrison MJ (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32 (2):329-364. doi:10.1007/s13593-011-0056-7
70. Jeudy C, Ruffel S, Freixes S, Tillard P, Santoni AL, Morel S, Journet EP, Duc G, Gojon A, Lepetit M, Salon C (2010) Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol* 185 (3):817-828
71. Jupp AP, Newman EI (1987) Morphological and Anatomical Effects of Severe Drought on the Roots of *Lolium-Perenne* L. *New Phytol* 105 (3):393-402. doi:Doi 10.1111/J.1469-8137.1987.Tb00876.X
72. Kage H (1995) Interaction of nitrate uptake and nitrogen fixation in faba beans. *Plant and Soil* 176 (2):189-196. doi:10.1007/bf00011782
73. Kiers ET, Denison RF (2008) Sanctions, Cooperation, and the Stability of Plant-Rhizosphere Mutualisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39 (1):215-236. doi:doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173423
74. Kirschbaum MUF (2011) Does Enhanced Photosynthesis Enhance Growth? Lessons Learned from CO₂ Enrichment Studies. *Plant Physiology* 155 (1):117-124. doi:10.1104/pp.110.166819
75. Klepper B (1990) Origin, branching and distribution of root systems. In: Gregory PJ, Lake JV, Rose DA (eds) *Root development and function*. Cambridge University Press, pp 102-124
76. Kosslak RM, Bohlool BB (1984) Suppression of nodule development of side of a split root system of soybean caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiology* 75 (1):125-130. doi:10.1104/pp.75.1.125
77. Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N, Stougaard J (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420 (6914):422-426. doi:10.1038/nature01207
78. Krusell L, Sato N, Fukuhara I, Koch BEV, Grossmann C, Okamoto S, Oka-Kira E, Otsubo Y, Aubert G, Nakagawa T, Sato S, Tabata S, Duc G, Parniske M, Wang TL, Kawaguchi M, Stougaard J (2011) The *Clavata2* genes of pea and *Lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation. *Plant Journal* 65 (6):861-871. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04474.x
79. Kumar R, Chandra R (2008) Influence of PGPR and PSB on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain competition and symbiotic performance in lentil. *World Journal of Agricultural Sciences* 4 (3):297-301
80. Labrousse F (1933) Notes de pathologie végétale. *Rev de Path Veg et d'Ent Agr de France* 20:71-84
81. Laguerre G, Depret G, Bourion V, Duc G (2007) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytol* 176 (3):680-690

- 82.** Laguerre G, Heulin-Gotty K, Brunel B, Klonowska A, Le Quéré A, Tillard P, Prin Y, Cleyet-Marel J-C, Lepetit M (2012) Local and systemic N signaling are involved in *Medicago truncatula* preference for the most efficient *Sinorhizobium* symbiotic partners. *New Phytol* 195 (2):437-449. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04159.x
- 83.** Lam SK, Hao X, Lin E, Han X, Norton R, Mosier AR, Seneweera S, Chen D (2012) Effect of elevated carbon dioxide on growth and nitrogen fixation of two soybean cultivars in northern China. *Biology and Fertility of Soils* 48 (5):603-606. doi:10.1007/s00374-011-0648-z
- 84.** Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil* 321 (1-2):83-115. doi:10.1007/s11104-009-0042-x
- 85.** Layzell DB, Pate JS, Atkins CA, Canvin DT (1981) Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in a nodulated legume. *Plant Physiology* 67 (1):30-36. doi:10.1104/pp.67.1.30
- 86.** Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wiren N, Daniel-Vedele F, Gojon A (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: Functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15 (9):2218-2232. doi:10.1105/tpc.013516
- 87.** Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant Journal* 18 (5):509-519. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00480.x
- 88.** Lejay L, Wirth J, Pervent M, Cross JM-F, Tillard P, Gojon A (2008) Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology* 146 (4):2036-2053. doi:10.1104/pp.107.114710
- 89.** Lemaire G, Salette J (1984) Relation entre dynamisme de croissance et dynamique de prélèvement d'azote pour un peuplement de graminées fourragères. I. - Etude de l'effet du milieu. *Agronomie* 4 (5):423-430
- 90.** Lira Junior MdA, Lima AST, Arruda JRF, Smith DL (2005) Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biology and Biochemistry* 37 (2):235-239. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.032
- 91.** Liu T-Y, Chang C-Y, Chiou T-J (2009) The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12 (3):312-319. doi:10.1016/j.pbi.2009.04.004
- 92.** Lohaus K, Vidal S (2010) Abundance of *Sitona lineatus* L. (Col., *Curculionidae*) in peas (*Pisum sativum* L.): Effects on yield parameters and nitrogen balance. *Crop Protection* 29 (3):283-289. doi:10.1016/j.cropro.2009.09.009
- 93.** Lorteau MA, Ferguson BJ, Guinel FC (2001) Effects of cytokinin on ethylene production and nodulation in pea (*Pisum sativum*) cv. Sparkle. *Physiol Plantarum* 112 (3):421-428. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1120316.x
- 94.** Lucinski R, Polcyn W, Ratajczak L (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* - legumes. *Acta Biochimica Polonica* 49 (2):537-546
- 95.** Mahieu S, Germon F, Aveline A, Hauggaard-Nielsen H, Ambus P, Jensen ES (2009) The influence of water stress on biomass and N accumulation, N partitioning between above and below ground parts and on N rhizodeposition during reproductive growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 41 (2):380-387. doi:10.1016/j.soilbio.2008.11.021
- 96.** Marino D, Frendo P, Ladrera R, Zabalza A, Puppo A, Arrese-Igor C, Gonzalez EM (2007) Nitrogen Fixation Control under Drought Stress. Localized or Systemic? *Plant Physiology* 143 (4):1968-1974. doi:10.1104/pp.107.097139

97. Mathesius U (2003) Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes - the Rhizobium-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant and Soil* 255 (1):105-119. doi:10.1023/a:1026139026780
98. Mathesius U (2009) Comparative proteomic studies of root-microbe interactions. *Journal of Proteomics* 72 (3):353-366. doi:10.1016/j.jprot.2008.12.006
99. Matsunami T, Otera M, Amemiya S, Kokubun M, Okada M (2009) Effect of CO₂ Concentration, Temperature and N Fertilization on Biomass Production of Soybean Genotypes Differing in N Fixation Capacity. *Plant Prod Sci* 12 (2):156-167
100. Miao SJ, Qiao YF, Han XZ, An M (2007) Nodule formation and development in soybeans (*Glycine max* L.) in response to phosphorus supply in solution culture. *Pedosphere* 17 (1):36-43. doi:10.1016/s1002-0160(07)60005-8
101. Mitchell RL, Russel WJ (1971) Root development and rooting patterns of soybean (*Glycine max* L. Merrill) evaluated under field conditions. *Agron J* 63:313-316
102. Morot-Gaudry JF, Orsel M, Diaz C, Daniel-Vedele F, Masclaux-Daubresse C (2006) Absorption and assimilation of nitrate and recycling of organic nitrogen in plants: importance for oilseed rape (Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: interet pour le colza.). *OCL - Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 13 (6):393-402
103. Mortier V, Holsters M, Goormachtig S (2012) Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment* 35 (2):245-258. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02406.x
104. Moubayidin L, Di Mambro R, Sabatini S (2009) Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* 14 (10):557-562. doi:10.1016/j.tplants.2009.06.010
105. Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411 (6840):948-950. doi:10.1038/35082070
106. Moussart A, Onfroy C, Lesne A, Esquibet M, Grenier E, Tivoli B (2007) Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *European Journal of Plant Pathology* 117 (1):57-69. doi:10.1007/s10658-006-9071-y
107. Munier-Jolain N, Biarnes V, Chaillet I, Lecoer J, Jeuffroy MH (2005) Agrophysiology of protein peas (Agrophysologie du pois proteagineux.). *Agrophysologie du pois proteagineux*:281 pp.-281 pp.
108. Munier-Jolain N, Carrouee B (2003) Considering pea in sustainable agriculture: agricultural and environmental arguments. Quelle place pour le pois dans une agriculture respectueuse de l'environnement? *Argumentaire agri-environnemental. Cahiers Agricultures* 12 (2):111-120
109. Murphy PM (1986) Effect of light and atmospheric carbon dioxide concentration on nitrogen fixation by herbage legumes. *Plant and Soil* 95 (3):399-409. doi:10.1007/bf02374620
110. Murray PJ, Hatch DJ, Cliquet JB (1996) Impact of insect root herbivory on the growth and nitrogen and carbon contents of white clover (*Trifolium repens*) seedlings. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 74 (10):1591-1595
111. Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 7 (7):869-885. doi:10.1105/tpc.7.7.8697/7/869 [pii]
112. Naeem F, Malik KA, Hafeez FY (2008) *Pisum sativum* - *Rhizobium* interactions under different environmental stresses. *Pakistan Journal of Botany* 40 (6):2601-2612

- 113.** Nap JP, Bisseling T (1990) Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis - The legume root nodule. *Science* 250 (4983):948-954. doi:10.1126/science.250.4983.948
- 114.** Naudin C, Corre-Hellou G, Voisin A-S, Oury V, Salon C, Crozat Y, Jeuffroy M-H (2011) Inhibition and recovery of symbiotic N₂ fixation by peas (*Pisum sativum* L.) in response to short-term nitrate exposure. *Plant and Soil* 346 (1-2):275-287. doi:10.1007/s11104-011-0817-8
- 115.** Nemecek T, von Richthofen JS, Dubois G, Casta P, Charles R, Pahl H (2008) Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European Journal of Agronomy* 28 (3):380-393. doi:10.1016/j.eja.2007.11.004
- 116.** Neo HH, Layzell DB (1997) Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiology* 113 (1):259-267
- 117.** Ney B, Dore T, Sagan M (1997) The nitrogen requirement of major agricultural crops : Grain Legumes. In: Lemaire G (ed) *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Springer-Verlag, Heigelberg, pp 107-118
- 118.** Nightingale G (1937) The nitrogen nutrition of green plants. *Bot Rev* 3 (3):85-174. doi:10.1007/BF02870148
- 119.** Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K, Kawaguchi M (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420 (6914):426-429. doi:10.1038/nature01231
- 120.** Novak K (2010) On the efficiency of legume supernodulating mutants. *Annals of Applied Biology* 157 (3):321-342. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00431.x
- 121.** Ohyama T, Fujikake H, Yashima H, Tanabata S, Ishikawa S, Sato T, Nishiwaki T, Ohtake N, Sueyoshi K, Ishii S, Fujimaki S (2011) Effect of Nitrate on Nodulation and Nitrogen Fixation of Soybean. In: El-Shemy H (ed) *Soybean Physiology and Biochemistry*. doi:10.5772/17992.
- 122.** Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006) Long-distance signaling to control root nodule number. *Current Opinion in Plant Biology* 9 (5):496-502
- 123.** Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (2003) Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision. *Plant and Cell Physiology* 44 (3):304-317. doi:10.1093/pcp/pcg036
- 124.** Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass AD (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol* 140 (3):1036-1046. doi:10.1104/pp.105.074385
- 125.** Oono R, Denison RF, Kiers ET (2009) Controlling the reproductive fate of rhizobia: how universal are legume sanctions? *New Phytol* 183 (4):967-979. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02941.x
- 126.** Orea A, Pajuelo P, Romero J, Márquez A (2005) Nitrate assimilation: Influence of nitrogen supply. In: Márquez A (ed) *Lotus japonicus Handbook*. Springer Netherlands, pp 295-313. doi:10.1007/1-4020-3735-X_30
- 127.** Pan B, Smith DL (1998) Genistein and daidzein concentrations and contents in seedling roots of three soybean cultivars grown under three root zone temperatures. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 180 (2):77-82. doi:10.1111/j.1439-037X.1998.tb00374.x
- 128.** Pate JS (1958) Nodulation studies in legumes. I. The synchronisation of host and symbiotic development in the filed pea, *Pisum arvense* L. *Aust J Biol Sci* 11:361-381
- 129.** Penmetsa RV, Cook DR (1997) A Legume Ethylene-Insensitive Mutant Hyperinfected by Its Rhizobial Symbiont. *Science* 275 (5299):527-530. doi:10.1126/science.275.5299.527

- 130.** Pierce M, Bauer WD (1983) A rapid regulatory response governing nodulation in soybean. *Plant Physiology* 73 (2):286-290. doi:10.1104/pp.73.2.286
- 131.** Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ (2002) Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics* 106 (1):28-39. doi:10.1007/s00122-002-0985-2
- 132.** Postma JG, Jacobsen E, Feenstra WJ (1988) Three pea mutants with an altered nodulation studied by genetic-analysis and grafting *Journal of Plant Physiology* 132 (4):424-430
- 133.** Prévost D, Bertrand A, Juge C, Chalifour FP (2009) Elevated CO₂ induces differences in nodulation of soybean depending on bradyrhizobial strain and method of inoculation. *Plant and Soil* 331 (1-2):115-127. doi:10.1007/s11104-009-0238-0
- 134.** Pritchard SG, Rogers HH (2000) Spatial and temporal deployment of crop roots in CO₂-enriched environments. *New Phytol* 147 (1):55-71. doi:Doi 10.1046/J.1469-8137.2000.00678.X
- 135.** Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM (1999) Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Glob Change Biol* 5 (7):807-837. doi:Doi 10.1046/J.1365-2486.1999.00268.X
- 136.** Qiao YF, Tang CX, Han XZ, Miao SF (2007) Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean. *Journal of Plant Nutrition* 30 (7-9):1341-1353. doi:10.1080/01904160701555325
- 137.** Reid DE, Ferguson BJ, Hayashi S, Lin YH, Gresshoff PM (2011) Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annals of Botany* 108 (5):789-795. doi:10.1093/aob/mcr205
- 138.** Rennie RJ, Kemp GA (1981) Dinitrogen fixation in pea beans (*Phaseolus vulgaris*) as affected by growth stage and temperature regime. *Canadian Journal of Botany* 59 (7):1181-1188
- 139.** Rogers A, Ainsworth EA, Leakey ADB (2009) Will Elevated Carbon Dioxide Concentration Amplify the Benefits of Nitrogen Fixation in Legumes? *Plant Physiology* 151 (3):1009-1016. doi:10.1104/pp.109.144113
- 140.** Ruffel S, Freixes S, Balzergue S, Tillard P, Jeudy C, Martin-Magniette ML, van der Merwe MJ, Kakar K, Gouzy J, Fernie AR, Udvardi M, Salon C, Gojon A, Lepetit M (2008) Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 146 (4):2020-2035
- 141.** Sagan M, Duc G (1996) Sym28 and Sym29, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L). *Symbiosis* 20 (3):229-245
- 142.** Sagan M, Ney B, Duc G (1993) Plant symbiotic mutants as a tool to analyze nitrogen nutrition and yield relationship in field-grown peas (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 153 (1):33-45. doi:10.1007/bf00010542
- 143.** Salette J, Lemaire G (1981) The variation of nitrogen content during the growth of grasses - A dilution equation. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 292 (14):875-878
- 144.** Salon C, Munier-Jolain NG, Duc G, Voisin AS, Grandgirard D, Larmure A, Emery RJN, Ney B (2001) Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* 21 (6-7):539-552
- 145.** Santalla M, Amurrio JM, de Ron AM (2001) Symbiotic interactions between *Rhizobium leguminosarum* strains and elite cultivars of *Pisum sativum* L. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau* 187 (1):59-68. doi:10.1046/j.1439-037X.2001.00502.x

- 146.** Schenk HJ, Jackson RB (2002) Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. *J Ecol* 90 (3):480-494. doi:10.1046/J.1365-2745.2002.00682.X
- 147.** Schnabel EL, Kassaw TK, Smith LS, Marsh JF, Oldroyd GE, Long SR, Frugoli JA (2011) The ROOT DETERMINED NODULATION1 Gene Regulates Nodule Number in Roots of *Medicago truncatula* and Defines a Highly Conserved, Uncharacterized Plant Gene Family. *Plant Physiology* 157 (1):328-340. doi:10.1104/pp.111.178756
- 148.** Schuller KA, Minchin FR, Gresshoff PM (1988) Nitrogenase activity and oxygen diffusion in nodules of *Soybean* cv. Bragg and a supernodulating mutant - Effects of nitrate. *J Exp Bot* 39 (204):865-877. doi:10.1093/jxb/39.7.865
- 149.** Schulze J, Temple G, Temple SJ, Beschow H, Vance CP (2006) Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 98 (4):731-740. doi:10.1093/aob/mcl154
- 150.** Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ, Gresshoff PM (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299 (5603):109-112. doi:10.1126/science.1077937
- 151.** Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR (2009) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry* 78 (1):701-722. doi:10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812
- 152.** Shah VK, Brill WJ (1977) Isolation of an iron molybdenum cofactor from nitrogenase. *P Natl Acad Sci USA* 74 (8):3249-3253. doi:10.1073/pnas.74.8.3249
- 153.** Simms EL, Taylor DL (2002) Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* 42 (2):369-380. doi:10.1093/icb/42.2.369
- 154.** Stearns JC, Glick BR (2003) Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21 (3):193-210. doi:10.1016/s0734-9750(03)00024-7
- 155.** Stepniewski W, Glinski J, Ball BC (1994) Effects of compaction on soil aeration properties. *Soil compaction in crop production*:167-189
- 156.** Stitt M (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (3):178-186. doi:10.1016/s1369-5266(99)80033-8
- 157.** Stougaard J (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology* 124 (2):531-540. doi:10.1104/pp.124.2.531
- 158.** Streeter J (1988) Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Crc Critical Reviews in Plant Sciences* 7 (1):1-23. doi:10.1080/07352688809382257
- 159.** Streeter JG (1985a) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. 1. Long term studies with continuous supply of nitrate. *Plant Physiology* 77 (2):321-324. doi:10.1104/pp.77.2.321
- 160.** Streeter JG (1985b) Nitrate inhibition of legume nodule growth and activity. 1. Short term studies with high supply of nitrate. *Plant Physiology* 77 (2):325-328. doi:10.1104/pp.77.2.325
- 161.** Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Bright L, Oldroyd G, Harris JM (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *The Plant Journal* 46 (6):961-970. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02751.x
- 162.** Syono K, Newcomb W, Torrey JG (1976) Cytokinin production in relation to development of pea root nodules. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 54 (18):2155-&
- 163.** Thornley JHM (1972) A Balanced Quantitative Model for Root: Shoot Ratios in Vegetative Plants. *Annals of Botany* 36:431-441

- 164.** Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418 (6898):671-677. doi:10.1038/nature01014
- 165.** Townleysmith L, Wright AT (1994) Field pea cultivar and weed response to crop seed rate in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 74 (2):387-393
- 166.** Tricot F (1993) Mise en place des nodosités du pois protéagineux de printemps (*Pisum sativum* L.). Influence de la nutrition carbonée., Université Paris-Sud,
- 167.** Tricot F, Crozat Y, Pellerin S (1997) Root system growth and nodule establishment on pea (*Pisum sativum* L.). *J Exp Bot* 48 (316):1935-1941. doi:10.1093/jexbot/48.316.1935
- 168.** Ubeda-Tomás S, Beemster GTS, Bennett MJ (2012) Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science* 17 (6):326-331. doi:10.1016/j.tplants.2012.02.002
- 169.** Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature Cell Biology* 10 (5):625-628. doi:10.1038/ncb1726
- 170.** Vance CP, Heichel GH (1991) Carbon in N₂ fixation - Limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:373-392. doi:10.1146/annurev.arplant.42.1.373
- 171.** Vance CP, Reibach PH, Ellis WR (1986) Proteolytic enzymes of legume nodules and their possible role during nodule senescence. In: Dalling MJ (ed) *Plant proteolytic enzymes*. CRC Press, Boca Raton, pp 103-124
- 172.** Verma D (1989) Plant Genes Involved in Carbon and Nitrogen Assimilation in Root Nodules. In: Poulton J, Romeo J, Conn E (eds) *Plant Nitrogen Metabolism*, vol 23. *Recent Advances in Phytochemistry*. Springer US, pp 43-63. doi:10.1007/978-1-4613-0835-5_2
- 173.** Vocanson A, Roger-Estrade J, Boizard H, Jeuffroy M-H (2006) Effects of Soil Structure on Pea (*Pisum sativum* L.) Root Development According to Sowing Date and Cultivar. *Plant and Soil* 281 (1-2):121-135. doi:10.1007/s11104-005-3938-0
- 174.** Voisin A-S, Cazenave A-B, Duc G, Salon C (2013) Pea nodule gradients explain C nutrition and depressed growth phenotype of hypernodulating mutants. *Agronomy For Sustainable Development* 33 (4):829-838. doi:10.1007/s13593-013-0146-9
- 175.** Voisin A-S, Munier-Jolain NG, Salon C (2010) The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant and Soil* 337 (1-2):399-412. doi:10.1007/s11104-010-0536-6
- 176.** Voisin A-S, Pagès L (2010) "PEA NOD" : modelling the symbiotic association of a legume plant and an N₂ fixing bacteria using developmental and assimilate partitioning rules. Paper presented at the 6th international workshop on Functional Structural Plant Models, Davies, USA, 12-17 september 2010
- 177.** Voisin A-S, Salon C (2005) Efficience de la nutrition azotée. In: *Agrophysiologie du pois protéagineux*. vol Mieux Comprendre, INRA edn. Nathalie Munier-Jolain (Coordinateur);Véronique Barnières (Coordinateur);Isabelle Chaillet (Coordinateur);Jérémy Lecœur (Coordinateur);Marie-Hélène Jeuffroy (Coordinateur), Paris, pp 94-101
- 178.** Voisin AS, Bourion V, Duc G, Salon C (2007) Using an ecophysiological analysis to dissect genetic variability and to propose an ideotype for nitrogen nutrition in pea. *Annals of Botany* 100 (7):1525-1536

- 179.** Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR (2003a) Seasonal patterns of C-13 partitioning between shoots and nodulated roots of N₂- or nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Annals of Botany* 91 (5):539-546
- 180.** Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR (2003b) Root and nodule growth in *Pisum sativum* L. in relation to photosynthesis: Analysis using C-13-labelling. *Annals of Botany* 92 (4):557-563
- 181.** Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR (2003c) Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *J Exp Bot* 54 (393):2733-2744
- 182.** Voisin AS, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B (2002a) Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 243 (1):31-42
- 183.** Voisin AS, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B (2002b) Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 242 (2):251-262
- 184.** Wall DA, Friesen GH, Bhati TK (1991) Wild mustard interference in traditional and semi leafless field peas. *Canadian Journal of Plant Science* 71 (2):473-480
- 185.** Walsh KB, Vessey JK, Layzell DB (1987) Carbohydrate supply and N₂ fixation in Soybean - The effect of varied daylength and stem girdling. *Plant Physiology* 85 (1):137-144. doi:10.1104/pp.85.1.137
- 186.** Warembourg FR (1983) Estimating the true cost of dinitrogen fixation by nodulated plants in undisturbed conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 29 (8):930-937
- 187.** Waterer JG, Vessey JK (1993) Effect of low static nitrate concentrations on mineral nitrogen uptake, nodulation, and nitrogen fixation in field pea. *Journal of Plant Nutrition* 16 (9):1775-1789. doi:10.1080/01904169309364649
- 188.** Weir TL, Park S-W, Vivanco JM (2004) Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7 (4):472-479. doi:10.1016/j.pbi.2004.05.007
- 189.** Wezel A, Bellon S, Dore T, Francis C, Vallod D, David C (2009) Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29 (4):503-515. doi:10.1051/agro/2009004
- 190.** Wilson JB (1988) A review of evidence on the control of shoot-root ratio, in relation to models. *Annals of Botany* 61 (4):433-449
- 191.** Wopereis J, Pajuelo E, Dazzo FB, Jiang QY, Gresshoff PM, de Bruijn FJ, Stougaard J, Szczyglowski K (2000) Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant Journal* 23 (1):97-114. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00799.x
- 192.** Yan D (2007) Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (22):9475-9480. doi:10.1073/pnas.0703360104
- 193.** Yang SJ, Du ZY, Yu Y, Che YY, Yuan CH, Xing SJ (2012) Effect of root pruning on competitive ability in Chinese jujube tree. *Fruits* 67 (6):429-437. doi:10.1051/fruits/2012038
- 194.** Zafar M, Abbasi MK, Khan MA, Khaliq A, Sultan T, Aslam M (2012) Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. *Pedosphere* 22 (6):848-859. doi:10.1016/s1002-0160(12)60071-x

195. Zanetti S, Hartwig UA, Nösberger J (1998) Elevated atmospheric CO₂ does not affect *per se* the preference for symbiotic nitrogen as opposed to mineral nitrogen of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* 21:623-630

196. Zhuo DG, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 17 (5):563-568. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00396.x

ANNEXES

Annexe 1 : Publications relatives aux travaux de thèse

Publication

Soumis et accepté à Plant and Soil

Cazenave A. B., Salon C., Jeudy C., Duc G. et Voisin A. S. 2014. N₂ fixation of pea hypernodulating mutants is more tolerant to root pruning than that of wild type

Présentations orales

Cazenave A. B., Jeudy C., Voisin A. S. et Salon C. 2012. Réponse adaptative du Pois à une perturbation de la capacité à prélever l'azote par la fixation symbiotique. 18ème Forum des Jeunes Chercheurs. Besançon, France

Posters

Cazenave A. B., Salon C., Jeudy C., Duc G. et Voisin A. S. 2013. Pea hypernodulating mutants display a greater adaptive response of N₂ fixation to root pruning than wild type. 7th Conference d'EPSO, Plants for a greening economy, Porto Heli, Grèce

Cazenave A. B., Jeudy C., Voisin A. S. et Salon C. 2011. Study of the adaptive response of N₂ fixation to local N deprivation in peas using environmental and genetic variations. 17ème Forum des Jeunes Chercheurs. Dijon, France

Annexe 2 : Formations, encadrement et séminaires suivis au cours de la thèse

➤ **Formations suivies au cours de la thèse :**

✓ Formations obligatoires (Total : 36h):

- Panorama de la recherche en France, M. Dubois (6h)
- Technique de recherche d'emplois, M. Dutartre (6h)
- La logique de la Thèse, M. Dubois (6h)
- Conduite de Projet R &D, M. Dutartre (12h)
- Technique de recherche d'emplois, préparer son insertion professionnelle, M. Dutartre (6h)

✓ Formations optionnelles (Total : 147h):

- Analyse de Données, M. Baire (12h)
- Anglais: Presentation skills, M. Winn (14h)
- Anglais: Grammar skills, M. Winn (14h)
- Anglais: Writting skills, M. Winn (14h)
- MISTER (logiciel bibliographique Endnote) axes 1 et 2 (14h)
- Préparer son projet professionnel en amont de la recherche d'emplois, Mme Rollet (21h)
- Rédaction d'un article scientifique, M. Signeuric (6h)
- Publish and Perish, M. Signeuric (6h)
- Statistiques : modèle linéaire, M Dessaint, M. Wavresky (28h)
- Préparation au métier d'enseignant à l'université, Mme Dumougeot-Lebel (18h)

- Participation à la préparation d'un congrès de Jeunes Chercheurs (FJC Dijon Juin 2013)

➤ **Encadrement**

- Encadrement d'un stagiaire de deuxième année Génie Biologique, option Agronomie de Mars à Juin 2012

➤ **Séminaires, workshops et conférences suivis au cours de la thèse**

- Evaluation du potentiel de rendement des variétés de pois dans la région Bourgogne – Rémi Beauvieux (31/01/10)
- Etude de l'interaction « plante-Communauté microbienne de la rhizosphère » chez l'espèce modèle *Medicago truncatula* par des approches d'Ecophysiologie, d'Ecologie microbienne et de Génétiques quantitatives – Anouk Zancarini (15/03/11)
- Présentation de l'UMR LEG lors de l'Evaluation du Comité AERES (07/03/11)
- Développement d'outils génomiques chez la féverole : application des avancées technologiques en matière de séquençage – Grégoire Aubert (08/04/11)
- Influence of high temperature on nitrogen fluxes during seed filling in Pea – Annabelle Larmure (14/03/11)
- Développement et utilisation du modèle de culture du pois AFISOL – Annabelle Larmure (15/04/11)
- Diagnostic des facteurs limitant du rendement chez le pois – Christophe Lecomte (24/05/11)
- Recherche d'association polymorphisme de séquence caractère quantitatif et ecotilling – Christine Lesignor (17/06/11)
- Analyse écophysiologique de l'acquisition de l'azote chez les légumineuses – Anne-Sophie Voisin (28/06/11)
- Mise au point d'un indicateur de nutrition azotée chez le pois en situation de plante isolée – Justine Sourisseau (28/06/11)
- Stress hydrique chez les Légumineuses – Marion Prudent (08/09/11)
- Application de molécules signales pour une meilleure tolérance du Soja au stress hydrique en phase végétative – Marion Prudent (09/09/11)
- Workshop « Légumineuse » : du gène à la filière. Pour un renouvellement des questions de recherches sur les légumineuses – plusieurs intervenants (du 27 au 28/09/11)
- Ecological function and biodiversity indicators in European soils – Philippe Lemanceau (24/10/11)
- Etude des interactions géotypes x environnement dans les réseaux d'essais variétaux – Christophe Lecomte (08/11/11)
- Designing and delivering sustainable agricultural systems: a Rothamsted perspective – Maurice Moloney (14/11/11)
- Séminaire Eco & Sol. Sols, activités et réseau biologique. Nutriment et intensification écologique. Carbone et changement globaux – Philippe Hinsinger, Jean-Luc Chotte et Jean-Michel Harmand (14/11/11)
- Atelier « Conception d'idéotypes valorisant les interactions biologique » Légumineuses, services écosystémiques et ingénierie agroécologique - plusieurs intervenants (15/11/11)
- The *Medicago truncatula* root architecture mutant TR18T is impacted in nitrogen acquisition – Virginie Bourion (18/11/11)
- La mycorhize à arbuscule, un acteur clé des services écosystémiques – Daniel Wipf (30/01/12)
- Présentation des activités du pôle GEAPSI – plusieurs intervenants (06/02/12)

- Journée des doctorants – plusieurs intervenants (12/03/12)
- Un apport exogène de LCO en condition de stress hydrique favorise la nodulation, mais ne permet pas une meilleure tolérance à court terme – Marion Prudent (23/02/12)
- Etude des mécanismes moléculaires contrôlant le rendement et la qualité des graines de légumineuses – Vanessa Vernoud (16/03/12)
- Séminaire stress abiotiques (nutritionnel, hydrique, thermique, froid, multistress) – Plusieurs intervenants (23/03/12)
- Réseau de ferme de référence et de démonstration de l'Yonne – Alice Demolder (02/04/12)
- Mesure des apports isotopiques de l'Azote, du Carbone et du Soufre par spectrométrie de masse – Anne-Lise Santoni (12/04/12)
- Epissage alternatif. Intérêt et application chez le Pois – Grégoire Aubert (25/05/12)
- Potentiel d'une filière protéagineuse pour une agriculture durable en Bourgogne – Gérard Duc (14/06/12)
- Processus de remobilisation et accumulation de réserves dans les graines de Légumineuses – Plusieurs intervenants (22/06/12)
- Effet de l'application temporaire de nitrate sur la fixation symbiotique chez le pois protéagineux – Antoine Miossec (25/06/12)
- Etude de l'interaction plantes-communautés microbiennes de la rhizosphère chez l'espèce modèle *Medicago truncatula* par une approche multidisciplinaire : contribution à la réflexion sur le pilotage des interactions par la plante – Soutenance de Thèse Anouk Zancarini (25/06/12)
- Présentation de la plateforme de phénotypage de l'INRA de Dijon (PPHD) – Christophe Salon et Christian Jeudy (28/09/12)
- Développement variété résistante à des herbicides. Discussion à partir de l'exemple du millet – Henry Darmency (12/10/12)
- Chemin d'une graine au centre de ressource génétique pois de Dijon – Marianne Martinello (19/10/12)
- Interprétation des dégâts de gel de Février 2012 sur les pois d'hivers – Christophe Lecomte (27/10/12)
- Workshop Légumineuse. Atelier de réflexion sur les attentes des industriels et des consommateurs sur la qualité des matières premières, la transformation, la valeur nutrition / santé et les marchés / perception. Plusieurs intervenants (du 15 au 16/11/12)
- Génétiques d'association pour les caractéristiques de graines chez *Medicago* : exploitation des données HapMap – Christine Lesignor (20/11/12)
- Variabilité génétique pour la morphologie racinaire du système racinaire chez le pois – Virginie Bourion (30/11/12)
- Dissecting the factors controlling seed development in the model legume *Medicago truncatula* – Soutenance de Thèse Rana Muhammad Atif (17/12/12)
- Processus écologiques et évolutifs influençant la colonisation de l'Ambroisie en France – Soutenance de Thèse Benjamin Gard (20/12/12)
- Cartographie fine de QTL de rendement – Anthony Klein (21/12/12)
- Rôle des rhizobactéries productrices de polysaccharides dans la structuration de la rhizosphère – Thierry Heulin (14/01/13)
- Isoforme PEPC essentielle pour le développement des plantes de pois en conditions fixatrices d'azote – Arnaud Boissard (25/01/13)
- Metaphenomics. Converting data into knowledges – Hendrick Poorter (28/01/13)
- Labex TULIP : a dialog between Biology and Ecology about biotic interactions – Dominique Roby (04/03/13)
- Journée des Doctorants – Plusieurs intervenants (18/03/13)

- Etude fonctionnelle du transporteur de sulfate SULTR3 ; 5 dans la nutrition soufrée de *Medicago truncatula* – Germain Poignavent (22/03/13)
- Exploring the genome diversity of mycorrhizal fungi to understand the evolution and functioning of symbiosis – Francis Martin (08/04/13)
- Interaction entre bactéries phytobénéfiques et agroécologie – Yvan Moenne-Laccox (10/06/13)
- Procédés Alimentaires et microbiologie – Samuel Hubers (21/06/13)
- Genetic control of flowering and photoperiod response in temperate legume – Jim Weller et Nathalie Hecht (05/07/13)
- Use of wild crops relatives of the Pisum genus to broaden genetic diversity – Petr Smykal (27/08/13)
- Projet LEGATO (Legume for the Agriculture of Tomorrow) – Richard Thompson (13/09/13)
- Identification of *Medicago truncatula* genes required for rhizobia invasion and bacteroid differentiation – Peter Kalo (16/12/13)

➤ **Congrès**

- 17^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs – 16 et 17 juin 2011 – Dijon, France
- 18^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs – 6 et 7 septembre 2012 – Besançon
- 19^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs – 13 et 14 juin 2013 – Dijon
- 7th EPSO Conference : Plants for greening economy – 1 au 4 septembre 2013 – Porto Heli, Grèce

Annexe 3 : Composition de la solution nutritive utilisée dans les expériences

Composé	0 mol N. L ⁻¹	0.625 x 10 ⁻³ mol N. L ⁻¹	14 x 10 ⁻³ mol N. L ⁻¹
KNO ₃	0	0.16	5.35
K ₂ HPO ₄	0.80	0.80	0.20
Ca(NO ₃) ₂ + 4H ₂ O	0	0.24	4.00
MgSO ₄ + 7H ₂ O	1.00	1.00	0.75
CaCl ₂	2.50	2.27	0
K ₂ SO ₄	0.70	0.62	0
NaCl	0.20	0.20	0.2
KH ₂ PO ₄	0	0	0.9
Mg(NO ₃) ₂ + 6H ₂ O	0	0	0.325
Cobalt		traces	
H ₃ BO ₃		0.03235	
MnSO ₄ +7H ₂ O		0.01065	
ZnSO ₄ +7H ₂ O		0.00077	
H ₂₄ Mo ₇ N ₆ O ₂₄ + 4H ₂ O		0.00015	
CuSO ₄ + 5H ₂ O		0.00032	
Versénate de Fer *		0.05628	

* Versénate de Fer : Sodium de Fer – Acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA-FeNa, 3H₂O)

Annexe 4 : Données relatives à l'expérience 150 ppm

Tableau 1 Phénotype des parties souterraines chez les 4 géotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation.

Traitement	Géotype	Répartition de la biomasse (g . g ⁻¹)						Nombre de nodosités	
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Nodosités / Plante entière			
Témoin	Sauvage	0.20	A	0.19	D	0.037	D	699	B
	P64	0.20	A	0.38	B	0.076	B	877	AB
	P118	0.15	B	0.36	C	0.055	C	764	B
	P121	0.20	A	0.51	A	0.112	A	1296	A
Ablation	Sauvage	0.13 (***)	a	0.20 (*)	c	0.027 (***)	d	168 (***)	b
	P64	0.12 (***)	a	0.30 (***)	b	0.038 (***)	b	347 (**)	b
	P118	0.09 (***)	b	0.33 (ns)	b	0.031 (***)	c	295 (***)	b
	P121	0.13 (***)	a	0.55 (ns)	a	0.070 (***)	a	744 (*)	a

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre géotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Expérience 150 ppm

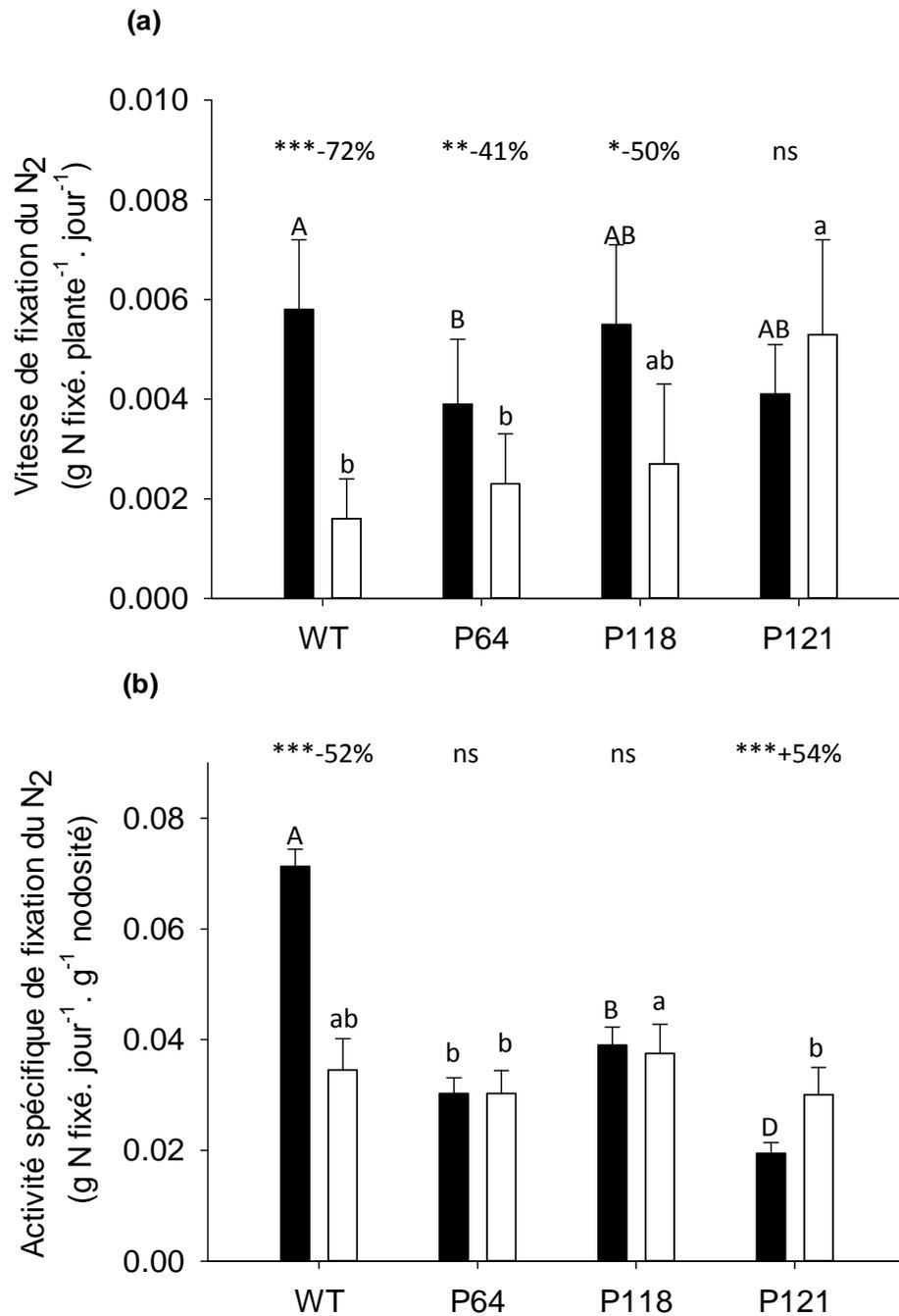


Fig. 1 Fixation du N₂ et activité spécifique de fixation de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La quantité d’N journalière (a) en g N / plante / jour et l’activité spécifique de fixation du N₂ (b) en g N / jour / g de nodosité dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey P≤0.05). Pour chaque traitement, l’effet de l’ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: P≤0.05, **: P≤0.01, ***: P≤0.001)

Expérience 150 ppm

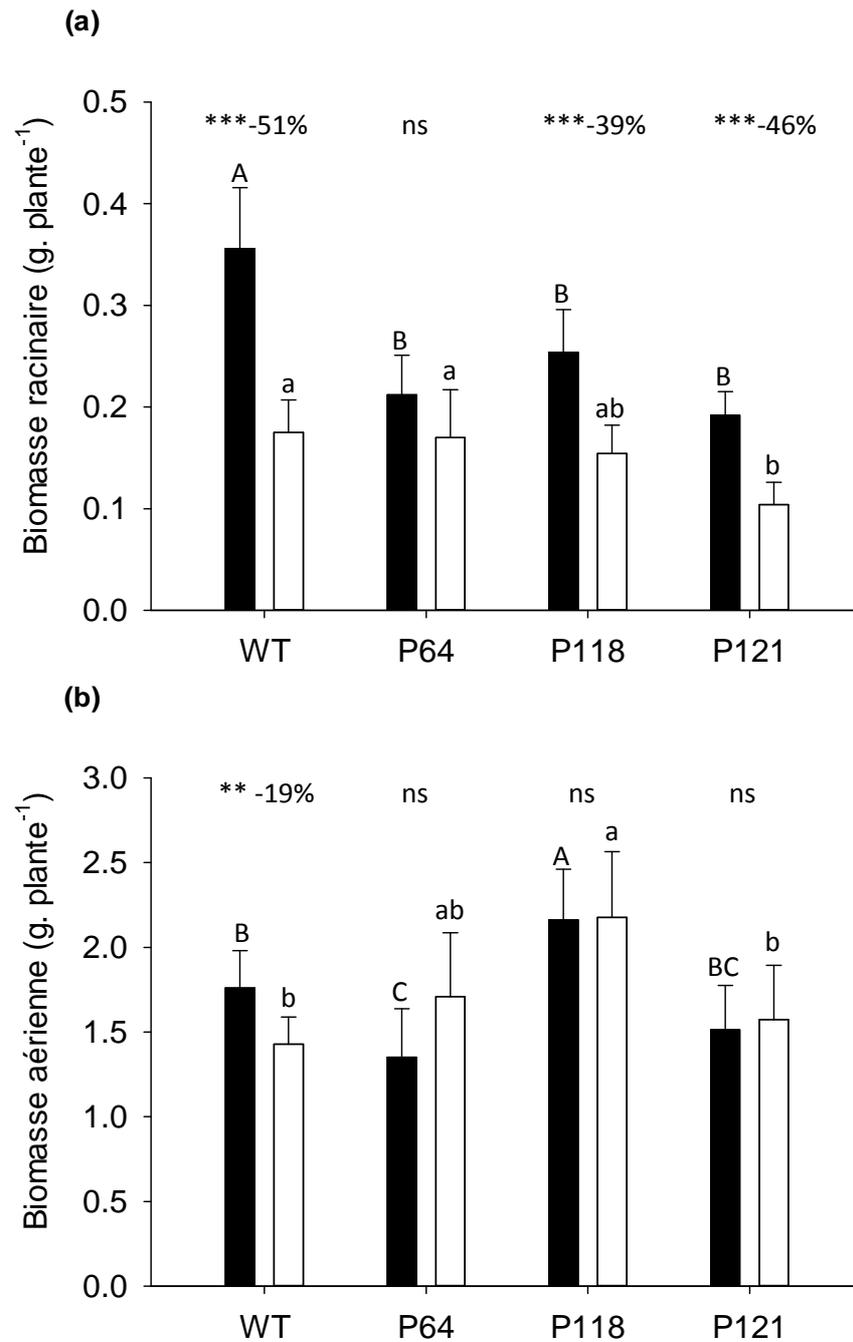


Fig. 2 Biomasse des racines et des parties aériennes de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La biomasse des racines (a) en g / plante et la biomasse des parties aériennes (b) en g / plante dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

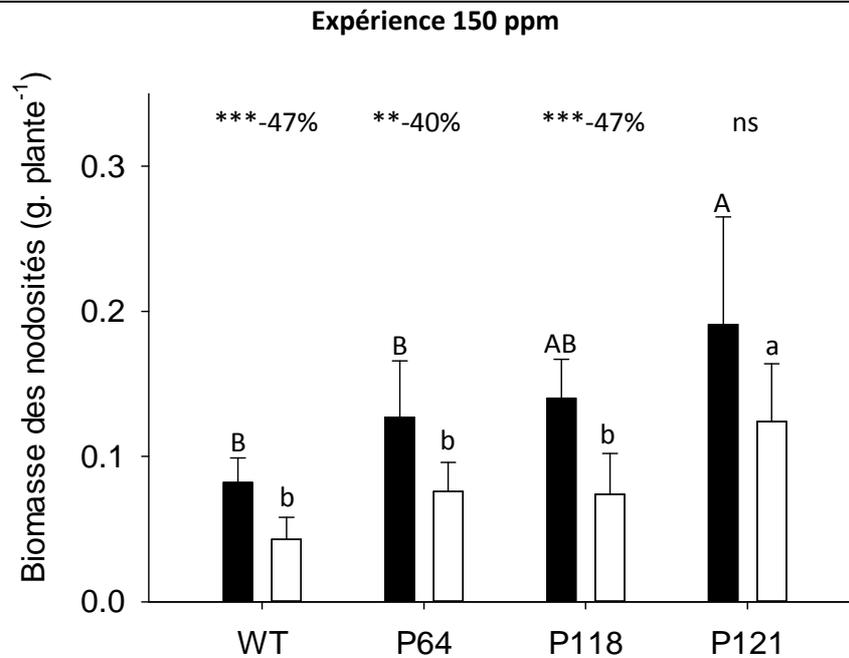


Fig. 3 Biomasse des nodosités de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La biomasse des nodosités en g / plante dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Tableau 2 Phénotype des parties aériennes associé à la photosynthèse chez les 4 génotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation.

Traitement	Génotype	Assimilation du carbone dans la biomasse (g C / plante / jour)		Surface foliaire (cm ²)		Azote surfacique des feuilles (SLN) (mg N / cm ²)		Activité spécifique de photosynthèse (mg C / jour / cm ² feuille)	
Témoin	Sauvage	0.035	A	525	A	0.0076	A	0.068	A
	P64	0.026	B	391	B	0.0057	BC	0.067	A
	P118	0.031	AB	519	A	0.0068	AB	0.058	B
	P121	0.022	B	417	AB	0.0040	C	0.052	C
Ablation	Sauvage	0.022 (**)	a	398 (**)	a	0.0020 (***)	a	0.056 (***)	a
	P64	0.027 (ns)	a	427 (ns)	a	0.0030 (*)	a	0.064 (ns)	a
	P118	0.029 (ns)	a	511 (ns)	a	0.0031 (**)	a	0.056 (ns)	a
	P121	0.025 (ns)	a	502 (ns)	a	0.0044 (ns)	a	0.050 (ns)	b

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Tableau 3 Allocation du carbone nouvellement photosynthétisé au sein de la biomasse des parties aériennes, des racines et des nodosités, chez les 4 génotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation. L'assimilation du C nouvellement photosynthétisé dans la biomasse a été mesurée par utilisation d'un marquage ^{13}C .

Traitement	Génotype	Répartition du carbone nouvellement photosynthétisé (g C / g C)				Force de puits (g C/ jour /g de biomasse)					
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Partie aérienne		Racine		Nodosité	
Témoin	Sauvage	0.17	B	0.33	D	0.017	A	0.012	A	0.025	A
	P64	0.19	B	0.62	C	0.016	A	0.009	B	0.023	AB
	P118	0.15	C	0.69	B	0.012	B	0.006	C	0.021	B
	P121	0.26	A	0.80	A	0.011	C	0.007	C	0.023	AB
Ablation	Sauvage	0.28 (***)	a	0.32 (ns)	c	0.011 (***)	ab	0.026 (***)	a	0.048 (***)	a
	P64	0.23 (*)	a	0.34 (***)	c	0.013 (***)	a	0.025 (***)	a	0.030 (*)	c
	P118	0.19 (***)	b	0.52 (***)	b	0.011 (**)	b	0.017 (***)	b	0.038 (***)	b
	P121	0.25 (ns)	a	0.77 (ns)	a	0.012 (**)	a	0.015 (***)	b	0.040 (***)	b

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Annexe 5 : Données relatives à l'expérience 750 ppm

Tableau 1 Phénotype des parties souterraines chez les 4 génotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypermodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation.

Traitement	Genotype	Répartition de la biomasse (g . g ⁻¹)						Nombre de nodosités	
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Nodosités / Plante entière			
Témoin	Sauvage	0.20	A	0.21	D	0.043	D	360	B
	P64	0.18	B	0.44	B	0.076	B	521	B
	P118	0.18	B	0.37	C	0.064	C	506	B
	P121	0.20	A	0.66	A	0.135	A	1209	A
Ablation	Sauvage	0.10 (***)	b	0.20 (ns)	c	0.021 (***)	c	188 (*)	b
	P64	0.09 (***)	c	0.28 (***)	b	0.024 (***)	c	137 (***)	b
	P118	0.10 (***)	b	0.30 (***)	b	0.030 (***)	b	165 (***)	b
	P121	0.12 (***)	a	0.63 (*)	a	0.076 (***)	a	440 (***)	a

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Expérience 750 ppm

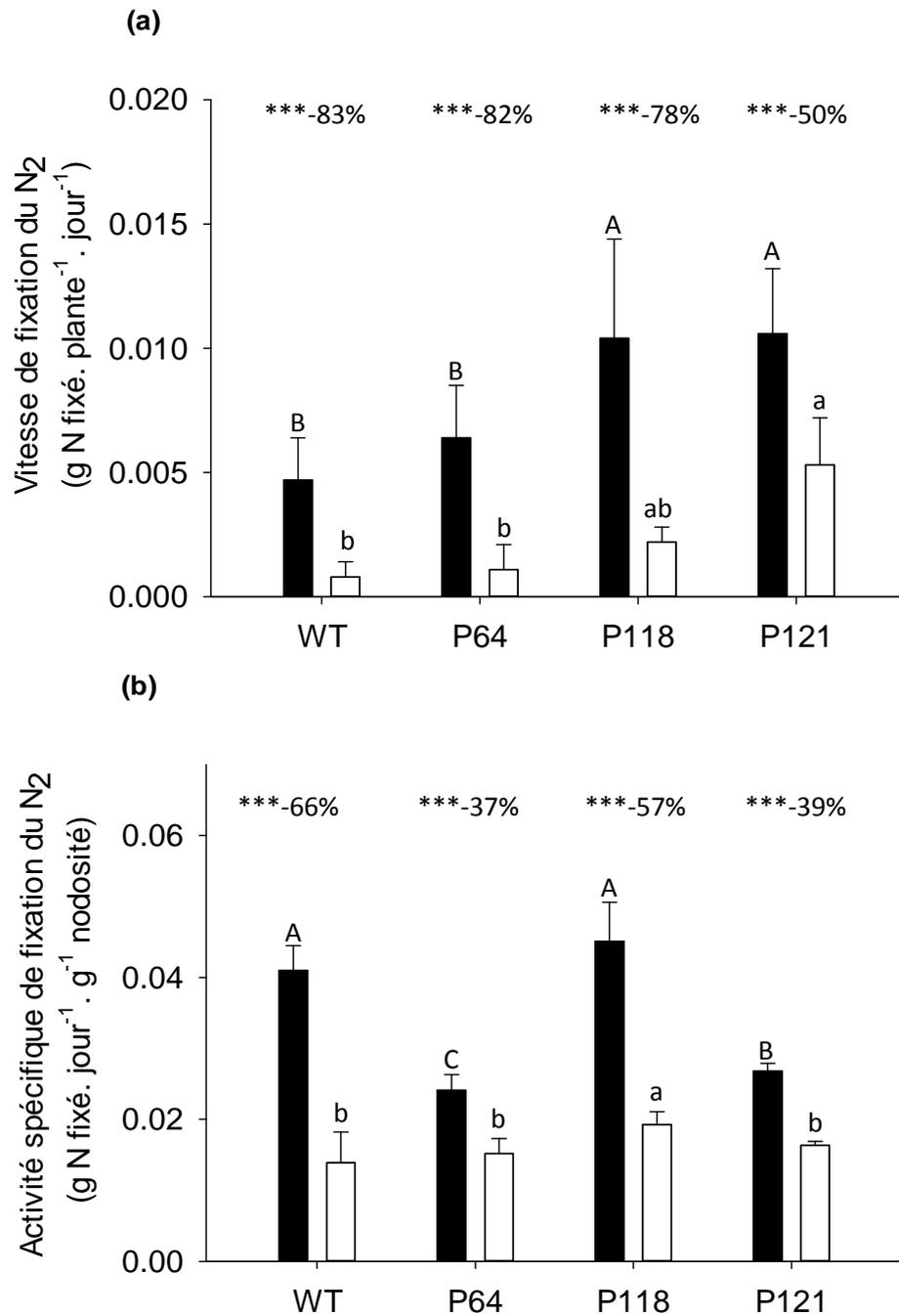


Fig. 1 Fixation du N₂ et activité spécifique de fixation de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La quantité d’N journalière (a) en g N / plante / jour et l’activité spécifique de fixation du N₂ (b) en g N / jour / g de nodosité dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey P ≤ 0.05). Pour chaque traitement, l’effet de l’ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: P ≤ 0.05, **: P ≤ 0.01, ***: P ≤ 0.001)

Expérience 750 ppm

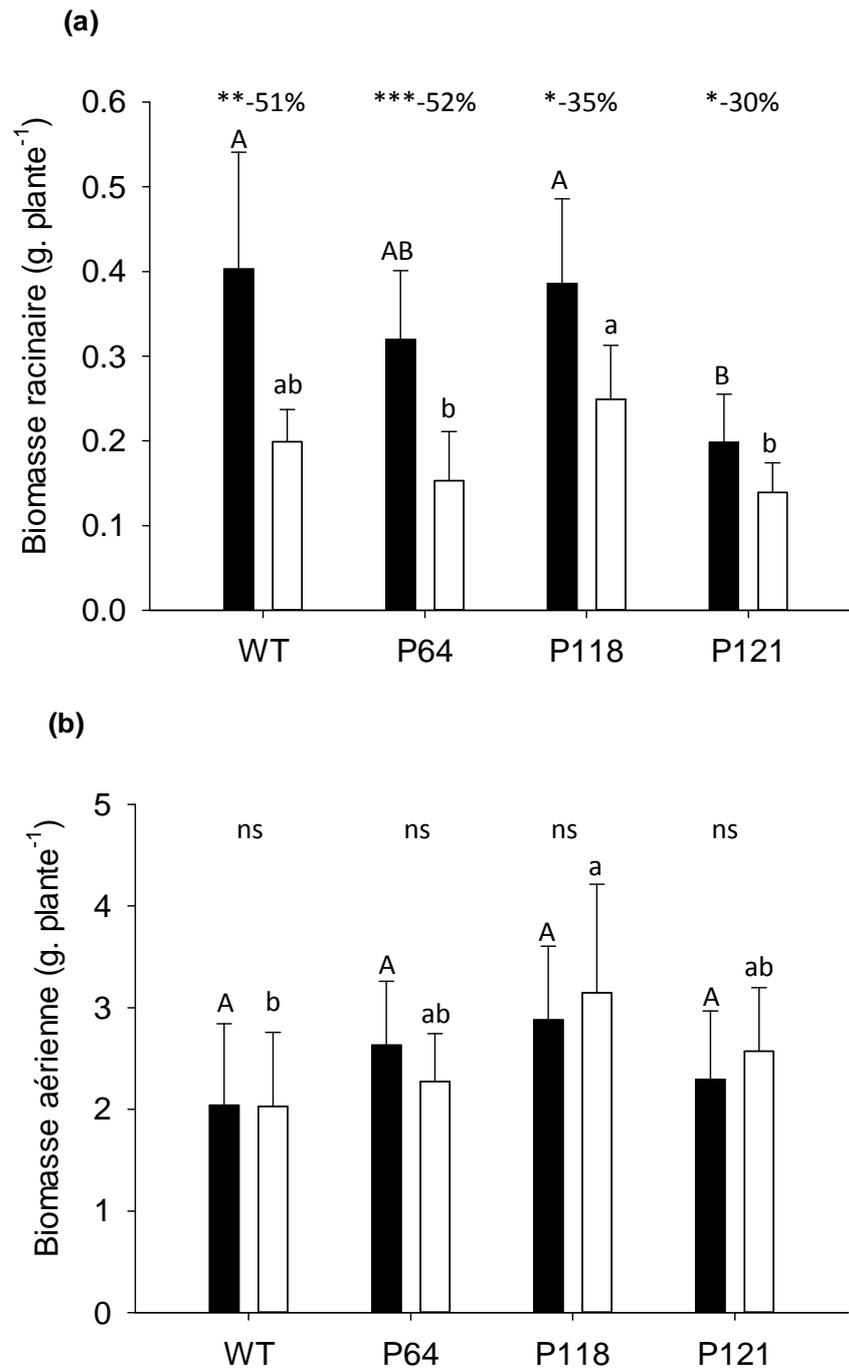


Fig. 2 Biomasse des racines et des parties aériennes de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La biomasse des racines (a) en g / plante et la biomasse des parties aériennes (b) en g / plante dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

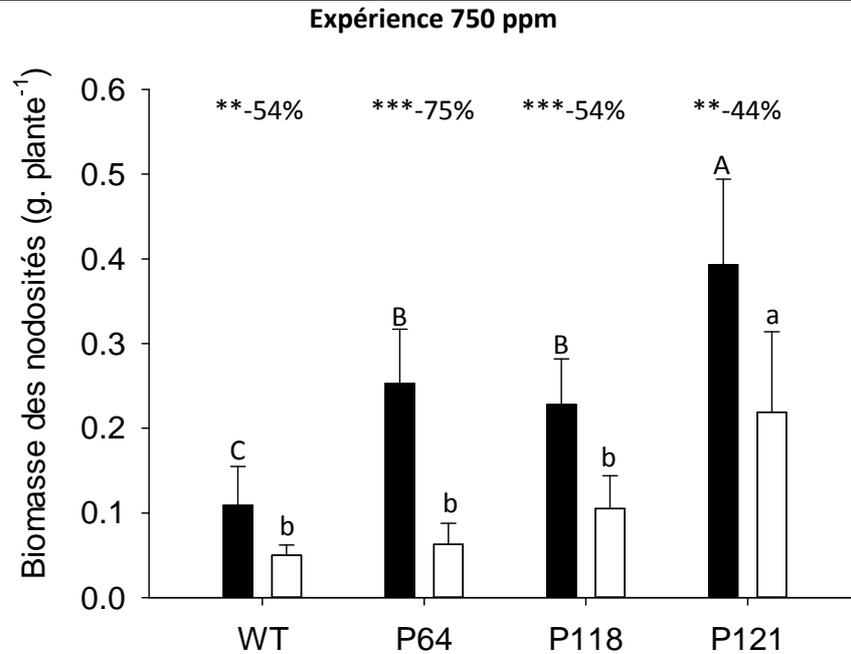


Fig. 3 Biomasse des nodosités de 4 génotypes de Pois var. Frisson : sauvage et ses 3 mutants hypernodulants P64, P118 et P121. La biomasse des nodosités (a) en g / plante dans le traitement témoin (barre noire) et le traitement ablation (barre blanche). Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Tableau 2 Phénotype des parties aériennes associé à la photosynthèse chez les 4 génotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation.

Traitement	Génotype	Assimilation du carbone dans la biomasse (g C / plante / jour)		Surface foliaire (cm ²)		Azote surfacique des feuilles (SLN) (mg N / cm ²)		Activité spécifique de photosynthèse (mg C / jour / cm ² feuille)	
Témoin	Sauvage	0.059	A	550	A	0.0039	B	0.114	B
	P64	0.097	A	547	A	0.0037	B	0.180	A
	P118	0.071	A	637	A	0.0109	A	0.112	B
	P121	0.065	A	554	A	0.0059	B	0.118	B
Ablation	Sauvage	0.056 (ns)	a	464	a	0.0006 (***)	a	0.123 (ns)	c
	P64	0.065 (*)	a	458	a	0.0006 (***)	a	0.144 (***)	b
	P118	0.087 (ns)	a	509	a	0.0017 (**)	a	0.174 (***)	a
	P121	0.075 (ns)	a	558	a	0.0017 (***)	a	0.130 (ns)	bc

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre génotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Tableau 3 Allocation du carbone nouvellement photosynthétisé au sein de la biomasse des parties aériennes, des racines et des nodosités, chez les 4 géotypes de Pois affectés par l'ablation des racines nodulées : Frisson sauvage et 3 de ses mutants hypernodulants (P64, P118 et P121). Mesures réalisées 8 jours après l'ablation. L'assimilation du C nouvellement photosynthétisé dans la biomasse a été mesurée par utilisation d'un marquage ¹³C.

Traitement	Géotype	Répartition du carbone nouvellement photosynthétisé (g C / g C)				Force de puits (g C/ jour /g de biomasse)					
		Racines nodulées / Plante entière		Nodosités / Racines nodulées		Partie aérienne		Racine		Nodosité	
Témoin	Sauvage	0.24	B	0.33	C	0.023	AB	0.025	B	0.046	B
	P64	0.23	B	0.55	B	0.029	A	0.033	A	0.050	A
	P118	0.19	C	0.54	B	0.021	C	0.017	C	0.033	D
	P121	0.31	A	0.84	A	0.020	C	0.017	C	0.044	C
Ablation	Sauvage	0.13 (***)	b	0.32 (ns)	c	0.025 (ns)	ab	0.026 (ns)	b	0.049 (ns)	a
	P64	0.10 (***)	c	0.34 (***)	bc	0.026 (**)	a	0.031 (ns)	a	0.041 (***)	b
	P118	0.11 (***)	c	0.40 (***)	bc	0.025 (***)	ab	0.026 (***)	b	0.039 (**)	b
	P121	0.19 (***)	a	0.76 (**)	a	0.024 (***)	b	0.027 (***)	b	0.050 (***)	a

Chaque valeur représente la moyenne de 8 répétitions. Au sein de chaque traitement, une lettre différente montre une différence significative entre géotypes (Test de Tukey $P \leq 0.05$). Pour chaque traitement, l'effet de l'ablation des racines nodulées a été testé en utilisant un test 2 à 2 de Student. Une * représente une différence significative (*: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.01$, ***: $P \leq 0.001$)

Notes

