



**HAL**  
open science

# Les flux d'azote dans le système sol-plante-microorganismes dans différents contextes écologiques et agronomiques

Laure Barthes

► **To cite this version:**

Laure Barthes. Les flux d'azote dans le système sol-plante-microorganismes dans différents contextes écologiques et agronomiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Saclay, 2021. tel-04417772

**HAL Id: tel-04417772**

**<https://hal.science/tel-04417772v1>**

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

# **HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES**

## **Université Paris-Saclay**

Spécialité :  
**Biologie Végétale, Ecologie, Evolution**

Présentée par

**Laure BARTHES**

Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution UMR8079 – Université Paris-Saclay

# **Les flux d'azote dans le système sol-plante- micro-organismes dans différents contextes écologiques et agronomiques**

Soutenance prévue le **16 mars 2021** devant le jury d'examen :

Luc ABBADIE  
Isabelle BERTRAND  
Claire DAMESIN  
Paul LEADLEY  
Pascale MAILLARD

Professeur d'Université, Sorbonne Université Paris – Rapporteur  
Directrice de Recherche, INRAE UMR Eco & Sol, Montpellier – Examinatrice  
Professeure d'Université, Université Paris-Saclay, Orsay - Examinatrice  
Professeur d'Université, Université Paris-Saclay, Orsay – Rapporteur  
Chargée de Recherche HDR, INRAE Nancy – Rapporteuse

## Table des matières

Table des matières .....	2
<b>I. Curriculum vitae.....</b>	<b>5</b>
1. Etat civil .....	5
2. Titres universitaires .....	5
3. Parcours.....	5
4. Encadrement en recherche .....	6
5 co-encadrements de thèses .....	6
4 DEA/Masters 2 <sup>ème</sup> année .....	6
4 Masters 1 <sup>ère</sup> année.....	7
5. Participation à des projets nationaux et européens .....	7
6. Fonctions d'intérêt collectif.....	8
Expertise .....	8
Membre de conseils .....	8
Membre de Commission de spécialistes, Comités de sélection, Jury de recrutement.....	8
7. Production scientifique .....	9
Articles.....	9
Conférences.....	11
Chapitres d'ouvrage .....	11
Posters .....	12
<b>II. Bilan des activités d'enseignement.....</b>	<b>13</b>
1. Statut .....	13
2. Thèmes abordés .....	13
3. Responsabilités d'enseignement.....	13
4. Niveau d'intervention.....	14
5. Organisation des enseignements sur l'année .....	14
6. Philosophie de mes enseignements .....	15
<b>III. Bilan des activités de recherche.....</b>	<b>16</b>
Première partie : ma carrière, de l'agronome à l'écologue .....	16
1. DEA, thèse, post-doc : perspectives agronomiques .....	16
1.1 DEA et Thèse.....	16
1.2 ATER et post-doc .....	17
2. Mes activités de recherches depuis mon recrutement en tant que maître de conférences à l'Université Paris-Saclay : perspectives écologiques .....	18

2.1 Mes travaux au sein de l'équipe Ecologie des Populations et de Communautés de l'ESE : les effets des changements globaux sur le cycle de l'azote .....	18
2.2 Mes travaux au sein de l'équipe Ecophysiologie végétale de l'ESE : la dynamique des réserves azotées et carbonées dans le système arbre-sol-biomasse microbienne.....	19
Deuxième partie : problématique et état de l'art.....	20
Section I : Les flux internes d'azote dans les plantes herbacées et les arbres forestiers .....	22
1. Absorption de l'azote par les plantes.....	22
1.1 Physiologie de l'absorption .....	22
1.2 L'adaptabilité de l'absorption et de la croissance des racines aux besoins des plantes et à la disponibilité en azote dans le sol.....	22
1.3 La contribution des symbioses bactériennes fixatrices et mycorhiziennes à l'absorption de l'azote .....	23
1.4 L'absorption par les feuilles.....	24
1.5 Phénologie de l'absorption .....	24
2. Le fonctionnement azoté et carboné des arbres .....	24
2.1 La baisse de productivité à l'âge du peuplement, un lien avec l'azote ? .....	25
2.2 La mise en place des réserves azotées et carbonées, une fonction majeure pour la croissance des arbres .....	25
Section II : Le cycle de l'azote au cœur du fonctionnement des écosystèmes et ses réponses aux changements globaux .....	27
1. La disponibilité de l'azote dans les sols et son impact sur la croissance des plantes en interaction avec les changements globaux .....	27
2. Importance des activités microbiennes du cycle de l'azote dans la réponse aux changements globaux .....	29
2.1 Les principaux flux du cycle de l'azote .....	29
❖ <i>La fixation du diazote</i> .....	30
❖ <i>La production d'ammonium au cours de l'ammonification ; minéralisation versus immobilisation</i> .....	31
❖ <i>La nitrification</i> .....	31
❖ <i>La dénitrification</i> .....	32
2.2 Principes des méthodes utilisées pour quantifier les flux et les organismes impliqués ...	32
2.3 Les activités microbiennes du cycle de l'azote face au changement global : effet des fortes teneurs en CO <sub>2</sub> atmosphérique .....	33
2.4 Les activités microbiennes du cycle de l'azote face aux autres facteurs du changement global : température, précipitations et dépôts azotés.....	34
Troisième partie : mes résultats.....	35
Section I : Fonctionnement azoté des plantes .....	35
1. Influence du nitrate sur les transferts de sève chez le blé et le maïs (thèse) .....	35

2.	La dynamique des réserves carbonées et azotées chez les arbres au cours d'une saison de végétation chez les arbres matures. Exemple de chênes âgés de 100 ans.....	36
3.	La dynamique des réserves carbonées et azotées suivant les classes d'âges chez le chêne ....	36
4.	Origine et temporalité de la mise en réserve chez des arbres in situ .....	38
5.	Bilan de la répartition de l'azote absorbé durant une saison de végétation .....	39
	Section II : Le fonctionnement azoté du sol, et les transferts sol-plante en lien avec le fonctionnement de la biomasse microbienne .....	41
1.	Les activités microbiennes du sol face aux changements globaux. ....	41
2.	Importance de la disponibilité en azote sur la compétition arbre–herbacée dans un contexte de changement global .....	44
3.	La compétition entre les arbres et la biomasse microbienne pour l'acquisition de l'azote .....	47
4.	Identification des groupes microbiens présents .....	48
<b>IV.</b>	<b>Projet de recherche</b> .....	<b>50</b>
1.	Projet 1 : Le cycle de l'azote au cours des saisons dans les systèmes arbre/sol.....	51
2.	Projet 2 : Contribution relative des champignons et des bactéries au pool de C et N de de la biomasse microbienne .....	51
3.	Projet 3 : La limitation de la lixiviation de l'azote par les systèmes agroforestiers .....	51
3.1	Problématique .....	51
3.2	Proposition de stratégie pour répondre à ces questions : projet de thèse en cours.....	53
3.3	Résultats attendus.....	55
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>56</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>57</b>

# I. Curriculum vitae

## 1. Etat civil

### **Laure Barthes**

née le 22 mars 1967, 53 ans  
19, rue des fraisettes 91120 Palaiseau  
2 enfants : 28 et 24 ans

06 46 53 18 17  
laure.barthes@universite-paris-saclay.fr

---

*Maître de conférences de l'Université Paris-Saclay  
Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, CNRS, AgroParisTech,  
Université Paris-Saclay, bât. 362, rue du doyen André GUINIER 91405 Orsay*

---

## 2. Titres universitaires

1995 : Qualification aux fonctions de Maître de conférences (sections 67, 68)  
1994 : Doctorat d'Ecologie générale et production végétale, Université Paris-Sud  
1990 : DEA d'Ecologie générale et production végétale, Université Paris-Sud, mention B  
1989 : Maîtrise de Physiologie végétale, Université de Toulouse III, mention AB  
1988 : Licence de biologie cellulaire et physiologie, Université Toulouse III, mention AB  
1987 : DEUG B, Université Pierre et Marie Curie, mention AB  
1985 : Baccalauréat D

## 3. Parcours

**Maître de conférences** (depuis 1998). Cycle de l'azote et fonctionnement des écosystèmes terrestres (prairie, forêt). Laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution, Université Paris-Saclay.

**Post-doc** (août 1997-juillet 1998). Contrat européen « Tailoring the onion crop for the 21th century ». Cytogénétique moléculaire chez l'Oignon. Laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution, Université Paris-Sud. Pilote du contrat Agnès Ricoch.

**ATER** (1994-1996). Cartographie génétique et Etude du polymorphisme moléculaire des gènes du métabolisme carboné chez le maïs. Laboratoire de génétique des systèmes végétaux, Station de génétique végétale, INRA-CNRS-UPS, Ferme du Moulon, 91170 Gif-sur-Yvette.

**Thèse** (1990-94). Rôle du nitrate sur le transfert de l'eau et des composés azotés du xylème de plantules de maïs et de blé en conditions de poussée racinaire –applications agronomiques. Direction : Eliane Deléens, DR. CNRS. Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris-Sud.

**DEA** (1990, Boursière MRE). Effets de contraintes mécaniques appliquées aux racines sur la conductance stomatique et l'allongement foliaire du maïs (*Zea mays* L.). Direction : François Tardieu, DR INRA. Laboratoire d'Agronomie de l'INRA, Thiverval-Grignon.

## 4. Encadrement en recherche

### 5 co-encadrements de thèses

Novembre 2020 à octobre 2023 : thèse de Mubarak MAHMUD, Université Paris-Saclay. Leached nitrate recovery by trees, transformation dynamics and use in agroforestry system: experimentation and modelling approach. Co-direction à 50% avec Stéphane Bazot (25%), Paul Leadley (15%), Nicolas Delpierre (10%). Financement : Institut convergence C-LAND et Gouvernement du Nigéria.

Février 2019 à février 2022 : thèse d'Aminu FANDA, Université Paris-Saclay. Caractérisation de la dynamique de croissance des racines et des flux de rhizodéposition en forêt tempérée. Directeur : Stéphane Bazot. Participation à l'encadrement. Financement : Gouvernement du Nigeria.

Décembre 2010 – mars 2015 : thèse d'Angélique GILSON, Université Paris-sud. Etude et modélisation du fonctionnement couplé Azote-Carbone-Eau des écosystèmes forestiers. Directeur Eric Dufrêne et co-encadrement avec Stéphane Bazot Financement : Bourse Région d'Ile de France R2DS 1 publication, un poster. Angélique Gilson a été recrutée Chef de projet Vise Associative et soutien aux étudiants Sorbonne Université en CDI depuis 2015

Sept. 2005 – nov. 2008 : thèse d'Audrey NIBOYET, Université Paris-sud. Impact des changements globaux sur le cycle de l'azote. Directeur au Leadley, co-encadrement à 40%. 4 publications. Financement : Bourse du Ministère de la recherche. Actuellement maître de conférences à AgroParisTech.

Oct. 2000 – nov. 2003 : thèse de Romain BARNARD, Université Paris-sud : Effets d'une concentration élevée en CO<sub>2</sub> atmosphérique sur le cycle de l'azote dans les écosystèmes herbacés. Co-direction à 50% en collaboration avec Paul Leadley. 4 publications, Bourse Jean-Schneider de la Chancellerie des Universités de Paris 2002 attribuée à Romain Barnard. Financement Bourse du Ministère de la Recherche. Actuellement CR1 INRAE de Dijon.

### 4 DEA/Masters 2<sup>ème</sup> année

Février – juillet 2020 : Master 2<sup>ème</sup> année CLUES Mubarak MAHMUD, Université Paris-Saclay : Nitrogen Tree Repartition in *Quercus petraea*

Février - juin 2017 : Master 2<sup>ème</sup> année BEE de Baptiste LAFFONT, Université Paris-sud : Identification des groupes microbiens responsables de l'immobilisation de l'azote dans les sols forestiers par la technique des PLFA (Phospho Lipid Fatty Acid).

Février - juin 2005 : Co-direction à 50% du Master 2<sup>ème</sup> année EBE d'Audrey NIBOYET, Université Paris sud : Impact des changements globaux sur les processus de nitrification et de dénitrification dans un écosystème prairial.

Mars 2000 - sept. 2000 : Co-direction à 50% du DEA EBE de Romain BARNARD, Université Paris-sud : Effet du CO<sub>2</sub> sur le cycle de l'azote : étude d'un microcosme de *Holcus lanatus*.

## 4 Masters 1<sup>ère</sup> année

Février- juin 2019 : Master 1<sup>ère</sup> année BEE de Romain SCHROEDER, Université Paris-Sud : Identification des cernes conducteurs chez le Chêne.

Février- juin 2017 : Master 1<sup>ère</sup> année BEE de Tania MAXWELL, Université Paris-Sud : Distribution of soil absorbed mineral nitrogen during the vegetation period in oak trees: an in situ study following a <sup>15</sup>N labelling campaign.

Février - juin 2016 : Master 1<sup>ère</sup> année BEE de Liliana PINEK, Université Paris-Sud : Dynamique de l'azote dans différents compartiments du système sol-arbre en milieux forestier.

Février – mai 2013 : Master 1<sup>ère</sup> année BEE de Shabnam TAHERI, Université Paris-Sud : Effects of nitrogen deposition on nitrogen and carbon allocation in a soil-tree system.

## 5. Participation à des projets nationaux et européens

2016-2019 : Responsable du Projet Emergence de BASC « Printemps » : Evolution temporelle des proportions bactéries champignons dans les sols forestiers au printemps (PROportioN TEMPorelle des champignons bactéries Sols forestiers). Collaboration avec Valérie Pouteau et Claire Chenu du Laboratoire ECOSYS.

2015-2016 : Responsable du Projet IDEEV « TIP-TOP » (Tree InPuT OnProgress). Collaboration avec Marlène Lamothe-Sibolt, Caroline Mauve de l'IP2S et Anne Marmagne, Grégory Mouille de l'INRA de Versailles.

2011-2015 : Participante au projet ANR « PULSE, Lacs périurbains, société et environnement ». ANR Changements Environnementaux Planétaires et Sociétés (CEP&S) 2010. Coordinateur général : Gérard Lacroix (UMR CNRS 7618 BIOEMCO, CNRS ENS Université Paris VI).

2013-2014 : Participante au projet INSU EC2CO « INTERACT – Effets interactifs du feu et des changements globaux sur le cycle de l'azote en écosystème prairial ». Coordinatrice : Audrey Niboyet (UMR CNRS 7618 BIOEMCO, AgroParistech). Partenaires : Ecologie Systématique et Evolution Université de Paris-Sud, Orsay, Ecologie Microbienne (UMR 5557 CNRS/Univ Lyon/USC INRA), Département of Biological Sciences and Merriam Powel Center for Environmental Research Northern Arizona University AZ 86011 Flagstaff.

2009 - 2010 : Participante au projet INSU EC2CO « Nitricomp : conséquences de la compétition pour le nitrite sur le cycle de l'azote dans le sol ». Coordinateur : Xavier Raynaud (BIOEMCO, Université Paris VI) Partenaires : Ecologie Systématique et Evolution Université de Paris XI, Orsay, Ecologie Microbienne (UMR 5557 CNRS/Univ Lyon/USC INRA).

2006 - 2009 : Participante au projet « Quantifying the effects of global environmental change on terrestrial plant diversity » (QDiv) ANR Biodiversité. Coordinateur : Paul Leadley (ESE, Université Paris-Sud) Partenaires : UPSud, ISEM-UM2, CEFÉ-CNRS, Agronomie-INRA Clermont-Ferrand, BIOGECO-INRA Bordeaux, LECA-UJF-CNRS, ENGREF, EEF-INRA Nancy.

2006 - 2008 : Responsable du projet « Effects of several components of global change on the nitrogen cycle in grassland ecosystems » Financement CNRS/NSF pour missions aux Etats-Unis. Coordinateur :

Laure Barthes (ESE, Université Paris-sud) Partenaires : Bruce Hungate, Colorado Plateau Stable Isotope Laboratory Laboratoire d'Ecologie Microbienne, UMR5557 (CNRS-Univ. Lyon1 ; USC INRA 1193).

Septembre 2004 – septembre 2006 : Participante au projet « Impacts du changement global sur la biodiversité et le cycle du carbone en prairie (IMAGINE) » Appel d'offre IFB 2003 : Biodiversité et changement climatique Coordinateur : Jean-François Soussana (INRA Clermont-Ferrand Partenaires : INRA, Equipe Fonctionnement et Gestion de l'Ecosystème Prairial, Clermont-Ferrand, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive CNRS, Ecologie Systématique et Evolution Université de Paris XI, Orsay, Ecologie Microbienne (UMR 5557 CNRS/Univ Lyon/USC INRA), Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE, UMR CEA/CNRS).

2001-2004 Participante au programme « Interactions entre biodiversité et fonctionnement dans les écosystèmes terrestres : aspects fondamentaux et appliqués » ACI-Ecologie Quantitative CNRS PEVS, GDR DIV-ECO. Coordinateur Jacques Roy (CEFE-CNRS, Montpellier) Partenaires : Université Paris-Sud, Unité d'Agronomie-INRA Clermont- Ferrand.

## 6. Fonctions d'intérêt collectif

### Expertise

2008-2015 : Expert pour l'INSU (Institut National des Sciences de l'Univers) pour EC2CO (Écosphère Continentale et côtière), appel thématique microbien

2009 : Expert pour R2DS (Réseau de recherche sur le développement soutenable)

Depuis 2008 : Membre du comité exécutif de la Plateforme Métabolisme-Métabolome, IFR87 La plante et son environnement, IPS2 Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex

### Membre de conseils

2010 – 2014 : Membre élue représentante des maîtres de conférences au conseil du laboratoire

1998 – 2001 : Membre nommée au conseil de laboratoire ESE

### Membre de Commission de spécialistes, Comités de sélection, Jury de recrutement

2015-2019 : Membre du jury national du concours de l'Agrégation SVTU

2011-2014 et 2004-2007 : Membre du jury national du concours CAPES SVT

2009 -2010 : Membre du comité de sélection pour le profil MCF Mort programmée des plantes, Univ. Paris sud en 2010 ; pour le profil MCF Ecologie évolutive des protistes, Univ. Paris sud, et pour la chaire CNRS/UPV-Metz - Emploi N° 0369 de Maître de conférences CNU 67ème section en écotoxicologie Université Paul Verlaine-Metz en 2009

2007-2008 : Membre de la commission de spécialistes section CNU 66-69 de l'Univ. Paris sud.

2000-2003 et 2005-2008 : Membre de la commission de spécialistes "sciences expérimentales" de l'IUFM de Versailles en tant que membre extérieur

2001-2004 : Membre suppléante nommée de la commission de spécialistes section CNU 64-69 de l'Université-d'Evry-Val-d'Essonne

2010-2013 : Membre du comité de thèse de Nicolas Legay du Laboratoire d'Ecologie Alpine de l'Université de Grenoble sur les relations entre la diversité fonctionnelle végétale, la diversité des

communautés microbiennes du sol, et du cycle de l'azote dans les prairies sub-alpines. Direction de Sandra Lavorel et Jean-Christophe Clément

2 décembre 2011 : Membre du jury de thèse de L. El Moujahid du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon en tant qu'examinatrice sur le thème : « Relations entre la diversité des plantes, la diversité des composés carbonés du sol et la diversité des bactéries dénitrifiantes dans des sols de prairies »

2008-2010 : Membre du comité de thèse de Paul Gauthier de l'IBP à l'Université Paris-Sud sur l'Etude de l'interaction métabolique entre la photosynthèse, la (photo)respiration et l'assimilation de l'azote chez les plantes en C3. Direction Guillaume Tcherkez

## 7. Production scientifique

### Articles

1. **Barthes L**, Deleens E, Bousser A, Hannachi L, Gate P, Prioul J-L. Variations of wheat leaf C and N isotope compositions after crop fertilization. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III*. **1995**;318(2).
2. **Barthes L**, Bousser A, Hoarau J, Deleens E. Reassessment of the relationship between nitrogen supply and xylem exudation in detopped maize seedlings. *Plant Physiol Biochem*. **1995**;33(2).
3. Hoarau J, **Barthes L**, Bousser A, Deleens E, Prioul J-L. Effect of nitrate on water transfer across roots of nitrogen pre- starved maize seedlings. *Planta*. **1996**;200(4):405-415.
4. **Barthes L**, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul JL. Nitrate use and xylem exudation in detopped wheat seedlings: An early diagnosis for predicting varietal differences in nitrogen utilisation? *Aust J Plant Physiol*. **1996**;23(1).
5. **Barthes L**, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul J-L. Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine synthetase inhibitors as tools. *J Exp Bot*. **1996**;47(4):485-495. <http://jxb.oxfordjournals.org/content/47/4/485>.
6. Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahé A, **Barthes L**, Leonardi A, Prioul JL. Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol*. **1999**;39(2):373-380.
7. **Barthes L**, Ricroch A. Interspecific chromosomal rearrangements in monosomic addition lines of *Allium*. *Genome*. **2001**;44(5):929-935.
8. Barnard R, **Barthes L**, Le Roux X, Harmens H, Raschis A, Soussana JF, Winler B, Leadley PW. Atmospheric CO<sub>2</sub> elevation has little effect on nitrifying and denitrifying enzyme activity in four European grasslands. *Glob Chang Biol*. **2004**;10(4):488-497.
9. Barnard R, **Barthes L**, Le Roux X, Leadley PW. Dynamics of nitrifying activities, denitrifying activities and nitrogen in grassland mesocosms as altered by elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytol*. **2004**;162(2):365-376.

10. Barnard R, Leadley PW, Lensi R, **Barthes L**. Plant, soil microbial and soil inorganic nitrogen responses to elevated CO<sub>2</sub>: A study in microcosms of *Holcus lanatus*. *Acta Oecologica*. **2005**;27(3):171-178.
11. Barnard R, **Barthes L**, Leadley PW. Short-term uptake of <sup>15</sup>N by a grass and soil microorganisms after long-term exposure to elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Soil*. **2006**;280(1-2):91-99. doi:10.1007/s11104-005-2553-4.
12. Barnard R, Roux XLE, Hungate BA, Cleveland EE, Blankinship JC, **Barthes L**, Leadley PW. Several components of global change alter nitrifying and denitrifying activities in an annual grassland. *Funct Ecol*. **2006**;20(4):557-564.
13. Loranger-Merciris G, **Barthes L**, Gastine A, Leadley P. Rapid effects of plant species diversity and identity on soil microbial communities in experimental grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem*. **2006**;38(8):2336-2343.
14. Bloor JMG, **Barthes L**, Leadley PW. Effects of elevated CO<sub>2</sub> and N on tree-grass interactions: An experimental test using *Fraxinus excelsior* and *Dactylis glomerata*. *Funct Ecol*. **2008**;22(3):537-546.
15. Bloor JMG, Leadley PW, **Barthes L**. Responses of *Fraxinus excelsior* seedlings to grass-induced above- and below-ground competition. *Plant Ecol*. **2008**;194(2):293-304.
16. Bloor JMG, Niboyet A, Leadley PW, **Barthes L**. CO<sub>2</sub> and inorganic N supply modify competition for N between co-occurring grass plants, tree seedlings and soil microorganisms. *Soil Biol Biochem*. **2009**;41(3):544-552.
17. Niboyet A, **Barthes L**, Hungate BA, Le Roux X, Bloor JMG, Ambroise A, Fontaine S, Price P, Leadley PW. Responses of soil nitrogen cycling to the interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and inorganic N supply. *Plant Soil*. **2010**;327(1-2):35-47. doi:10.1007/s11104-009-0029-7.
18. Niboyet A, Brown JR, Dijkstra P, Blankinship JC, Leadley PW, Le Roux X, **Barthes L**, Barnard RL, Field CB, Hungate BA. Global change could amplify fire effects on soil greenhouse gas emissions. *PLoS One*. **2011**;6(6):e20105 . doi:10.1371/journal.pone.0020105
19. Niboyet A, Le Roux X, Dijkstra P, Hungate BA, **Barthes L**, Blankinship JC, Brown JR, Field CB, Leadley PW. Testing interactive effects of global environmental changes on soil nitrogen cycling. *Ecosphere*. **2011**;2(5). doi:10.1890/ES10-00148.1.
20. Epron D, Ngao J, Dannoura M, Bakker MR, Zeller B, Bazot S, Bosc A, Lata JC, Priault P, **Barthes L**, Loustau D. Seasonal variations of belowground carbon transfer assessed by in situ <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> pulse labelling of trees. *Biogeosciences*. **2011**;8(5). doi:10.5194/bg-8-1153-2011.
21. Bazot S, **Barthes L**, Blanot D, Fresneau C. Distribution of non-structural nitrogen and carbohydrate compounds in mature oak trees in a temperate forest at four key phenological stages. *Trees - Struct Funct*. **2013**;27(4):1023-1034.
22. Gilson A, **Barthes L**, Delpierre N, Dufrêne E, Fresneau C, Bazot S. Seasonal changes in carbon and nitrogen compound concentrations in a *Quercus petraea* chronosequence. *Tree Physiol*. **2014**;34(7):716-729.

23. Le Roux X, Bouskill NJ, Niboyet A, **Barthes L**, Dijkstra P, Field CB, Hungate BA, Lerondelle C, Pommier T, Tang J, Terada A, Tourna M, Poly F. Predicting the responses of soil nitrite-oxidizers to multi-factorial global change: A trait-based approach. *Front Microbiol.* **2016**;7(MAY). doi:10.3389/fmicb.2016.00628.
24. Bazot S, Fresneau C, Damesin C, **Barthes L**. Contribution of previous year's leaf N and soil N uptake to current year's leaf growth in sessile oak. *Biogeosciences.* **2016**;13(11):3475-3484. doi:10.5194/bg-13-3475-2016.
25. Maxwell TL, Bazot S, Marmagne A, Pinek L, Laffont B, Vincent G, **Barthes L**. In situ fate of mineral N in the tree-soil-microorganism system before and after budburst in 20-year-old *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. **2020** Plant and Soil: 1-14.

## Conférences

Niboyet A, Le Roux X., **Barthes L.**, Hungate B., Dijkstra P., Blankinship, J. C.; Brown, J. R., Field, C. B.; Leadley, P. **2009**. Soil nitrifying and denitrifying capacities are altered by global change factors in a California annual grassland. American Geophysical Union, Fall Meeting 2009, abstract #B12B-05. 2009.

Niboyet A., Ambroise A., **Barthes L.**, Field C.B., Fontaine S., Hungate B., Leadley P.W., Le Roux, X. **2007**. Effects of several components of global change and their interactions on nitrification and denitrification. Annual meeting of British Ecological Society 10-12 september.

Deléens E. Prioul J.-l. Hannachi L., **Barthes L.** **1998**. Use of variations in natural abundance of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N for in vivo probing of integrated functions of plants: carboxylations, water use efficiency, C and N partitioning. Gordon conference, 7-11 mars, Oxnard (USA).

## Chapitres d'ouvrage

Deléens E., **Barthes L.**, Prioul J.-L. Utilisation de la modélisation du fractionnement isotopique du flux de C photosynthétique en chambre d'assimilation : cas des végétaux à métabolisme C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>. **1995** in Publication INRA "Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes " (Les Colloques INRA, n°70). 43-64.

Deléens E., **Barthes L.**, Hannachi L., Bousser A., Casabianca H., James H., Bigois M., Gate P., Vignier L., Bouthier A. **1994**. Les nouveaux outils pour la caractérisation variétale de l'utilisation de l'eau et de l'azote chez le blé : les abondances isotopiques naturelles des plantes. *Perspectives agricoles*, 190, 108-122.

## Posters

- Laffont B., Pouteau V., Maxwell T., Marmagne A., Vincent G., Chenu C., **Barthes L.** Identification of microbial groups responsible for the immobilization of nitrogen in forest soils with the PLFA (phospholipidic fatty acid) technique. Microbes Day Saclay 27 mars **2019**.
- Barthes L.**, Bazot S., Laffont B., Lamothe-Sibold M., Mauve C., Marmagne A., Maxwell T., Mouille G., Pinek L., Vincent G. Competition between tree and microbial biomass for mineral nitrogen acquisition during spring: An <sup>15</sup>N in situ study in an oak forest. Functional Ecology Conferences Nancy 10-13 December **2018**.
- Barthes L.**, Chenu C. Laffont B., Marmagne A., Maxwell T., Vincent G. Pouteau V. Identification of microbial groups responsible for the immobilization of nitrogen in forest soils with the PLFA (phospholipidic fatty acid) technique Functional Ecology Conferences Nancy 10-13 December **2018**.
- Barthes L.**, Bazot S., Pinek L., Vincent G., Lamothe-Sibold M., Mauve C. Marmagne A. Dufrêne E., Mouille G. Is there a competition between trees and microbial biomass for mineral nitrogen acquisition during spring? An Oak forest *in situ* study. JEFF 28-31 mars **2017**.
- Gilson A., Bazot S., **Barthes L.**, Delpierre N., Fresneau C., Audebert L., Dufrêne E. Tree age-related effects on seasonal dynamics of carbon reserves in *Quercus petraea*: an in situ experimental approach. Geophysical Research Abstracts. Vol. 15, EGU2013-10698, 2013. EGU General Assembly 2013. Vienna Austria, 7-12 april **2013**.
- Niboyet A., Attard E., **Barthes L.**, Field C., Guillaumaud N., Hungate B., Leadley P., Lerondelle C., Pommier T., Tourna M., Terada A., Poly F., Le Roux X. Responses of soil nitrite-oxidizers to global environmental changes. Nature Precedings. Available from Nature Precedings <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2011.5509.1>> **2011**.
- Niboyet A., Ambroise A., **Barthes L.**, Field C. Fontaine S., Hungate B. Le Roux X., Leadley P. W. Effects of several components of global change and their interactions on nitrification and denitrification in grassland ecosystem. *Rhizosphere 2 conference*. Montpellier 26-31 august **2007**.
- Le Roux X., Henry C., Niboyet A., Attard E., Commeaux C., Guillaumaud N., Leadley P.W., Field C., **Barthes L.**, Poly F. How do components of global change and their interactions affect soil nitri-oxidizers in grasslands? *Rhizosphere 2 conference*. Montpellier 26-31 august **2007**.

## II. Bilan des activités d'enseignement

### 1. Statut

**Monitrice** de 1991 à 1994 à l'Université Paris-Sud 64 hdt/an durant ma thèse.

**ATER** à mi-temps de 1994 à 1996 à l'Université Paris-Sud 96 hdt/an.

**Maître de conférences à l'Université** Paris-Sud, maintenant Paris-Saclay, depuis 1998 section CNU 67 comme **Directeur d'études à l'IUFM de Versailles** pour la période 1998-2002 puis intégrée pleinement à l'Université par la suite. J'ai obtenu un Congé de Reconversion pour Changement Thématique (CRCT) de 6 mois de septembre 2013 à février 2014 puis une Délégation au CNRS pendant un an et demi de septembre 2014 à février 2016.

### 2. Thèmes abordés

**Physiologie végétale et biologie végétale** : nutrition azotée, carbonée et alimentation hydrique, croissance, reproduction, développement, systématique des Embryophytes, des algues. **Ecologie** : Le sol, les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote, méthodes en écologie, physico-chimie du sol, dendrochronologie. **Etude d'écosystèmes** : prairies, forêt, lac, zone de balancement des marées, sol. Interactions interspécifiques. Les végétaux des milieux humides. **Préparation au concours du CAPES** : Leçons, écrits TP. **Stage de terrain** : Flore commune de la région Ile de France (sortie sur le terrain campus Orsay, forêt de Fontainebleau, forêt de Rambouillet, flore des montagnes (stage dans les Alpes et Auvergne), flore des bords de mer, algologie (stage à Roscoff).

### 3. Responsabilités d'enseignement

J'identifie deux grandes phases dans mon activité d'enseignement, la première qui a débuté avec mon recrutement, où mon activité s'est essentiellement concentrée sur la formation des étudiants aux concours du CAPES SVT, et la deuxième qui a débuté après mes congés d'enseignement et les réformes du CAPES, où l'essentiel de mon activité s'est concentrée sur la filière de formation des étudiants en Ecologie. Durant cette deuxième période, qui correspond à mon service actuel, j'ai maintenu les liens avec la filière enseignement en continuant à encadrer la partie végétale du stage pluridisciplinaire de terrain dans les Alpes et en Auvergne du master MEEF et quelques sorties sur le terrain. Je détaille dans la suite de ce paragraphe, mes activités d'enseignement pour ces deux périodes.

Période 1 : De mon année de recrutement à 2010, j'étais responsable de la filière « verte » de la préparation au CAPES SVT de notre Université et de l'IUFM de Versailles. J'y assurai la quasi-totalité de mon service d'enseignement dans les domaines disciplinaires qui impliquaient les végétaux, de la cellule à l'écosystème. Ce travail consistait à réaliser des cours, monter des TP, encadrer des préparations à l'écrit et aux oraux, faire passer des écrits blancs et oraux blancs. Le deuxième aspect de mon travail consistait à organiser les enseignements dans ce champ disciplinaire : contact des intervenants, planification des thèmes et des interventions des collègues. Enfin, j'étais responsable de l'organisation du stage pluridisciplinaire (biologie et géologie) de terrain dans les Alpes et j'y encadrais la partie « biologie et écologie végétale ». De 1994 à 2005, l'organisation des enseignements se déroulait sur une année, découpée par nos soins en bloc thématique correspondant au programme du concours.

A partir de 2005, avec la loi Fillon, qui a modifié le statut des IUFM qui devenaient des écoles faisant partie des universités, la filière a connu de nombreuses réformes avec des changements d'organisation des concours et des filières de formation. En 2010, la masterisation de la filière enseignement nous a conduit à organiser la formation en Unités d'Enseignement et j'ai alors pris la responsabilité des UE ayant trait à l'Ecologie et Evolution. Durant cette période 1, j'avais pris aussi en plus la responsabilité de l'option Floristique du L1 et du stage de biologie marine de Roscoff en M1.

J'avoue que la succession des réformes, qui ne me sont pas apparues forcément pertinentes pour la qualité de la formation, ont fini par me lasser et lorsque que les réformes ont conduit à une diminution importante du volume horaire consacré à la formation disciplinaire, j'ai demandé un CRCT. Ce CRCT m'a permis d'une part de me décharger d'enseignements qui allaient disparaître et d'autre part d'améliorer mon intégration en recherche dans l'équipe EV. Cela a été très positif dans la mesure où le CRCT m'a permis de relancer mon activité de recherche. Des collègues ont alors accepté de reprendre les responsabilités que j'assumais et les enseignements qui n'avaient pas été supprimés par la réforme. J'ai cédé la responsabilité de l'UE Floristique à Hervé Sauquet et partagé la responsabilité de l'UE BEMA avec Hélène Courvoisier.

Période 2 : A la reprise de mon temps plein d'activité, comme des enseignements avaient été supprimés, je me suis investie dans le master Biodiversité Ecologie et Evolution (BEE) et la licence de BOE. Actuellement, j'effectue l'essentiel de mon enseignement dans cette filière et je suis co-responsable de l'UE BEMA (Biologie et Ecologie des Milieux Aquatiques) qui comprend un stage de terrain à Roscoff en M1 BEE. Cette année 2020-2021, j'ai monté une nouvelle option pour les L1 intitulée « Initiation à la botanique de terrain », qui ouvrira au deuxième trimestre. J'interviens en L3 BOE pour un cours et des sorties sur le terrain sur la végétation des milieux humides et les relations sol et végétation (56 heures), en master BEE pour des TP sur les méthodes de terrain en écologie dans l'UE METO et sur l'algologie dans l'UE BEMA (70heures), en master MEEF pour le stage de terrain (44 heures). Je fais quelques interventions supplémentaires dans différents modules : Cours d'écologie microbienne du sol pour le Master 1 Biologie santé, interventions ponctuelles dans le Master 2 BEE, comme par exemple dans l'UE ADAC (Adaptations aux changements globaux) ou bien dans l'UE HUNA (relation humain-nature), cours sur le sol en L2, suivi des études de cas pour le Master 2 Pollution Chimique et Gestion Environnementale.

#### 4. Niveau d'intervention : L1, L3, M1, M2

#### 5. Organisation des enseignements sur l'année

Niveau	Intitulé UE	Nature des enseignements	HTD
L1	Biodiversité	TP sur les embryophytes avec sorties sur le terrain	18
L3 BOE	ECO1	Cours : les végétaux aquatiques TP : la végétation des mares TP : Les relations sol végétation	56
M1 BEE	Méthodologie et Ecologie	TP : Inventaire forestier et bilan Carbone TP : Granulométrie du sol	22
M1 BEE	Biologie et écologie des milieux aquatiques	Cours : Algologie Stage de terrain 6 jours Roscoff	52
M1 MEEF	Stage de terrain naturaliste	Stage de terrain dans les Alpes et en Auvergne 10 jours pour la préparation aux concours de l'enseignement	44
M2 BEE	Changement globaux et bioclimatologie	Cours : analyse d'articles	6

## 6. Philosophie de mes enseignements

### **La priorité à l'observation : importance des stages de terrain**

La science cherche à expliquer le monde qui nous entoure. Je crois qu'il est important de faire attention à ce que nos cours puissent remplir cet objectif. Le premier pas dans cette démarche consiste à mes yeux, à faire découvrir aux étudiants le monde naturel qui nous entoure. Souvent ces derniers sont issus de milieux urbains et n'ont pas forcément eu souvent l'occasion d'observer la nature. Regrettant que cet éveil à la biodiversité arrive si tardivement dans leur formation, je prends beaucoup de plaisir à compenser ce manque et faire découvrir aux étudiants les plantes qu'ils peuvent croiser. Cette formation à la biodiversité est un enjeu actuel important car comment protéger ce qu'on ignore ? Les stages sur le terrain sont des moments privilégiés pour cette formation. Ils représentent également l'opportunité de décompartmenter les disciplines et donner aux étudiants l'occasion d'appréhender la nature selon différents niveaux hiérarchiques ou selon différents angles de vue. Cela leur permet de solidifier leur connaissance et d'établir des connexions entre différents champs disciplinaires. Par ailleurs, j'estime que dans la continuité de la philosophie de l'école publique pour tous et selon les principes de notre constitution, il est de notre devoir de permettre à nos étudiants de découvrir les richesses naturelles, paysagères de la France. Ce sont pour ces raisons qu'au cours de mon parcours j'ai pris en charge des enseignements de terrain : sur le campus, dans les forêts de la région (Fontainebleau, Rambouillet), au bord de mer à Roscoff, dans les Alpes et en Auvergne, avec suivant les années et les lieux, les étudiants de L1, L3, M1 BEE, la préparation au CAPES SVT ou le Master MEEF. Nous avons beaucoup de chance que notre Université accepte de financer ces stages, qui bien que coûteux et difficiles à organiser, sont des outils de formation scientifique et citoyenne extrêmement puissants.

### **Le plaisir et la motivation à enseigner**

J'éprouve généralement un grand respect pour nos étudiants que je trouve la plupart du temps sympathiques, investis et sérieux. Je constate qu'ils peuvent s'impliquer fortement dans les projets d'apprentissage qu'on leur propose et je suis régulièrement impressionnée par leurs productions, parfois remarquables. Leur curiosité, leur questionnement et leur volonté de réussir sont à la base de ma motivation d'enseigner.

Enseigner m'a aussi beaucoup apporté car j'ai dû investir de nouveaux domaines que je n'avais pas étudiés dans ma formation et qu'il m'a fallu enseigner. Cet élargissement de ma culture scientifique grâce à l'enseignement est la seconde source de ma motivation. Mon début de carrière à la préparation au CAPES a été à ce titre extrêmement stimulant. J'ai eu la grande chance d'être accompagnée à ce moment-là par des collègues qui m'ont beaucoup soutenue et qui m'ont aidée à combler mes lacunes. J'essaie actuellement de m'inspirer de tous ces moments positifs, pour que les étudiants puissent également avoir le sentiment que par leur sens de l'observation, leur questionnement, leur travail et leur réflexion, ils accèdent peu à peu à une meilleure connaissance du monde.

### III. Bilan des activités de recherche

Initialement, je voulais devenir ingénieur agronome ou travailler sur les plantes au service de l'agriculture. Finalement, mon goût pour la recherche et la méthode scientifique l'a emporté. J'ai intégré le DEA d'Ecologie et de production végétale de l'Université Paris-Sud. J'importais alors dans mes premiers travaux de recherche cette inclination pour les problématiques agronomiques, sous l'angle de l'amélioration des pratiques culturales et de la sélection variétale. Cependant, assez rapidement dans ma carrière, je me suis rendue compte de l'importance des interactions sol-plante, notamment dans le cycle de l'azote, pour comprendre le fonctionnement d'un système agronomique, et plus généralement le fonctionnement de tout écosystème.

Ainsi, partant, d'une perspective agronomique où les interactions sol-plante étaient abordées de manière incidente, j'ai mis au cœur de ma recherche la perspective écologique, pour explorer le cycle de l'azote au sein de différents écosystèmes, dans un contexte de changements globaux.

En effet, dans le contexte de réchauffement global, le cycle de l'azote est primordial : son analyse permet d'anticiper la réaction des écosystèmes aux effets des changements globaux. De plus, ce cycle - comme les autres grands cycles biogéochimiques - est largement influencé par les changements globaux.

Premièrement, je reviendrai sur les différentes étapes de ma carrière pour retracer le cheminement intellectuel qu'elle m'a permis d'opérer (première partie), puis je présenterai le contexte scientifique et bibliographique de ma problématique (deuxième partie). Enfin, je présenterai les résultats de mes travaux et leurs apports à ma problématique (troisième partie).

#### Première partie : ma carrière, de l'agronome à l'écologue

La première partie (1990-1998) concerne mes travaux durant ma formation à la recherche (DEA, Thèse et post Doc) où j'ai travaillé dans une perspective agronomique sur des thématiques concernant les relations entre le fonctionnement de l'appareil racinaire et l'appareil caulinaire chez les plantes de grandes cultures en lien avec des pratiques culturales (DEA thèse), ainsi que sur la caractérisation des génomes dans le cadre de l'amélioration végétale (ATER, Post Doc).

La deuxième partie (1998-2020) présente mon parcours depuis mon recrutement au sein du Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution en tant que Maître de conférences, d'abord dans l'équipe Ecologie des Populations et des communautés (1998-2010) puis dans l'équipe Ecophysiologie végétale (2011-2020). Mes travaux se sont alors inscrits dans une perspective écologique.

##### 1. DEA, thèse, post-doc : perspectives agronomiques

###### 1.1 DEA et Thèse

J'ai effectué mon stage de DEA au Laboratoire d'Agronomie de l'INRA de Thiverval Grignon. J'ai travaillé sur la problématique des contraintes mécaniques appliquées sur les racines de plants de maïs et de leurs répercussions sur le comportement du système aérien afin de mieux comprendre les impacts du tassement du sol sur les plantes.

Par la suite, j'ai souhaité poursuivre dans ce genre de thématique qui alliait physiologie de la plante entière et préoccupation agronomique : après avoir obtenu une bourse au concours de l'école

doctorale de l'Université Paris sud, j'ai choisi de faire ma thèse sur le « Rôle du nitrate sur le transfert de l'eau et des composés azotés du xylème de plantules de maïs et de blé » avec Eliane DELEENS au Laboratoire Structure et Métabolisme des Plantes, dirigé par Robert BOURDU puis par Jean-Louis PRIOUL, sur le campus d'Orsay. C'est ainsi au cours de cette thèse que je me suis intéressée pour la première fois au cycle de l'azote.

Mon sujet de thèse cherchait à comprendre le lien entre la fourniture d'azote aux racines et les flux d'eau dans la plante, dans le but d'avoir une meilleure compréhension des transferts de l'azote à l'échelle de la plante entière. D'un point de vue agronomique, ce travail répondait à un besoin d'une meilleure utilisation de la fertilisation azotée pour améliorer l'efficacité des épandages et limiter la perte des nitrates par les eaux de lixiviation. Nous avons mis en évidence que les caractéristiques de l'exsudation des variétés de blé Thésée et Soissons étaient liées aux rapports d'activité Nitrate Réductase *in vitro* foliaire et racinaire<sup>1</sup>. Une expérience de traçage par du KNO<sub>3</sub> enrichi en <sup>15</sup>N nous a permis d'obtenir une valeur de l'absorption totale de l'azote ainsi que sa répartition entre les compartiments foliaire et racinaire.

Au-delà de cette première immersion dans une thématique qui deviendra le fil conducteur de ma recherche, je retiens deux apports déterminants de cette expérience. Le premier apport concerne la manière d'appréhender une question scientifique avec des expériences en conditions contrôlées et des expériences *in situ* en conditions naturelles. Cette combinaison d'approches permet de tester des hypothèses sur les mécanismes en jeu dans les processus étudiés et de vérifier également leur pouvoir explicatif dans les conditions réelles. J'ai conservé aussi cette manière d'appréhender la réponse à des questions scientifiques dans la suite de ma carrière.

Le deuxième apport est ma formation à l'outil isotopique aussi bien au niveau des abondances naturelles qu'au niveau enrichi, grâce à Eliane DELEENS, spécialiste et précurseur de l'emploi des isotopes stables dans le domaine des plantes. J'ai continué grandement à utiliser cet outil dans la suite de ma carrière.

A la fin de ma thèse, toujours dans une perspective agronomique, j'ai souhaité me former à la génétique quantitative et j'ai intégré le Laboratoire du Moulon (UMR INRAE CNRS Univ à Orsay), pour travailler sur les « Quantitative Trait loci » (QTL) du métabolisme du carbone chez le maïs.

## 1.2 ATER et post-doc

A la station du Moulon, mon projet a consisté à positionner des gènes d'intérêt agronomique concernant le métabolisme du carbone sur la carte génétique du maïs en cours d'élaboration<sup>2</sup>. Il s'agissait de savoir si ces gènes étaient positionnés au même niveau que des zones dont l'analyse avait montré que leur polymorphisme moléculaire était associé aux variations de caractères quantitatifs. Cette expérience m'a permis de me former auprès de Sylvain SANTONI Ingénieur de Recherche, au travail avec de la radioactivité, et plus généralement de mieux comprendre le lien entre diversité génétique et variabilité phénotypique.

---

1 Barthes L, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul J-L. Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine synthetase inhibitors as tools. *J Exp Bot.* **1996**;47(4):485-495. <http://jxb.oxfordjournals.org/content/47/4/485>

2 Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahé A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL. Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol.* **1999**;39(2):373-380

J'ai obtenu par la suite un contrat post-doctoral au Laboratoire ESE avec Agnès RICOCH dans le cadre d'un projet Européen concernant l'amélioration génétique de cette plante horticole. Mon travail a consisté à mettre en évidence l'introgression d'un chromosome de Ciboule (*Allium fistulosum*) dans le génome de plants d'oignon (*Allium cepa*) grâce à la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH)<sup>3</sup>. Ce post-doc m'a permis d'acquérir des compétences en hybridation *in situ* et de compléter mes outils de caractérisation du génome en lien avec des caractères d'intérêt agronomique.

Ces deux expériences post-doctorales m'ont servi par la suite de support conceptuel et technique pour l'étude des liens entre la caractérisation moléculaire des entités microbiennes du cycle de l'azote, et les activités enzymatiques du sol en particulier lors de notre collaboration avec le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon.

Ainsi à la fin de cette période de formation par la recherche, j'ai acquis une expérience dans le métabolisme de l'azote et du carbone, ainsi qu'une expérience dans les domaines de la caractérisation moléculaire de la diversité génétique. Le travail sur différentes plantes (maïs, blé, oignon), à la paille, en laboratoire, en serre et au champ, dans différents laboratoires (INRA Grignon, Laboratoire SMP, Laboratoire du Moulon, Laboratoire ESE), et enfin mon expérience d'enseignement comme monitrice et ATER, m'ont permis de postuler au concours de maître de conférences à l'Université Paris-sud.

## 2. Mes activités de recherches depuis mon recrutement en tant que maître de conférences à l'Université Paris-Saclay : perspectives écologiques

Depuis mon recrutement en tant que maître de conférences au Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, mon activité de recherche est centrée sur les flux d'azote dans les écosystèmes, avec comme cadre de réflexion les changements globaux. Dans cette thématique générale de recherche, j'ai exploré plusieurs axes.

### 2.1 Mes travaux au sein de l'équipe Ecologie des Populations et de Communautés de l'ESE : les effets des changements globaux sur le cycle de l'azote

Dans un premier temps (période 1998-2010), j'ai travaillé au sein de l'équipe Ecologie des Populations et de Communautés de l'ESE. Au moment de mon recrutement, Paul LEADLEY venait également d'intégrer le Laboratoire en tant que Professeur et renouvelait les thématiques de l'équipe en introduisant les études sur le lien entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes. Au sein de cette équipe, et en étroite collaboration avec lui, mon rôle a été de comprendre comment les facteurs des changements globaux (CO<sub>2</sub>, température, eau, déposition azotée) et leurs interactions modifient les flux d'azote dans des écosystèmes prairiaux.

Ce travail m'a permis de co-encadrer le DEA et la thèse de Romain BARNARD (2000-2003), ainsi que le Master 2 et la thèse de Audrey NIBOYET (2005-2008).

Durant cette période, nous avons également travaillé avec Juliette BLOOR, en post-doc dans notre équipe sur la compétition arbre-herbacée.

---

<sup>3</sup>Barthes L, Ricoch a. Interspecific chromosomal rearrangements in monosomic addition lines of *Allium*. *Genome*. **2001**;44(5):929-935

## 2.2 Mes travaux au sein de l'équipe Ecophysiologie végétale de l'ESE : la dynamique des réserves azotées et carbonées dans le système arbre-sol-biomasse microbienne

En 2011, à la faveur d'une collaboration engagée en 2008 avec Stéphane BAZOT, j'ai intégré l'équipe d'Ecophysiologie végétale de l'ESE. Un des objectifs de cette équipe est l'étude des flux élémentaires dans les écosystèmes forestiers avec un effort particulier sur les flux de carbone. Au sein de cette équipe, j'ai travaillé sur la dynamique saisonnière des flux de carbone et d'azote avec Claire DAMESIN, Nicolas DELPIERRE et Eric DUFRENE. J'ai également co-encadré la thèse de Angélique GILSON avec Stéphane BAZOT et Eric DUFRENE et encadré trois stages de Master 1 (Shabnam TAHERI, Tania MAXWELL, Romain SHROEDER) et trois stages de Master 2 (Liliana PINEK, Baptiste LAFFONT, Mubarak MAHMUD).

Actuellement, je participe à l'encadrement de la thèse d'Aminu FANDA, dirigée par Stéphane Bazot et j'ai commencé depuis novembre 2020 l'encadrement de la thèse de Mubarak MAHMUD sur une thématique d'agroforesterie en collaboration avec les autres membres de l'équipe.

Mon parcours m'a conduit à placer le cycle de l'azote au cœur de ma problématique, en intégrant le fonctionnement de la biomasse microbienne du sol et les relations plante-sol-biomasse microbienne comme des agents clefs de la réponse des écosystèmes aux changements globaux.

Je vais maintenant présenter ma problématique générale de recherche en m'appuyant sur une analyse bibliographique posant le cadre conceptuel de mes études.

## Deuxième partie : problématique et état de l'art

Dans son livre, « Le défi alimentaire », Samuel Rebulard explique comment les changements des pratiques agricoles du XX<sup>ème</sup> siècle ont permis le recul des famines en Europe et son autosuffisance alimentaire à partir de 1970 (Rebulard 2018). En effet, parmi les innovations technologiques à l'origine de l'augmentation des rendements agricoles mondiaux pour les trois céréales majeures de l'alimentation humaine (blé, riz, maïs), les engrais minéraux de synthèse constituent l'innovation principale. Mais si ces nouvelles pratiques ont conduit à notre confort alimentaire, elles ont généré de nombreux problèmes environnementaux avec des incidences locales et globales.

Le procédé Haber-Bosch, est la source la plus importante de l'augmentation des pools d'azote réactif ( $100 \text{ Tg an}^{-1}$ ), viennent ensuite les cultures qui favorisent la fixation biologique ( $33 \text{ TgN an}^{-1}$ ) et la combustion ( $25 \text{ TgN an}^{-1}$ ) (Galloway et al., 2003). 85 % du nitrate d'ammonium produit par le procédé Haber-Bosch est destiné à la fertilisation (Galloway et al., 2003). Les trois problèmes majeurs liés à l'emploi massifs des engrais sont les suivants. Le premier est la pollution des nappes phréatiques par les nitrates, les rendant impropres à la consommation au-delà d'un seuil fixé à  $50 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ . Le deuxième est l'augmentation de la concentration en  $\text{N}_2\text{O}$  dans l'atmosphère qui est un gaz ayant un pouvoir réchauffant 300 fois plus puissant que le  $\text{CO}_2$  et qui est un destructeur de l'ozone de la haute atmosphère. Enfin le troisième problème est l'eutrophisation et l'acidification globale des milieux portant atteintes aux équilibres au sein de la biodiversité. **Ces pollutions remettent en cause nos pratiques et questionnent les adaptations que notre agriculture doit mettre en place pour arrêter ces nuisances tout en garantissant l'autosuffisance alimentaire.**

Aux modifications du cycle de l'azote engendrées par l'emploi massif d'engrais s'ajoutent les modifications du cycle du carbone, liées à la combustion des gaz fossiles. **Ainsi on observe depuis le début de l'ère industrielle, une augmentation des concentrations en  $\text{CO}_2$  et en oxydes d'azote dans l'atmosphère qui s'accompagne d'une élévation de la température moyenne globale, d'une modification du régime des précipitations, d'une augmentation de la déposition azotée d'origine atmosphérique et d'une augmentation de la fréquence des feux (IPPC 2007 ; IPCC 2014).** Les caractéristiques de ces changements globaux sont largement présentées dans les rapports du GIEC : on peut retenir que la concentration actuelle en  $\text{CO}_2$  est de 410 ppm alors qu'elle était de 379 ppm en 2005 et 280 ppm en 1750 (IPPC 2007) ; que la température augmente de  $0,2^\circ\text{C}$  par décennie (IPCC 2018) ; que les dépositions azotées bien que connaissant une décroissance ont augmenté de  $15 \text{ Tg N ha}^{-1}$  à  $165 \text{ Tg N an}^{-1}$  (Galloway et al. 2004) représentant des apports de 5 à plus de  $60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$  en Europe (Dise et al. 2009; Dise et Wright 1995).

**A ce titre, comprendre comment les écosystèmes répondent à ces nouvelles conditions de l'environnement global est important pour anticiper le comportement futur des écosystèmes et leur capacité à atténuer ou renforcer ces changements.** A ce titre comprendre **comment le cycle de l'azote est modifié par les changements globaux est crucial** en raison de son implication dans la productivité des écosystèmes et dans leur capacité de stockage du carbone ainsi que dans les différentes pollutions environnementales précitées.

Par exemple, **la réponse des forêts aux changements globaux est déterminante** dans cette problématique générale en raison de leur importance dans le stock mondial de carbone terrestre, leur échange de  $\text{CO}_2$  avec l'atmosphère et leur rôle dans les transferts de carbone dans les sols où la majorité du carbone est stockée. **Or, pour comprendre la capacité des forêts à limiter ou renforcer ces changements, l'étude de l'absorption d'azote et de la mise en place des réserves est majeure, celles-ci étant des fonctions déterminantes de la croissance et de la survie de ces forêts.** Dans ce

cadre nous sommes intéressées aux flux de C et N dans le système arbre-sol-biomasse microbienne en étudiant la constitution des réserves azotées et carbonées des arbres, les flux de C vers le sol, les flux de N au sein de l'arbre et de la biomasse microbienne, en nous appuyant sur le modèle chêne.

Par ailleurs, cette question se décline dans d'autres écosystèmes : nous avons ainsi choisi d'aborder cette question au travers de l'étude de **l'impact des changements globaux sur les activités microbiennes de nitrification et dénitrification sous des couverts herbacés et en prairies ainsi que sur la compétition arbre-herbacées**. En effet comprendre comment le cycle de l'azote dans les prairies se comporte sous l'influence des changements globaux est important à plusieurs titres. Les prairies sont le type d'habitat le plus répandu sur la surface émergée du globe et représentent plus de 40 % de la surface agricole européenne (Peyraud et al. 2012). Le sol des prairies représente un stock d'azote très important avec une valeur de  $6\ 500\ \text{kg N ha}^{-1}$  (Galloway et al. 2003). De plus, de nombreuses activités agricoles reposent sur l'utilisation de prairies, que ce soit pour la production de foin (prairies de fauche) ou pour faire paître les animaux (prairies de pâturage). Les prairies sont également un réservoir de biodiversité important (Habel et al. 2013). La manière dont les prairies sont colonisées par les ligneux va également orienter la succession végétale et modifier les paysages. Les prairies ont donc une importance écologique et économique. **Ainsi, les prairies sont également des écosystèmes importants à étudier en raison des conséquences du changement global sur le cycle de l'azote, de leur importante surface à l'échelle de la planète et de la richesse en azote de leur sol.**

Finalement, l'étude du cycle de l'azote est incontournable d'une part pour comprendre un des facteurs déterminants des changements globaux, et d'autre part pour comprendre la réaction des écosystèmes à ces changements.

A des fins didactiques, nous présenterons cette thématique générale en deux temps : dans un premier temps, il s'agit de comprendre **les flux internes de l'azote dans les plantes herbacées et les arbres forestiers** (Section I). Ceci est un préalable nécessaire, notamment pour comprendre la fonction de puits de carbone des forêts. Ensuite, **nous nous focaliserons sur le cycle de l'azote, afin de comprendre comment celui-ci est impacté par les changements globaux** (Section II).

## Section I : Les flux internes d'azote dans les plantes herbacées et les arbres forestiers

Dans cette section, nous nous intéressons aux flux d'azote dans les plantes (1) et au fonctionnement des arbres forestiers (2), indépendamment de la question de leur réaction aux changements globaux.

### 1. Absorption de l'azote par les plantes

#### 1.1 Physiologie de l'absorption

L'azote est essentiellement prélevé dans le sol où il est absorbé par les racines grâce à la présence de transporteurs spécifiques au nitrate (Forde 2000; Tsay et al. 2007) et à l'ammonium (Howitt and Udvardi 2000), les deux molécules azotées minérales prédominantes du sol. Ces transporteurs peuvent être constitutifs ou inductibles, de haute affinité ou à faible affinité. Les transporteurs à forte affinité (HATS) sont saturables et opèrent aux concentrations inférieures à 100  $\mu\text{M}$ , les transporteurs à faible affinité sont mobilisés pour les concentrations supérieures de l'ordre du mM (Castro-Rodríguez et al. 2017). L'absorption de nitrate se réalise contre son gradient électrochimique grâce à un transport actif secondaire s'accompagnant d'une consommation d'énergie et d'une alcalinisation du milieu. L'absorption de l'ion ammonium se fait généralement dans le sens de son gradient électrochimique et s'accompagne d'une acidification du milieu, l'incorporation d'un ion chargé positivement étant compensé par la sortie d'un proton (Morot-Gaudry 1997).

Il a été mis également en évidence dans les racines des **transporteurs à acides aminés** qui indiquent la capacité des racines à absorber des acides aminés dans le sol (Näsholm et al. 2009). Cette capacité serait particulièrement importante pour les arbres poussant naturellement dans des milieux pauvres où la minéralisation est faible (Scott and Rothstein 2011). Schimel and Bennett (2004) ont proposé que la forme prédominante de N disponible pour les plantes passe de l'azote organique, à l'ammonium  $\text{NH}_4^+$  et au nitrate  $\text{NO}_3^-$  à fur et à mesure que le taux global de cycle de l'azote d'un habitat augmente (Schimel and Bennett 2004).

#### 1.2 L'adaptabilité de l'absorption et de la croissance des racines aux besoins des plantes et à la disponibilité en azote dans le sol

L'absorption de nitrate est d'autant plus forte que sa concentration dans le milieu extérieur est élevée (Shenk 1996). On observe également que l'absorption à une concentration donnée est d'autant plus élevée que la plante a été privée de nitrate auparavant (Touraine 2000). Des dispositifs de split root (système racinaire séparé en deux) ont également permis de montrer que l'absorption dans une zone du système racinaire dépend de la quantité déjà absorbée par ailleurs (Morot-Gaudry 1997). Ainsi le statut azoté de la plante pilote l'absorption : une plante carencée absorbe plus d'azote qu'une plante dont la nutrition azotée a été satisfaite auparavant. Cela indique que le nombre ou l'efficacité des transporteurs présents (constitutifs ou induits) dépend de l'état de « carence » de la plante. La plante est capable de synthétiser d'autant plus de transporteurs qu'elle en a besoin, les produits de l'assimilation du nitrate exerçant une rétroaction négative sur leur absorption (Imsande and Touraine 1994).

**La croissance locale ou globale du système racinaire s'adapte à la disponibilité locale ou globale en nutriments.** Ainsi quand le nitrate est apporté dans une zone précise du système racinaire, on peut observer une stimulation locale de la croissance des racines latérales indiquant que le nitrate peut agir comme un signal et pas uniquement comme un nutriment (Guo et al. 2005). L'emploi d'inhibiteur à l'action de l'auxine et de mutants montrent que cet effet positif de la présence locale de nitrate se réalisait en interaction avec l'auxine. Par contre, à l'échelle globale, dans les milieux riches en nutriments, la croissance aérienne est privilégiée à la croissance racinaire conduisant à des rapports de biomasse racinaire / biomasse aérienne plus fort en milieu riche que pauvre (Chapin III 1980). Ces facultés d'adaptation de la croissance du système racinaire correspondent à des adaptations à l'hétérogénéité de la distribution et de la disponibilité en azote dans le milieu.

### 1.3 La contribution des symbioses bactériennes fixatrices et mycorhiziennes à l'absorption de l'azote

Des associations symbiotiques avec des micro-organismes du sol facilitant la nutrition minérale ont été sélectionnées au cours de l'évolution.

**Les bactéries fixatrices de diazote atmosphérique** grâce à leur nitrogénase permettent la fixation du  $N_2$  en ammonium au sein de la nodosité racinaire, rendant accessible aux plantes une nouvelle source d'azote. Cette symbiose est très bien documentée dans la littérature concernant les Fabacées herbacées et un peu moins sur les arbres fixateurs (Dommergues et al. 1999). La mise en place de la symbiose est inhibée par la présence d'un milieu riche en azote (van Noorden et al. 2016).

**Le réseau mycélien contribue également à l'absorption de molécules azotées.** 85% des familles botaniques sont mycorhizées par des endomycorhizes et 100% des arbres sont en plus colonisées par des ectomycorhizes (Selosse 2000). L'extension du réseau mycélien, favorisée par le faible diamètre des hyphes (de 5 à 10  $\mu m$  chez la plupart des espèces), permet d'assurer une surface maximale de contact entre le champignon et le milieu. Le diamètre des hyphes mycélium est du même ordre de grandeur que le diamètre des poils absorbants (12-15  $\mu m$ ) mais ils se développent sur une longueur bien plus grande. Ainsi, chez l'arbre, cet ensemble d'hyphes peut augmenter d'un facteur mille la capacité racinaire. Les champignons mycorhiziens sont très abondants dans certains sols, où leur mycélium représente en moyenne entre 20 et 30 % de la biomasse microbienne totale du sol (Leake et al. 2004). Les mycorhizes facilitent la nutrition hydrominérale des plantes en échange de carbone organique. Les mycorhizes dérivent à ce titre 5 à 10% du carbone fixé par la photosynthèse (Bryla and Eissenstat 2005; Hodge and Storer 2015).

Les deux types de mycorhizes ont un fonctionnement différent. Les ectomycorhizes, qui sont spécifiques aux espèces arbustives ou arborées, produisent des exo-enzymes qui dégradent la matière organique du sol mettant alors à disposition des plantes l'azote minéral issu de cette dégradation. Jusqu'à récemment, on pensait que les endomycorhizes, qui ne présentent pas cette capacité d'excrétion d'enzymes saprophytiques, étaient sous la dépendance de l'azote minéral du sol et qu'elles ne contribuaient pas à la nutrition azotée des plantes (Thomas et al. 2009). Maintenant on sait que ce n'est pas le cas et qu'elles peuvent acquérir de l'azote à la fois à partir de sources organique et minérale et en transférer une partie aux racines (Hodge and Storer 2015). La faible contribution des endomycorhizes à la nutrition azotée des plantes est à comprendre eu égard à leur forte concentration en azote (3-5% vs <1% bois aérien des plantes) et à leur pouvoir compétitif vis à vis de leur hôte (Hodge and Fitter 2010). La disponibilité en azote du milieu modifie la prédominance du type de mycorhizes présent en milieu forestier : Lilleskov et al., 2019 rapportent que les forts niveaux de déposition azotée pourraient faire disparaître certaines espèces ou genres d'ectomycorhizes ce qui réduirait l'accès à l'azote organique et diminuerait la décomposition de la matière organique. Les ectomycorhizes des

conifères étant plus sensibles que celles des arbres décidus avec des seuils critiques de 5 à 6kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> pour les premiers et de 10 à 20 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> pour les deuxièmes (Lilleskov et al. 2019).

#### 1.4 L'absorption par les feuilles

Si l'appareil souterrain est le lieu privilégié de l'absorption de l'azote, **les feuilles via leurs stomates ont également la capacité d'absorber de l'azote d'origine atmosphérique** (Sparks 2009). La contribution de l'absorption des molécules azotées par les feuilles peut être particulièrement importante dans le cadre de l'impact des dépôts d'origine atmosphérique. Cette capacité est utilisée en agriculture comme moyen de fertiliser et en situation expérimentale pour marquer l'azote des feuilles. Comparativement à l'absorption et à l'assimilation de l'azote par les racines, l'absorption et l'assimilation foliaire d'azote ont des répercussions sur la distribution et l'allocation des composés azotés entre les feuilles et les racines en faveur de l'appareil aérien (Rennenberg and Dannenmann 2015).

#### 1.5 Phénologie de l'absorption

**Chez les arbres l'absorption d'azote par les racines est programmée en fonction des saisons** (Li et al. 2016). Elle dépend non seulement des interactions avec l'état azoté interne, mais aussi des conditions environnementales comme la lumière, la disponibilité en azote et la température (Imsande and Touraine 1994 ; Gessler et al. 1998 ; Dong et al. 2002 ; Simon et al. 2017) ou d'autres conditions environnementales comme l'humidité (Maxwell et al. 2020).

Au début du printemps, l'absorption serait faible en lien avec la température du sol plus basse que celle de l'air qui pourrait limiter la croissance des racines et les activités microbiennes (Biederbeck and Campbell 1973; Sarathchandra et al. 1989; Zak et al. 1999), ce qui explique un ralentissement du renouvellement de l'azote au printemps (Nicolardot et al. 1994).

Puis cette capacité augmenterait en été comme cela a été mis en évidence par des expériences marquage au <sup>15</sup>N de différentes molécules azotées sur de jeunes plantules de trois espèces d'arbres (Erable sycomore, Erable sycomore, Hêtre) (Li et al. 2016).

Les saisons privilégiées d'absorption dépendent également des zones bioclimatiques considérées puisque (Silla and Escudero 2003) montrent chez trois espèces méditerranéennes de chêne que l'absorption de l'azote se réalise essentiellement durant quelques mois à partir de la fin de l'hiver et au printemps.

L'automne est aussi identifié comme une saison présentant une absorption active d'azote (Millard and Grelet 2010; Millard and Neilsen 1989; Millard and Proe 1991) contribuant de manière significative au remplissage des réserves.

L'absorption de nitrate est également possible en hiver : Ueda et al 2010 ont montré avec un marquage au <sup>15</sup>NO<sub>3</sub> et des mesures d'activité nitrate réductase sur *Quercus serrata*, que les jeunes arbres pouvait absorber et assimiler du nitrate au cœur de l'hiver (Ueda et al. 2010).

## 2. Le fonctionnement azoté et carboné des arbres

Les **forêts renferment 40% du stock mondial de carbone** (hors océan) et **73% du C contenu dans la biomasse terrestre** (GIEC, 2001 ; Figure 1). Elle constitue ainsi le stock de carbone terrestre le plus important. Ce stock est si important, **qu'une modification même minime, des flux de C entre les écosystèmes forestiers et l'atmosphère peut avoir des répercussions importantes sur la concentration en CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Comprendre comment cette biomasse se constitue et quels sont les facteurs qui jouent sur l'intensité des flux d'échanges de carbone avec l'atmosphère est**

**l'objet de nombreuses études et est au cœur de l'activité scientifique de nombreuses équipes scientifiques dont l'équipe d'Ecophysiologie végétale au Laboratoire ESE.**

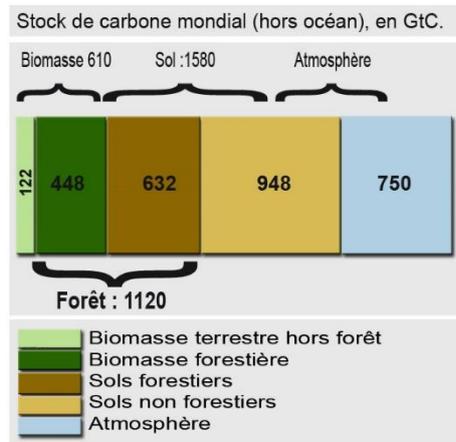


Figure 1 : Stock de carbone mondial (hors océan)

**La biomasse des arbres constitue 40% du carbone des forêts et leur croissance dépend de la disponibilité de l'azote dans les sols.** On comprend l'importance de la connaissance de la physiologie de l'arbre et du fonctionnement de la microflore du sol pour essayer d'anticiper le comportement des forêts dans les conditions actuelles et futures.

Les flux qui correspondent à ces échanges sont à considérer à deux échelles, celle de l'arbre et celle du système arbre sol. A l'échelle de l'arbre, il s'agit de la photosynthèse et de la respiration dont le bilan conditionne la croissance, la productivité primaire et la quantité de C stockée dans la biomasse. A l'échelle du système arbre sol, il faut envisager le transfert de C dans le sol via la rhizodéposition et les litières foliaires, racinaires et de branches ou tronc, et son immobilisation plus ou moins longue dans la matière organique du sol, où son déstockage est le fruit de la minéralisation microbienne.

### 2.1 La baisse de productivité à l'âge du peuplement, un lien avec l'azote ?

Au cours du vieillissement des forêts, on observe une baisse de leur productivité (Pregitzer and Euskirchen 2004 ; DeLucia et al. 2007) dont les causes restent encore assez débattues : des études montrent une diminution de la photosynthèse foliaire avec l'âge (Bond 2000), d'autres auteurs invoquent une diminution de la conductance stomatique pour répondre à des contraintes hydrauliques (Drake et al. 2010) ou une diminution de la disponibilité en nutriments dans le sol (Vitousek et al. 1989).

### 2.2 La mise en place des réserves azotées et carbonées, une fonction majeure pour la croissance des arbres

En milieu tempéré, **les saisons imposent des contraintes** particulières aux espèces pérennes qui voient leur métabolisme ralentir pendant l'hiver et leur **croissance repartir au printemps en partie grâce aux réserves carbonées et azotées** emmagasinées durant la ou les saisons de végétation précédente(s). **La constitution de ces réserves est donc fondamentale pour la survie durant l'hiver et la reprise de la croissance au printemps.**

Chez le Chêne sessile, la dynamique saisonnière des concentrations en composés de réserves carbonées et azotées a été étudiée à différents âges : vers 20 ans (Nunez et al. 2011), vers 40 - 45 ans

(Barbaroux et al. 2003; Nuñez et al. 2010), à 50 ans (El Zein et al. 2011) et sur une chronoséquence d'arbres âgés de 30 à 134 ans (Genet et al. 2010) ou des arbres de 100 ans (Hoch et al. 2003) mais uniquement pour les réserves carbonées et uniquement pour les parties aériennes pour ce dernier.

Ces études basées sur des comparaisons à deux ou quatre dates clés de la phénologie au cours de l'année de concentrations en composés carbonés non structuraux (amidon et sucres solubles) et les composés azotés non structuraux (protéines solubles et acides aminés) (Barbaroux et al. 2003 ; Valenzuela Nunez 2006 ; Nunez et al. 2011) montrent globalement la même dynamique saisonnière, à savoir une diminution de la concentration des composés carbonés et azotés non structuraux dans les tissus pérennes de l'arbre entre l'automne et le printemps, témoignant d'une remobilisation printanière, puis augmentation de leur concentration entre le printemps et l'automne, témoignant de la constitution de nouvelles réserves durant la saison de végétation (Tableau 1 : Quelques repères bibliographiques concernant les réserves azotées et carbonées chez les arbres

Tableau 1 : Quelques repères bibliographiques concernant les réserves azotées et carbonées chez les arbres

Références	âge	dates prélèvements	Compartiments mesurés	Composés mesurés
Barbaroux et al. 2003	45 ans	Octobre 1999 Juin 2000	Tronc, branches, racines fines (diamètre $\varnothing < 2$ mm), racines moyennes ( $\varnothing = 2-5$ mm) et grosses racines ( $\varnothing > 5$ mm).	Composés carbonés non structuraux
Valenzuela Nunez et al., 2011	20 ans	Octobre 2001 Juin 2002	Branches Aubier à différentes hauteurs du tronc Grosses racines	Composés carbonés non structuraux ; Protéines solubles avec caractérisation SDS page ; nitrate
El Zein et al., 2011 b	50-55 ans	Tous les mois d'octobre 2007 à octobre 2008	Aubier	Composés carbonés et azotés non structuraux
Genet et al., 2010	30 à 134 ans	Mai 2006 Octobre 2006	Tronc à 1.30 (1.3 m) et grosses racines.	Composés carbonés non structuraux
Hoch et al., 2003	100 ans	22-24 June 1999, 17-19 August 1999, 1-2 October 1999, 13-14 April 2000 and 1 March 2002	1) Feuilles (2) Xylème des branches entre 0.5 and 1 cm; (3) Xylème du tronc à 1.3 m	Composés carbonés non structuraux

→ L'étude **du fonctionnement des forêts est donc un enjeu majeur** pour évaluer leur capacité de séquestration du carbone et ainsi contribuer à la mitigation de l'impact des changements globaux.

\*\*\*

## Section II : Le cycle de l'azote au cœur du fonctionnement des écosystèmes et ses réponses aux changements globaux

Nous avons présenté les flux d'azote dans les plantes et les arbres.

Ce préalable permet à présent d'analyser la réaction du cycle de l'azote dans les écosystèmes en interaction avec les changements globaux. Cette thématique se décline dans ma recherche en deux axes principaux :

- la disponibilité de l'azote dans les sols et son impact sur la croissance des plantes en interaction avec les changements globaux (1)
- l'importance des activités microbiennes du cycle de l'azote dans la réponse des écosystèmes aux changements globaux (2).

### 1. La disponibilité de l'azote dans les sols et son impact sur la croissance des plantes en interaction avec les changements globaux

L'azote dans le sol est un mélange complexe de molécules organiques et inorganiques dont les concentrations varient suivant les jours et les saisons et sont caractérisées par une distribution hétérogène (Miller and Cramer 2005). La quantité totale d'azote dans le sol est habituellement considérée comme étant voisine de 1 g N par kilogramme de sol sec (Heller et al. 2004) avec une grande variabilité suivant les écosystèmes (Tableau 2 : Contenu en azote dans différents types d'écosystème. Les sols des prairies sont ceux qui contiennent le plus d'azote dans les premiers 20 cm du sol : Galloway et al 2003 retiennent une valeur de 6 500 kg N ha<sup>-1</sup> dans les sols prairiaux contre 4 000kg N ha<sup>-1</sup> pour les sols cultivés et 5 000 kg ha<sup>-1</sup> pour les sols forestiers. La fraction organique représente de 0.1 à 50% de l'azote total (Miller and Cramer 2005) et souvent la fraction minérale N, sous la forme de nitrate et ammonium, représente seulement à 1 à 2% de l'azote présent (Heller et al. 2004). Des expériences de marquage au <sup>15</sup>N des pools de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dans les sols prairiaux révèlent que ces pools sont très dynamiques avec un *turn over* de 1 jour pour l'ammonium et inférieur pour le nitrate qui est consommé aussitôt produit (Jackson et al. 1989).

La faible disponibilité en azote dans les sols conduit à une utilisation massive d'engrais pour optimiser les rendements. A titre d'exemple dans le bassin parisien, en agriculture conventionnelle les agriculteurs ajoutent jusqu'à 250 kg N ha<sup>-1</sup> sur leur culture de blé (Billen et al. 2007). Le nitrate, en raison de sa charge négative est peu retenu par le complexe argilo-humique du sol et est facilement entraîné dans les eaux de lixiviation (Billen et al. 2007).

Tableau 2 : Contenu en azote dans différents types d'écosystèmes

Type de sols	Contenu en azote	Références
Sols forestiers	Azote total : 5000 kgN ha <sup>-1</sup> 4 à 12 tonnes ha <sup>-1</sup> 1 à 16 tonnes ha <sup>-1</sup>  Ammonium : 2 mM ; 0.5-3 mM  Nitrate : très faible voir nul 0.5-3.5 mM	Galloway et al., 2003 Marty et al 2017 Ponette et al., 1997  (Britto and Kronzucker, 2002) in Miller and Cramer 2004  Farley and Fitter 1999

Sols agricoles	Azote total: 4000 kgN ha <sup>-1</sup> Nitrate : 1 to 5 mM Ammonium : 20 and 200 μM en moyenne mais peut atteindre 20 mM dans certains sols agricoles	Galloway et al., 2003 Miller and Cramer 2004  (Owen and Jones, 2001)(Britto and Kronzucker, 2002)
Sol prairiaux	Azote total: 6500 kgN ha <sup>-1</sup> Ammonium : 11-140 mgN m <sup>-2</sup> Nitrate : 0 -2 ± 1 mgNm <sup>-2</sup> m <sup>-2</sup>	Galloway et al., 2003 (Jackson et al. 1998)

La distribution des molécules azotées assimilables par les plantes est **hétérogène dans le sol**, concentrée dans les horizons superficiels et dans des patchs de nutriments (Farley and Fitter 1999) en liaison avec les apports de matière organique dans les sols. La profondeur d'enracinement et l'architecture du système racinaire ainsi que la vitesse de diffusion dans le sol vont être importantes pour l'accès à ces ressources.

Elle est également **discontinue dans le temps**, en lien avec les variations de conditions environnementales (disponibilité en matière organique, température, humidité)(Conant et al. 2011), les prélèvements racinaires et des activités microbiennes du sol. Les apports saisonniers de carbone dans le sol par l'arbre agissent sur la biomasse microbienne du sol et participent à la saisonnalité de la décomposition de la matière organique du sol (Kaiser et al. 2010). Néanmoins, les évolutions saisonnières des concentrations en nitrate et ammonium dans le sol sont peu reproductibles d'une année à l'autre (Farley and Fitter 1999).

En dehors de tout apport par fertilisation ou déposition azotée, la disponibilité en azote minéral dans le sol pour les plantes va dépendre de l'équilibre entre la minéralisation de la matière organique du sol liée aux activités oxydantes des bactéries et aux champignons qui libèrent des éléments minéraux et l'immobilisation microbienne qui incorpore également de l'azote dans sa biomasse (Hodge et al. 2000). Cet équilibre dépend du ratio C/N de la matière organique et également de la composition de la microflore minéralisatrice, en particulier du ratio Champignon/Bactéries (Hodge et al. 2000). Les activités microbiennes étant fortement dépendantes de la température et de l'humidité du sol, la disponibilité de l'azote pour les plantes va dépendre des conditions environnementales et va varier au cours des saisons et selon les années.

La croissance de la végétation, est limitée par un ensemble de nutriments, et plus particulièrement en milieu tempéré par l'azote (Dickson 1989 ; Vicca et al. 2012 ; Xu et al. 2012 ; Rennenberg and Dannenmann 2015). En effet, l'azote est le 4<sup>ème</sup> élément constituant la matière organique (LeBauer and Treseder 2008) où il est intégré dans les acides aminés, les acides nucléiques et certains composés du métabolisme secondaire, en particulier la chlorophylle ou des hormones végétales. Les interactions entre le métabolisme du carbone et celui de l'azote sont nombreuses au sein des plantes (Foyer et al. 2001). On peut retenir que **l'azote est nécessaire à la fixation du CO<sub>2</sub>** : l'assimilation du C mobilise une part importante de son stock d'azote qui est fortement investi dans son appareil photosynthétique. Les feuilles des jeunes arbres peuvent contenir 50% de l'azote total de l'arbre (Dickson 1989) et chez les plantes à métabolisme C<sub>3</sub> environ 75% de l'azote foliaire sont investis dans l'appareil photosynthétique (Chapin et al. 1987) avec la Rubisco qui peut représenter jusqu'à 65 % des protéines solubles foliaires (Ellis 1979).

**La limitation de la croissance des plantes par l'azote pourrait être renforcée par les changements globaux** : une croissance accrue due à l'augmentation du CO<sub>2</sub> augmenterait la demande des plantes en azote minéral, et augmenterait également la séquestration de l'azote dans la biomasse des plantes et la matière organique du sol (Luo et al. 2004). De plus, les apports accrus de carbone dans le sol, via

l'exsudation racinaire et les litières foliaires et racinaires tendrait à augmenter la demande microbienne en azote minéral diminuant la disponibilité en azote pour les plantes (Diaz et al. 1993; Luo et al. 2004). Ces effets pourraient donc augmenter la limitation de l'azote dans des conditions d'augmentation du CO<sub>2</sub>, produisant une diminution dans le temps de la force de la rétroaction entre les écosystèmes terrestres et le CO<sub>2</sub> atmosphérique (Hungate et al. 2003; Luo et al. 2004 ; Reich et al. 2006).

Néanmoins l'augmentation des **dépôts azotés d'origine atmosphérique apporte de l'azote supplémentaire qui pourrait lever une partie de cette limitation**. Ces dépositions azotées ont été identifiées comme le principal facteur d'augmentation de la croissance au 20<sup>ème</sup> siècle (Vries et al. 2006; Vries et al. 2009 ; Högberg 2007 ; Magnani et al. 2007 ; Fowler et al. 2013 ; Maes et al. 2019). Ils peuvent également diminuer la croissance dans les régions où les charges critiques d'azote sont dépassées (Aber 1992; Bobbink et al. 2010 ; Sutton et al. 2014). De même, les apports supplémentaires de matière organique facilement décomposable attendue sous fort CO<sub>2</sub> pourrait également favoriser la minéralisation de la matière organique récalcitrante au travers du mécanisme du « priming effect » (Fontaine et al. 2004; Fontaine et al. 2003) et de l'attraction des prédateurs de la biomasse microbienne (Raynaud et al. 2006) et augmenter la disponibilité en azote minéral pour les plantes. Ainsi il a été observé que l'ammonification pouvait être favorisée par la présence de racines (Bergeron et al. 2011) et par les rhizodépôts associés (Shahzad et al. 2015).

Comme la disponibilité en azote est généralement faible, distribuée de manière hétérogène dans les sols et discontinue dans le temps, les plantes ont acquis diverses stratégies pour assurer leur nutrition azotée. La capacité à prélever différentes sources de molécules azotées, l'adaptabilité de la croissance du système racinaire à la disponibilité en azote, l'architecture du système racinaire, et l'efficacité du stockage et du recyclage interne chez les arbres sont des points stratégiques de la sélection des plantes herbacées et des arbres (Rennenberg et Schmidt 2010).

**→ Ainsi, il est important de comprendre les stratégies des plantes pour acquérir l'azote dans le sol, la manière dont les microorganismes facilitent ou limitent l'absorption de l'azote par les plantes et comment les changements globaux et les saisons vont intervenir sur ces processus.**

## 2. Importance des activités microbiennes du cycle de l'azote dans la réponse aux changements globaux

Les interconvections naturelles entre le diazote inerte et les composés azotés réactifs, hormis celle liées à la combustion et aux éclairs, sont réalisées *via* les activités microbiennes (Stein and Klotz 2016). L'ensemble de ces flux peuvent contribuer aux changements globaux, être modifiés par eux et avoir des répercussions sur leur évolution. Examinons dans un premier temps l'ensemble de ces flux (2.1), puis les méthodes utilisées pour les caractériser (2.2) et enfin la manière dont les activités microbiennes du cycle de l'azote répondent aux fortes teneur en CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère (2.3) et aux autres facteurs du changement global (2.4)

### 2.1 Les principaux flux du cycle de l'azote

Quatre flux naturels sont généralement considérés comme majeurs dans ce cycle : la fixation biologique du N<sub>2</sub> atmosphérique, l'ammonification qui correspond à la production d'ammonium et à l'étape terminale de la minéralisation aérobie de la matière organique, la nitrification qui correspond

à l'oxydation de l'ammonium en nitrate et enfin la dénitrification. D'autres processus microbiens ont également été mis en évidence plus récemment comme l'ANAMOX (ANaréobic AMmonium OXdation) en milieu marin par des bactéries du groupe des *Brocadiceae* (Stein and Klotz 2016) ou la DNRA Dissimilatory Nitrite reduction to Ammonium) qui est réalisée par les bactéries, les archées et les champignons dans les habitats anoxiques (Stein and Klotz 2016). Ces deux flux ne sont pas considérés dans la suite de cette étude.

A ces flux naturels s'ajoutent les flux d'origine anthropique, en particulier ceux liés au processus d'Haber Bosch (production de de nitrate d'ammonium pour la fabrication d'engrais et les explosifs) et les flux de  $N_2O$  liés au processus de combustion, qui se répercutent en cascade sur les autres flux (Galloway et al. 2004). Examinons plus précisément ces flux (Figure 2 : Représentation flux dans notre schéma fonctionnel du cycle de l'azote).

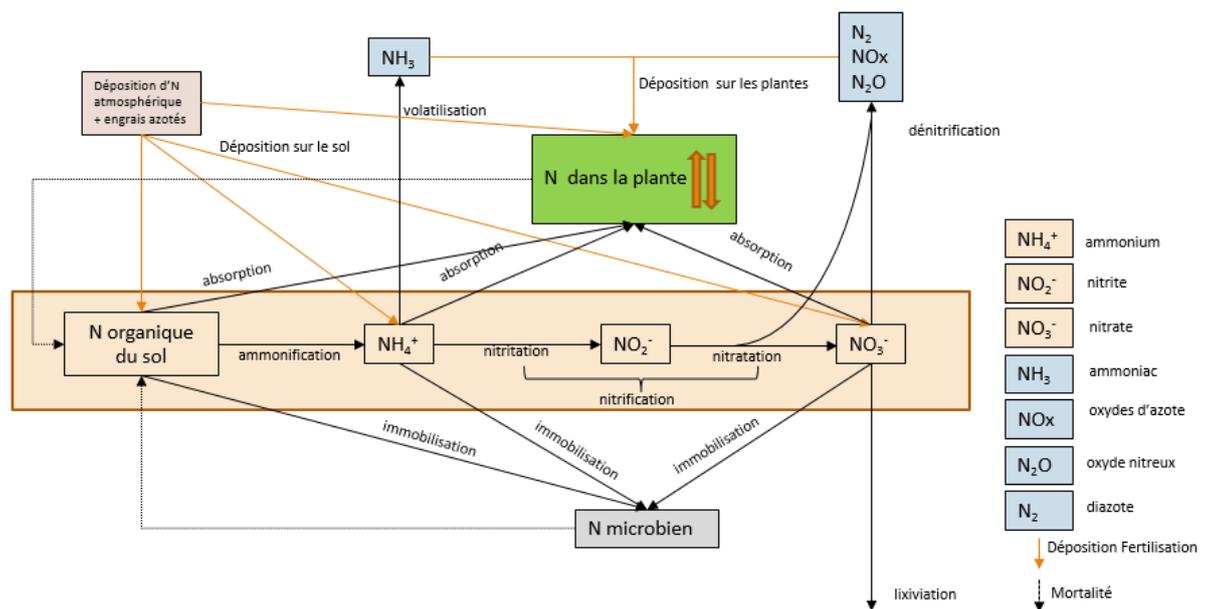


Figure 2 : Représentation flux dans notre schéma fonctionnel du cycle de l'azote

### ❖ La fixation du diazote

La fixation du diazote est le fait de bactéries symbiotiques, du genre *Rhizobium* ou *Bradirhizobium* chez les *Rhizobiaceae* qui vivent en symbiose avec les *Fabaceae* ou bien des bactéries du genre *Frankia* chez les actinomycètes qui vivent en symbiose avec les Aulnes. La fixation biologique peut également être le fait de cyanobactéries, qui peuvent être importantes pour la fertilisation naturelle des rizières ou d'autres bactéries libres des sols comme *Azotobacter*.

Les estimations actuelles suggèrent que la fixation biologique de l'azote est de l'ordre de 300 Tg d'azote par an (Kuypers et al. 2018) avec une augmentation de 33 Tg d'azote par an de  $N_r$  sur la planète (Galloway et al. 2003) liée à l'augmentation des surfaces agricoles mobilisant la fixation biologique. Combinée à une fixation industrielle de l'azote de 125 Tg d'azote par an, la production totale de  $N_r$  dépasse la production de dinitrogène gazeux par dénitrification ou anamox (350 Tg d'azote par an) (Kuypers et al. 2018).

### ❖ *La production d'ammonium au cours de l'ammonification ; minéralisation versus immobilisation*

La production d'ammonium dans les sols est liée aux bactéries et aux champignons qui minéralisent la matière organique du sol. L'ammonification est la dernière étape de cette minéralisation. C'est un processus aérobie, hétérotrophe pour le carbone qui s'accompagne d'un dégagement de CO<sub>2</sub> et d'une production nette d'ammonium si l'immobilisation microbienne ne compense pas l'ammonification brute (Hodge et al. 2000).

La minéralisation primaire correspond à l'oxydation de la matière organique facilement décomposable issue généralement des litières foliaires et racinaires récentes et des rhizodépôts. La minéralisation secondaire correspond à l'oxydation de la matière organique plus récalcitrante issue de l'humification ou de matière organique difficilement dégradable. L'apport de matière organique facilement décomposable favorise la minéralisation de la matière organique récalcitrante au travers du mécanisme du « priming effect » (Fontaine et al. 2003 ; Fontaine et al. 2004). Ainsi l'ammonification est favorisée par la présence de racines (Bradley and Fyles 1995 ; Ehrenfeld et al. 1997 ; Bergeron et al. 2011) et par les rhizodépôts associés (Shahzad et al. 2015). Une partie de la matière organique attaquée par les microorganismes est intégrée dans la biomasse microbienne où elle est immobilisée.

L'équilibre entre la minéralisation et l'immobilisation de l'azote dépend du ratio C/N de la matière organique et également de la composition de la microflore minéralisatrice, en particulier du ratio Champignon /Bactéries (Hodge et al. 2000). En effet en raison de leur quotient respiratoire et de leur composition biochimique différents, les champignons ont un C/N de 15 alors que celui des bactéries est de 5 ce qui modifie les relations stœchiométriques avec la matière organique et l'équilibre immobilisation/minéralisation (Hodge et al. 2000).

### ❖ *La nitrification*

La nitrification est un processus autotrophe pour le carbone, favorisé dans les sols bien aérés, riches en ammonium et ayant un pH autour de la neutralité (Prosser, 1989). Les électrons contenus dans les ions ammonium et nitrite sont utilisés dans les chaînes de transferts d'électrons pour fournir du pouvoir réducteur utilisé par la suite pour la fixation du CO<sub>2</sub>. Le sous-produit de ces réactions étant le nitrite et le nitrate. Nitrate et nitrite peuvent être utilisés comme substrats à la dénitrification et être entraînés dans les eaux de lixiviation.

On considère généralement que la nitrification se réalise en deux étapes, la première étape, la nitritation, est la formation de nitrite à partir de l'ammonium et est le fait des Ammonia oxydising Bacteria (AOB) et des Ammonia Oxydising Archea (AOA) (Francis et al. 2007). Cette étape est considérée comme l'étape limitante de la nitrification totale (Prosser 1990). Depuis 2015, on sait également qu'elle peut se réaliser en une seule étape par les organismes du comammox (Stein and Klotz 2016).

Des groupes variés de bactéries et champignons hétérotrophes peuvent également réaliser la nitrification mais à une vitesse beaucoup plus lente que celle pratiquée par les organismes autotrophes (Verstraete and Alexander 1973 ; Watson et al. 1981).

Au cours de la nitrification du N<sub>2</sub>O peut se former et représenter jusqu'à 30% des émissions de N<sub>2</sub>O (Wrage et al. 2001). Comme le nitrate et nitrite peuvent être en plus utilisés comme substrats à la

dénitrification et être entraînés dans les eaux de lixiviation, la nitrification contribue aux changements globaux.

## ❖ *La dénitrification*

La dénitrification est un processus hétérotrophe pour le carbone favorisé par l'anaérobie. En absence d'oxygène, le nitrate sert d'accepteur d'électron et se réduit en NO (oxyde nitrique), puis N<sub>2</sub>O (oxyde nitreux) et N<sub>2</sub>. Les sols sont à l'origine de 70% de la perte annuelle en N<sub>2</sub>O (10 Tg an<sup>-1</sup>) avec 6.3 Tg an<sup>-1</sup> qui provient des activités agricoles (Mosier et al. 1998; Philippot et al. 2007).

Un grand nombre d'organismes sont dénitrifiants : on trouve aussi bien des bactéries, que des archées et des champignons ( Zumft 1997 ; Philippot et al. 2007; Achouak et al. 2019). Il est néanmoins reconnu que de nombreuses bactéries, archées ou champignons n'expriment que partiellement les gènes permettant la réduction complète en N<sub>2</sub>. Ainsi, tout l'oxyde nitreux produit par la réduction de l'oxyde nitrique n'est pas forcément réduit en dinitrogène gazeux. Ces parcours incomplets peuvent conduire à la libération d'azote des gaz tels que le NO et le N<sub>2</sub>O. La proportion de N<sub>2</sub>O / N<sub>2</sub> produit au cours des processus de dénitrifications dépend de la ppO<sub>2</sub>, du pH, la disponibilité en azote, en carbone, en eau dans l'environnement microbien (Saggar et al. 2013).

Bien que le flux d'oxyde nitreux soit faible comparé aux autres flux d'azote, il a un effet profond sur l'environnement car l'oxyde nitreux est le principal agent destructeur de la couche d'ozone et un puissant gaz à effet de serre. Avec un pouvoir réchauffant 300 fois plus élevé que le CO<sub>2</sub>, il contribue à 6% de l'effet de l'effet de serre anthropogénique (Cicerone 1989 ; Philippot et al. 2007).

### 2.2 Principes des méthodes utilisées pour quantifier les flux et les organismes impliqués

#### 2.2.1 *La mesure des flux*

La mesure de ces flux repose soit sur des **mesures d'activités enzymatiques potentielles**, où les conditions de substrats et d'environnement de la réaction sont optimales, et qui indiquent les conditions dans lesquelles les organismes ont évolué les jours précédents la mesure ; soit sur des mesures de **flux bruts**, généralement basées sur des dilutions isotopiques.

Par exemple, le flux potentiel de nitrification (NEA) correspond à une mesure d'activité enzymatique dans des conditions optimales, c'est-à-dire en aérobie avec des concentrations en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> non limitantes. Cette mesure indique la quantité d'enzymes nitrifiantes fonctionnellement actives présentes dans le sol et est sensée refléter les valeurs maximales de ce flux et les conditions environnementales auxquelles les organismes nitrifiants ont été soumis pendant plusieurs semaines précédant la mesure (Pinay et al. 2007). On peut également mesurer séparément les deux étapes de la nitrification en utilisant un inhibiteur de l'oxydation du nitrite en nitrate (Niboyet et al. 2011)

Pour la dénitrification potentielle (DEA) (Smith and Tiedje 1979), les conditions optimales sont l'anaérobie, concentration en substrats NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et carbonés non limitants. La mesure se réalise en présence d'acétylène de manière à inhiber la dernière étape de la réduction de l'azote et révéler la présence de N<sub>2</sub>O (Bernhard-Reversat and Poupon 1980).

Le flux brut de nitrification peut être mesuré à l'aide de la technique de dilution isotopique qui consiste à marquer le pool de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> avec du <sup>15</sup>N et de suivre la dilution de ce pool par l'arrivée de molécules de

$\text{NO}_3^-$  non marquées produites par la nitrification pendant un temps donné (généralement 24 ou 48h) (Kirkham and Bartholomew 1955). De même l'ammonification brute peut se mesurer à l'aide de la technique de pool dilution qui consiste, en absence de prélèvement racinaire, à marquer le pool de  $\text{NH}_4^+$  avec du  $^{15}\text{N}$  et de suivre la dilution de ce pool par l'arrivée de molécules de  $\text{NH}_4^+$  non marquées produites par l'ammonification pendant un temps donné (généralement 24 ou 48h) (Davidson et al. 1991).

Les mesures de dénitrification nette reposent sur des mesures de variations de  $\text{N}_2\text{O}$  dont les variations sont supposées représenter celles de la dénitrification totale. Pour se faire, la dénitrification nette se mesure *in situ* à l'aide de chambres étanches posées sur le sol de manière étanche et de la mesure de l'augmentation de la concentration en  $\text{N}_2\text{O}$  dans la chambre en chromatographie en phase gazeuse (Benoit 2014).

### 2.2.2 Quantification des organismes impliqués dans ces flux

L'identification et la quantification des entités responsables de ces flux peuvent être appréhendées par les techniques de qPCR ciblées sur les gènes codant pour les activités enzymatiques considérées (Henry et al. 2004; Horz et al. 2004; Poly et al. 2008)(Tableau 3 : Liste des gènes ciblés pour la quantification des organismes impliqués dans une activité enzymatique du cycle de l'azote.

Les grands groupes microbiens présents (Champignons, Bactéries, Archées) peuvent également être identifiés et quantifier par qPCR ciblant les gènes ribosomiques 16 S (Smith and Osborn 2009) pour les bactéries ou 18S (Prevost-Boure et al. 2011) ou l'utilisation des PLFA (Kaur et al. 2005; Zelles 1999) cette dernière technique présentant l'avantage de quantifier les organismes vivants.

Tableau 3 : Liste des gènes ciblés pour la quantification des organismes impliqués dans une activité enzymatique du cycle de l'azote

Flux	Gène ciblé	Références
Nitritation	<i>amoA</i>	(Horz et al. 2004)
Nitratation	<i>nxrA</i>	(Poly et al. 2008)
Dénitrification	<i>nirK</i>	(Henry et al. 2004)

L'ensemble de ces flux, stocks et organismes peuvent être modifiés par les changements globaux et peuvent également avoir des répercussions sur leur évolution. Examinons maintenant l'impact des changements globaux sur ces flux.

## 2.3 Les activités microbiennes du cycle de l'azote face au changement global : effet des fortes teneurs en $\text{CO}_2$ atmosphérique

Les effets du  $\text{CO}_2$  sur les activités enzymatiques du sol ne sont pas directs mais passent par l'intermédiaire des effets sur les plantes. Aux fortes teneurs en  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère on s'attend à :

1) une augmentation des apports de C dans le sol, soit par la stimulation de la rhizodéposition, soit par une croissance accrue du système racinaire ou une élévation du C/N de la biomasse des litières (Cotrufo and Gorissen 1997). Ces apports de C organique pourraient favoriser l'immobilisation microbienne (Diaz et al. 1993; Hungate 1999), les activités hétérotrophes du sol comme la

dénitrification (Tiedje 1988) et la minéralisation par le mécanisme du priming effect (Zak et al. 1993 ; Fontaine et al. 2004). L'équilibre entre minéralisation, immobilisation et dénitrification conditionnera la disponibilité en azote minéral du milieu.

2) une diminution de la teneur en eau du sol, en lien avec la diminution de la transpiration foliaire observée sous fort CO<sub>2</sub> (Stitt and Krapp 1999). Cette augmentation de la teneur en eau du sol pourrait avoir des effets positifs ou négatifs directs suivant la sensibilité de l'activité à la teneur en eau et les conditions in situ, ou indirects par son effet sur la teneur en O<sub>2</sub> du sol.

3) à une diminution de la concentration en O<sub>2</sub> dans le sol, liée à l'augmentation de la teneur en eau du sol précitée et à une stimulation des activités respiratoire du sol liées aux apports accrus de C dans le sol sous fort CO<sub>2</sub> (Tiedje 1988). La diminution de la concentration en O<sub>2</sub> devrait stimuler les activités anoxiques du sol (dénitrification) et diminuer les activités aérobies (minéralisation et nitrification).

De plus, la stimulation de la croissance des plantes sous fort CO<sub>2</sub> pourrait s'accompagner d'une augmentation de l'absorption d'azote par les racines (Bassirirad et al. 2001), intensifiant la compétition entre les plantes et les microorganismes du sol pour le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (substrat des nitrifiants) et pour les NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (substrat des dénitrifiants).

→ **Ainsi les fortes teneurs** en CO<sub>2</sub> peuvent avoir des effets sur la teneur en eau du sol, son oxygénation, la disponibilité en azote et en carbone labile dans le sol. L'ensemble des activités microbiennes du sol peuvent donc être impactées sous fort CO<sub>2</sub>.

#### 2.4 Les activités microbiennes du cycle de l'azote face aux autres facteurs du changement global : température, précipitations et dépôts azotés

**Une augmentation de la température du sol** pourrait avoir des effets directs et indirects. Les effets directs dépendent de la sensibilité propre à chaque activité enzymatique et de la gamme de variation de température considérée. Les effets indirects concernent l'impact des fortes températures sur la teneur en eau du sol et son oxygénation *via* l'effet des températures sur les processus respiratoires qui tendent à augmenter avec l'élévation de la température (Fierer et al. 2006).

**Les précipitations** modifient la teneur en eau du sol et la disponibilité en oxygène avec des conséquences sur les activités microbiennes déjà évoquées. Elle agit également sur la diffusion des substrats ou leur entrainement par la nappe drainante dans les eaux de lixiviation.

**L'augmentation de la déposition atmosphérique** en augmentant la disponibilité en substrats pour les nitrifiants et les dénitrifiants devraient stimuler ces activités.

→ **Ainsi, la complexité des interactions entre les différents flux fait que les effets combinés des facteurs du changement global sur ces flux sont peu déductibles des effets de ces facteurs pris individuellement. Des expérimentations manipulant les effets combinés sont nécessaires.**

## Troisième partie : mes résultats

Maintenant que ce cadre théorique est posé, je vais présenter l'apport de ma recherche à cette problématique générale de la réaction du cycle de l'azote aux changements globaux.

Les changements globaux constituent le contexte de toute ma recherche. D'abord dans une perspective agronomique, puis dans une perspective écologique, j'ai analysé l'impact de ces changements sur le cycle de l'azote au sein des écosystèmes. Ma recherche s'est ensuite déplacée vers des questions plus fondamentales sur les flux d'azote dans les arbres et ses interactions avec les micro-organismes dans le sol. L'analyse de ces interactions participera, à terme, à la compréhension de la réaction des écosystèmes aux changements globaux.

Je présenterai d'abord mes résultats concernant le fonctionnement azoté des plantes (Section I) puis mes résultats concernant le fonctionnement azoté du sol, et les transferts sol-plante en lien avec le fonctionnement de la biomasse microbienne (Section II).

### Section I : Fonctionnement azoté des plantes

#### 1. Influence du nitrate sur les transferts de sève chez le blé et le maïs (thèse)

Durant ma thèse, nous avons choisi d'étudier les caractéristiques du flux xylémique (composition, concentration, vitesse) en réponse à la présence de nitrate dans le milieu racinaire chez de jeunes plantules décapitées de maïs ou de blé en condition de poussée racinaire, un chercheur de l'équipe, Jackson Hoarau ayant remarqué un effet stimulateur de l'addition du nitrate sur la poussée racinaire. Nous avons alors caractérisé ce phénomène et montré que les plantules traitées au  $\text{KNO}_3$ , comparativement à celles traitées au  $\text{KCl}$  à la même concentration, présentaient une vitesse d'exsudation double<sup>4</sup>. Cet effet du nitrate a été attribué à une augmentation de la conductivité hydraulique du système racinaire puisque aucune augmentation significative de la différence de potentiel hydrique entre les exsudats et le milieu extérieur n'avait pu être mise en évidence. La question qui s'est posée alors était de savoir si l'effet était direct ou s'il impliquait la chaîne de réduction et d'assimilation des nitrates. L'emploi d'inhibiteurs spécifiques des enzymes impliquées dans la réduction (nitrate réductase) et l'assimilation des nitrates (glutamine synthétase) a permis de montrer l'implication de cette chaîne métabolique dans ce processus<sup>5</sup>. Une transposition de ce modèle a ensuite été entreprise sur le blé par une comparaison variétale entre Thésée et Soissons qui diffèrent par leur besoin en azote<sup>6</sup>. Nous avons mis en évidence que les caractéristiques de l'exsudation de ces deux variétés étaient liées aux rapports d'activité Nitrate Réductase *in vitro* foliaire et racinaire. Une expérience de traçage par du  $\text{KNO}_3$  enrichi en  $^{15}\text{N}$  nous a permis d'obtenir une valeur de l'absorption totale de l'azote ainsi que sa répartition entre les compartiments foliaire et racinaire. L'étude d'extrait

---

4 **Barthes L**, Bousser A, Hoarau J, Deleens E. Reassessment of the relationship between nitrogen supply and xylem exudation in detopped maize seedlings. *Plant Physiol Biochem.* **1995**;33(2)

5 **Barthes L**, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul J-L. Xylem exudation is related to nitrate assimilation pathway in detopped maize seedlings: use of nitrate reductase and glutamine synthetase inhibitors as tools. *J Exp Bot.* **1996**;47(4):485-495. <http://jxb.oxfordjournals.org/content/47/4/485>.

6 **Barthes L**, Deléens E, Bousser A, Hoarau J, Prioul JL. Nitrate use and xylem exudation in detopped wheat seedlings: An early diagnosis for predicting varietal differences in nitrogen utilisation? *Aust J Plant Physiol.* **1996**;23(1)

de collets et du couvert végétal jusqu'à la floraison de cultures en champ a prolongé la comparaison variétale : les critères étudiés au stade jeune se révèlent être des diagnostics précoces du métabolisme azoté des cultures. Des résultats concernant la composition isotopique naturelle de l'azote des feuilles suggèrent leur utilisation comme indicateur d'origine de l'azote du sol (fertilisant ou minéralisation naturelle)<sup>7</sup>.

## 2. La dynamique des réserves carbonées et azotées chez les arbres au cours d'une saison de végétation chez les arbres matures. Exemple de chênes âgés de 100 ans

Au cours, de l'année 2008 j'ai entamé une collaboration avec Stéphane BAZOT de l'équipe d'écophysiologie pour étudier la dynamique temporelle des composés azotés et **carbonés chez des arbres matures (100 ans) sur quatre périodes de l'année.**

Nous avons cherché à préciser le scénario de dynamique des réserves azotées et carbonées proposé dans la littérature (Cf. Etat de l'art, section II 2.1), sur des arbres d'une classe d'âge plus âgée (100 ans) et en renforçant l'effort de prélèvement sur 4 dates de prélèvement au lieu de deux dans les études précédentes et en étudiant conjointement les réserves carbonées et azotées, sur un ensemble de compartiments à la fois aérien et racinaire. Dans notre article (Bazot et al., 2013)<sup>8</sup> nous avons confirmé que chez un chêne mature, le stockage du C démarrait rapidement après l'expansion des feuilles avec une augmentation de la concentration en amidon significative dès le début de l'été dans tous les compartiments de l'arbre. Nous avons également révélé que **le cycle interne de l'azote était différent.** En effet, nous avons observé que la reconstitution du pool azoté n'a lieu que plus tard dans la saison de végétation, c'est-à-dire pendant la sénescence des feuilles en automne, où la résorption de l'azote foliaire dans les tissus pérennes contribue au stockage. Nous avons également mis en évidence que les racines moyennes (diamètre > 2mm) et les jeunes branches étaient des organes de stockage d'azote important alors que tous les compartiments du chêne étaient des organes de stockage C potentiels, à l'exception du tissu du phloème.

Au regard, de l'effet de l'âge sur la productivité (Ryan et al. 1997) (Cf. Etat de l'art section II 2.2) il nous a paru intéressant d'essayer de mettre en évidence des différences dans la gestion des réserves azotées chez des âges d'arbres différents. En effet, Il était difficile à partir de la littérature disponible de conclure sur l'effet âge en comparant des études qui n'ont pas été effectuées sur un même site et au cours d'une même période.

## 3. La dynamique des réserves carbonées et azotées suivant les classes d'âges chez le chêne

Ainsi pour tester l'hypothèse d'un effet âge sur ces processus il fallait pouvoir mener les études sur des chênes d'âge différents, situés sur un même site et durant la même période. C'est ce que nous avons fait durant la thèse **d'Angélique GILSON**, en forêt de Barbeau sur des chênes sessiles de trois

---

<sup>7</sup> Barthes L, Deleens E, Bousser A, Hannachi L, Gate P, Prioul J-L. Variations of wheat leaf C and N isotope compositions after crop fertilization. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III.* **1995**;318(2).

<sup>8</sup> Bazot S, Barthes L, Blanot D, Fresneau C (2013) Distribution of non-structural nitrogen and carbohydrate compounds in mature oak trees in a temperate forest at four key phenological stages. *Trees* 27: 1023-1034

classes d'âges distinctes (8 ans, 20 ans, et 100 ans) se développant *in situ* dans des conditions environnementales proches.

Examinons dans un premier temps, les résultats concernant les réserves carbonées.

A la fin de l'hiver, dans les branches, les niveaux de réserves carbonées totales sont les mêmes chez toutes les classes d'âge. Par contre la proportion d'amidon et de sucres solubles diffèrent, la teneur hivernale en sucres solubles des jeunes branches des arbres du fourré étant significativement plus élevée que celles des arbres plus âgés. Les sucres solubles semblent donc être un composé de stockage privilégié chez les jeunes arbres, ce qui pourrait également contribuer à leur acclimatation au froid (Morin et al. 2007)

Au cours de la remobilisation printanière nous avons montré que la nature biochimique du composé carboné remobilisé différait selon les classes d'âges : chez les arbres âgés du gaulis et de la futaie, l'amidon est le principal composé remobilisé, tandis que chez les arbres plus jeunes du fourré, l'amidon et les sucres solubles sont remobilisés dans les mêmes proportions.

Durant la saison de végétation la dynamique temporelle des réserves carbonées est également différente selon les âges que ce soit dans les branches ou les racines :

- Dans les branches, la concentration en amidon commence à augmenter dès après le débourrement chez les arbres de la futaie, alors qu'elle n'augmente seulement qu'entre la maturité foliaire et la fin de la croissance du bois chez les arbres du fourré et du gaulis. Ainsi les arbres âgés constituent leurs réserves carbonées dans les branches précocement alors que les plus jeunes arbres ne commencent à stocker du carbone qu'une fois la maturité foliaire achevée, privilégiant ainsi une allocation du carbone à la croissance durant la saison de végétation.
- Dans les racines fines et moyennes, les concentrations en composés carbonés augmentent également durant la saison de végétation chez les jeunes arbres mais ne varient pas chez les arbres de la futaie. Ainsi, chez les jeunes arbres, les racines fines et moyenne peuvent servir de compartiment de stockage tandis que chez les arbres plus âgés ce sont les plus grosses racines qui assurent cette fonction. Ce point permet de souligner la perte de la fonction de stockage des racines moyennes et fines avec l'âge.

Examinons maintenant, ce qui concerne l'azote.

Concernant l'azote, l'effet âge réside premièrement et avant tout dans les valeurs des concentrations absolues en acides aminés : à toutes les dates et pour tous les compartiments (branches n, branches n-1, racines fines et moyennes) les concentrations chez les arbres du fourré sont systématiquement plus faibles que celles des arbres du gaulis, ces dernières étant également plus faibles que celles des arbres de la futaie. La plus forte concentration en acides aminés dans les tissus des arbres âgés peut être expliquée par une meilleure absorption racinaire de l'azote liée à une augmentation de la biomasse racinaire avec l'âge (Varik et al. 2013) ou à une meilleure efficacité de la captation de l'azote présent liée à une mycorhization plus importante (Marmann et al. 1997) ou à un impact positif de la présence de racines sur la biomasse microbienne rhizosphérique minéralisatrice (Bradley and Fyles 1995 ; Bergeron et al. 2011 ; Ehrenfeld et al. 1997 ; Zhang et al. 2012) *via* la rhizodéposition. La faible réserve en acides aminés chez les jeunes arbres, les rend également plus dépendants de l'approvisionnement en azote dans le sol.

La deuxième différence concerne la dynamique des protéines solubles dans les branches n-1 dont les concentrations restent stables entre l'hiver et le débourrement alors qu'elles diminuent pour les

autres catégories d'âges. Ainsi les jeunes arbres utiliseraient moins leurs réserves azotées de proximité pour la croissance des nouveaux organes et privilégieraient les sources externes d'azote. Leur éventuelle incapacité à utiliser l'azote des réserves les rendraient également plus sensibles à la disponibilité en azote du milieu.

Pour les autres compartiments, la dynamique temporelle est relativement identique pour toutes les classes d'âge : dans les branches  $n$ , on observe une diminution des concentrations en protéines solubles et acides aminés du débourrement à la fin de la croissance du bois attestant à la fois d'une mobilisation des réserves au printemps et d'une dilution des composés azotés liée à l'accroissement de biomasse. Puis au moment du jaunissement, on observe une augmentation attribuée à la résorption de l'azote foliaire. Dans les racines fines et moyennes, la concentration en protéines solubles reste stable durant la saison de végétation pour les arbres de la futaie mais présente une légère baisse à la fin de la croissance du bois pour les autres catégories d'âge.

Ainsi, la gestion des réserves carbonées et azotées présente des différences selon les classes d'âge. Les arbres âgés ont vraisemblablement une meilleure autonomie vis-à-vis des variations de disponibilité du milieu en privilégiant le stockage à la croissance et possédant des capacités de réserves en acides aminés plus élevées. Les arbres âgés auraient donc une capacité de résilience plus élevée vis-à-vis de la ressource externe que les jeunes arbres.

Nous avons alors cherché à quantifier la contribution des sources externes d'azote dans la constitution des réserves et leur utilisation chez les arbres d'une classe d'âge intermédiaire âgés d'une vingtaine d'année.

#### 4. Origine et temporalité de la mise en réserve chez des arbres in situ

Afin de préciser l'origine et la temporalité de la mise en réserve et de l'utilisation de ses réserves nous avons réalisé des marquages au  $^{15}\text{N}$  durant la saison de végétation (Bazot et al. 2016)<sup>9</sup>. Nous avons marqué les feuilles pour marquer les réserves foliaires et le sol pour mettre en évidence l'absorption racinaire au printemps et à l'automne (Figure 3 : Marquage et prélèvement du sol en forêt de Barbeau avec Stéphane Bazot



---

<sup>9</sup> Bazot S, Fresneau C, Damesin C, Barthes L (2016) Contribution of previous year's leaf N and soil N uptake to current year's leaf growth in sessile oak. *Biogeosciences* 13: 3475-3484

Ces travaux nous ont permis de montrer que **la reprise de croissance au printemps se réalise dans un premier temps à partir des réserves internes à l'arbre**, l'utilisation de l'azote du sol étant plus tardive. De plus, ces expériences révèlent **une compétition pour l'azote minéral entre les arbres et la microflore** (Cf. section suivante).

## 5. Bilan de la répartition de l'azote absorbé durant une saison de végétation

Un marquage du sol réalisé au printemps 2016, a été effectué au pied de cinq chênes âgés de 20 ans par un ajout de 1,82 g de  $^{15}\text{NO}_3^{15}\text{NH}_4$  équivalant à l'apport de  $5 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Maxwell et al. 2020). Le stage de M1 de **Romain SHROEDER** en 2019 et le stage de M2 de **Mubarak MAHMUD**, durant l'année 2020, a permis de finaliser le bilan à l'automne de la répartition de l'azote et du  $^{15}\text{N}$  absorbé durant la saison de végétation (Article en cours de rédaction). A partir de l'analyse de la composition élémentaire et isotopique des différents compartiments de l'arbre et des données de biomasse obtenues après abattage des arbres et excavation de l'ensemble du système racinaire, ainsi que des estimations des biomasses de chaque cerne à partir de la mesure du largeur des cernes et de relations allométriques (Dik 1984), nous avons pu réaliser un bilan fin et complet de la répartition de l'azote absorbé durant une saison de végétation (Figure 4).

Nous avons montré que l'ensemble de l'aubier, en particulier le premier cerne, est marqué au  $^{15}\text{N}$ . Cela signifie une allocation d'azote dans l'ensemble de ce compartiment à cette période. Les compartiments, rarement inventoriés dans la littérature, comme le pivot, les grosses branches et les grosses racines représentent près de 40 % du  $^{15}\text{N}$  retrouvé. Nous avons obtenu un faible taux de récupération dans l'arbre du  $^{15}\text{N}$  apporté (425 mg  $^{15}\text{N}$ , ie 23%) et ainsi que dans la biomasse microbienne (100 mg  $^{15}\text{N}$  ; ie 5%) et le sol (25 mg  $^{15}\text{N}$  ; 1 %) bien que l'ensemble des compartiments de l'arbre ait été investigué. Cela indique des pertes de  $^{15}\text{N}$  importantes par volatilisation, dénitrification ou lixiviation. Un bilan complet du devenir de l'azote nécessite donc de quantifier l'ensemble de ces flux.

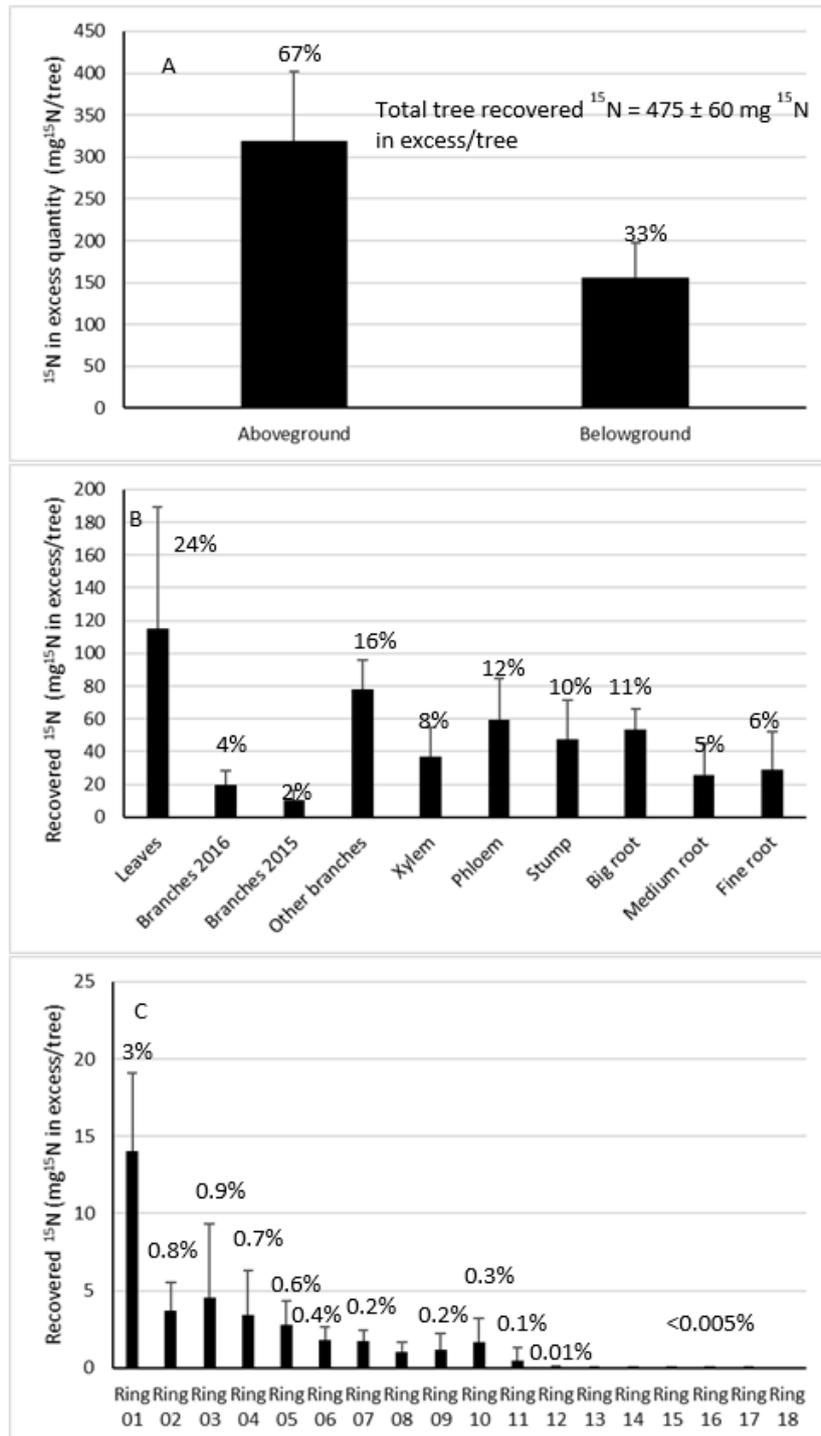


Figure 4 : Quantity of recovered  $^{15}\text{N}$  expressed in mg  $^{15}\text{N}$  in excess/tree in above and below ground compartments (A), sub-compartments (B) and the 18 xylem rings (C) Values are mean and standard deviation of 5 field replicates. The number above the bars are the percentage of the  $^{15}\text{N}$  in excess in the considered compartment relative to the whole tree. (Publication en cours de rédaction)

## Section II : Le fonctionnement azoté du sol, et les transferts sol-plante en lien avec le fonctionnement de la biomasse microbienne

Au cours du DEA (2000) de **Romain BARNARD** nous avons cherché à mieux comprendre comment les activités potentielles de nitrification (NEA) et de dénitrification (DEA) sont affectées par un taux élevé de CO<sub>2</sub> atmosphérique. Avec la thèse de **Romain BARNARD** (2000-2003) et celle d'**Audrey NIBOYET** (2005 -2008) nous avons investigué les impacts combinés des différents facteurs du changement global. Ce travail a été mené en étroite collaboration avec Xavier Leroux et Franck Poly du Laboratoire d'Ecologie microbienne de Lyon et Bruce Hungate de l'Université d'Arizona.

Enfin avec l'arrivée de **Juliette BLOOR** dans notre équipe (Post-doc de Paul Leadley) nous avons envisagé une autre dimension du fonctionnement des prairies au travers des relations de compétition qui surviennent entre les herbacées et les ligneux lors de la succession végétale. Présentons, les principaux résultats de ce travail.

### 1. Les activités microbiennes du sol face aux changements globaux.

Notre travail s'est centré sur les activités microbiennes de nitrification et dénitrification en raison de leur rôle sur la disponibilité en ammonium et nitrate et leur contribution aux pollutions azotées (effet de serre et pollutions des nappes phréatiques).

Une approche à différents pas de temps et à différents niveaux de complexité a été mise en place à travers plusieurs expériences: i) dans des mésocosmes de *Holcus lanatus* soumis à une teneur élevée en CO<sub>2</sub> à court terme, ii) dans des mésocosmes monospécifiques de *Holcus lanatus* et *Festuca rubra* enrichis en CO<sub>2</sub> à moyen terme, iii) dans quatre sites en Europe du programme MEGARICH d'enrichissement en CO<sub>2</sub> *in situ* et à moyen terme, iv) dans la Jasper Ridge Global Change Experiment, dans laquelle la teneur élevée en CO<sub>2</sub> est combinée avec d'autres changements globaux.

**Les résultats obtenus dans le cadre du DEA et la thèse de Romain BARNARD** suggèrent que la teneur en O<sub>2</sub> dans le sol est le facteur principal par lequel une teneur élevée en CO<sub>2</sub> atmosphérique peut affecter la NEA. En détail, voici le résumé de nos principaux résultats.

Dans notre premier article<sup>10</sup>, les fortes concentrations en CO<sub>2</sub> appliquées pendant deux mois sur des microcosmes de *Holcus lanatus* cultivés sous serre (Figure 5), ont stimulé la croissance des plantes (+76%) sans modifier la quantité totale d'azote absorbée. La quantité d'azote dans la biomasse microbienne a été augmentée sous fort CO<sub>2</sub> et les concentrations en nitrate et ammonium dans le sol ont diminué. La NEA a légèrement augmenté et la DEA diminué. Les modifications de la concentration des ions minéraux azotés dans le sol ont été attribuées à une augmentation de la quantité de N dans la biomasse microbienne (+17%; p 0,061). La diminution de la concentration en nitrate aurait provoqué une diminution de la DEA, tandis que qu'une stimulation de l'ammonification sous l'effet d'une rhizodéposition accrue sous fort CO<sub>2</sub> a été proposée pour expliquer l'augmentation de la NEA.

---

10 Barnard R, Leadley PW, Lensi R, Barthes L (2005) Plant, soil microbial and soil inorganic nitrogen responses to elevated CO<sub>2</sub>: a study in microcosms of *Holcus lanatus*. *Acta Oecologica* 27: 171-178



Figure 5 : Dispositif d'enrichissement en CO<sub>2</sub> des microcosmes

Nous avons voulu alors tester les effets du CO<sub>2</sub> sur un pas de temps plus long (15 mois) dans le cadre d'une comparaison d'espèces (*Holcus lanatus* et *Festuca rubra*)<sup>11</sup>. Nous avons retrouvé un effet positif des fortes teneurs en CO<sub>2</sub> sur la biomasse des deux espèces mais un effet différentiel des fortes teneurs en CO<sub>2</sub> sur la NEA et la DEA des deux espèces. Chez *Holcus lanatus* la NEA a été diminuée et la DEA légèrement augmentée tandis que chez *Festuca rubra* la NEA et la DEA n'étaient pas différentes sous fort et faible CO<sub>2</sub>. L'analyse des différents facteurs susceptibles d'affecter les activités enzymatiques suggère que les réponses différentes de la NEA chez les deux espèces pourraient être liées aux concentrations en O<sub>2</sub> plus ou moins abaissées par les fortes concentrations en CO<sub>2</sub> en lien avec une augmentation des teneurs en C labile dans le sol et les respirations racinaire et microbienne. Les niveaux de DEA ont été quant à eux expliqués par la teneur en C labile dans le sol. L'évolution comparée de la quantité d'azote dans les plantes et la biomasse microbienne, montre que l'augmentation de l'immobilisation microbienne sous fort CO<sub>2</sub> est vraisemblablement responsable d'une limitation de l'absorption d'azote par les plantes dans le court terme (4 mois) mais qu'elle ne perdure pas dans le temps (on n'observe plus d'effet du CO<sub>2</sub> sur les teneurs en N dans la biomasse microbienne après 15 mois).

Dans un troisième article<sup>12</sup> une expérience de marquage au <sup>15</sup>N du sol après les 15 mois de traitement montre que la plus forte capacité d'immobilisation de N dans la biomasse microbienne sous fort CO<sub>2</sub> étaient maintenue après 15 mois mais que cette capacité ne se répercutait pas sur la quantité de N dans la biomasse microbienne, suggérant un effet du CO<sub>2</sub> sur la vitesse du *turn over* microbien. L'évolution du C/N de la biomasse microbienne au cours du temps suggère également un changement du fonctionnement ou de la structure de la communauté microbienne.

Le quatrième article<sup>13</sup> présente les résultats obtenus par Romain Barnard sur les 4 sites européens du programme MEGARICH. Ici le traitement CO<sub>2</sub> a été appliqué *in situ* sur des parcelles de prairies en combinaison avec des fréquences de coupes dans 2 sites et un traitement température sur un des sites. Le traitement CO<sub>2</sub> avait été appliqué depuis plusieurs années (de 20 à 48 mois à la date des prélèvements) et presque aucun effet sur les paramètres mesurés n'a été observé hormis sur le site français où une diminution de la DEA a été observée et mise en relation avec la diminution de la concentration en NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

---

11 Barnard R, Barthes L, Le Roux X, Leadley PW (2004) Dynamics of nitrifying activities, denitrifying activities and nitrogen in grassland mesocosms as altered by elevated CO<sub>2</sub>. *New Phytologist* 162: 365-376.

12 Barnard R, Barthes L, Leadley PW (2006) Short-Term Uptake of <sup>15</sup>N by a Grass and Soil Micro-Organisms after Long-Term Exposure to Elevated CO<sub>2</sub>. *Plant and Soil* 280: 91-99.

13 Barnard R, Barthes L, Roux XL, Harmens H, Raschi A, et al. (2004) Atmospheric CO<sub>2</sub> elevation has little effect on nitrifying and denitrifying enzyme activity in four European grasslands. *Global Change Biology* 10: 488-497

Dans le dernier article <sup>14</sup>, le traitement CO<sub>2</sub> a été combiné à 4 autres facteurs du changement global (température, précipitation et dépôts d'azote atmosphérique) dans un dispositif de long terme (5 années) de type FACE à la **Jasper Ridge Experiment en Californie** (Figure 6). Ce site piloté par l'Université de Stanford, permet l'étude à long terme et *in situ* des effets de quatre facteurs des changements globaux (CO<sub>2</sub>, température, précipitation, dépôt d'azote atmosphérique) et de l'ensemble de leurs interactions sur une prairie de type méditerranéen. Le nombre élevé de réplicats par traitement (n=8) et la présence de l'ensemble des combinaisons possibles entre ces 4 facteurs (16 traitements) en font un site d'étude des changements globaux tout à fait exceptionnel.

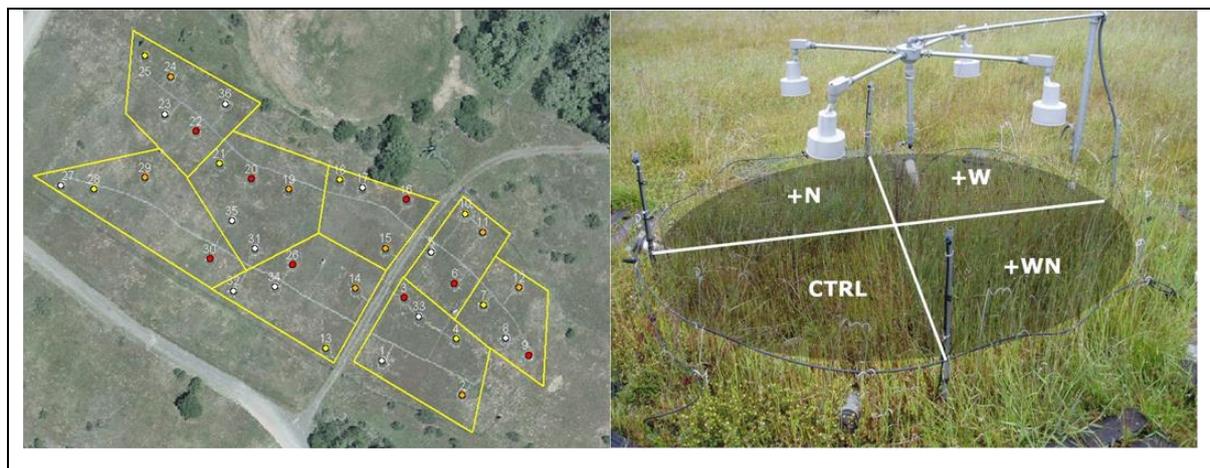


Figure 6 : Vue aérienne du site de Jasper Ridge et dispositif d'application des traitements

En traitement seul, nous avons trouvé que les fortes teneurs en CO<sub>2</sub> n'ont aucun impact sur les activités de NEA et DEA. Cependant, en incluant l'ensemble des traitements, la NEA a été diminuée par les fortes teneurs en CO<sub>2</sub> et augmentée par les additions d'azote. En effet, les fortes teneurs en CO<sub>2</sub> suppriment l'effet positif de l'addition d'azote dans tous les traitements qui incluent une addition d'azote. En ce qui concerne la DEA, nous avons trouvé une interaction positive entre les fortes teneurs en CO<sub>2</sub> et l'addition d'azote, avec un effet positif du CO<sub>2</sub> uniquement sur les parcelles ayant reçues de l'azote. Ces résultats suggèrent une limitation par l'azote de la communauté des dénitrifiants.

Tableau 4 : Effet des fortes teneurs en CO<sub>2</sub> sur les activités de NEA, DEA sur la quantité de N dans les plantes et la biomasse microbienne (Travail de thèse de Romain BARNARD).

Réf.	Durée des traitements	Type de système étudié	NEA	DEA	N plant	N-BM	
10	2 mois	Microcosme sous serre	↑	↓	=	↑	
11	4 et 15 mois	Microcosme sous serre	<i>Holcus</i>	↓	↑	↓ puis ↑	↑ puis =
			<i>Festuca</i>	=	=	- ↑	=
13	20 à 48 mois	FACE Megarich	monolithes	=	= sauf un ↓	nd	=
14	5 ans	FACE Jasper Ridge	prairies	↓	=	nd	=

14 Barnard R, Le Roux X, Hungate BA, Cleland EE, Blankinship JC, et al. (2006) Several components of global change alter nitrifying and denitrifying activities in an annual grassland. *Functional Ecology* 20: 557-564.

**Ainsi la comparaison des résultats obtenus sur des microcosmes de monocultures sous serre sur des temps courts et ceux obtenus sur des mélanges d'espèces sur des dispositifs FACE sur du plus long terme (Tableau 4) indique que les effets des fortes teneurs en CO<sub>2</sub> sur la biomasse microbienne ou sur les activités microbiennes de nitrification et dénitrification sont plus facilement observables sur les temps courts et des milieux perturbés que sur des milieux soumis depuis plus longtemps à cette augmentation et qui semblent donc plus résilients à cette perturbation.**

**Le travail d'Audrey NIBOYET (2005-2008) a permis de développer l'étude de l'impact des changements globaux sur les activités de nitrification et dénitrification étudiées de manière combinée.** Comme Romain Barnard, elle s'est appuyée sur des expériences sous serres et sur le dispositif expérimental de la **Jasper Ridge Global Change Experiment**. Elle a travaillé sur des pas de temps plus long d'application des traitements, introduit les mesures de nitrification brutes, mesuré les deux étapes de la nitrification et valorisé scientifiquement le passage d'un feu accidentel sur les parcelles.

Un des résultats intéressants de cette étude est l'**absence d'effet des traitements sur la nitrification brute** malgré des effets marqués des traitements azotés sur la nitrification potentielle (Niboyet et al., 2010<sup>15</sup> ; Niboyet et al., 2011a<sup>16</sup>). La dénitrification potentielle a été augmentée par les parcelles supplémentées en azote et en eau, mais aucun effet du traitement CO<sub>2</sub> n'a été observé. Par contre, et c'est le résultat le plus marquant de cette étude, le passage d'un feu sur le dispositif a fortement augmenté les émissions de N<sub>2</sub>O en particulier longtemps après le passage du feu (effet maximal 33 mois après son passage) et lorsqu'il a été combiné à une élévation de la teneur en CO<sub>2</sub> et à une augmentation des dépôts d'azote (Niboyet et al., 2011b<sup>17</sup>). Ainsi, des différences entre traitements qui n'avaient pas été observées en l'absence de feux sont apparues sous l'effet du feu. **Les impacts des changements globaux peuvent donc être sous-estimés et mis à jour sous l'impact d'une perturbation ponctuelle qui peut révéler des effets qui n'avaient pas été anticipés.**

Nous avons alors analysé la compétition pour l'azote entre des arbres et un couvert herbacé pour simuler la compétition lors de la succession végétale dans les prairies.

## 2. Importance de la disponibilité en azote sur la compétition arbre–herbacée dans un contexte de changement global

Les graines d'arbres, arrivant dans les prairies par la dissémination par le vent ou les animaux ou bien présentes dans la banque de graines sont alors soumises à la compétition avec les herbacées présentes. Le résultat de cette compétition conditionnera la réussite de l'implantation des ligneux et la suite de la dynamique de la succession végétale. Comprendre les modalités de cette compétition et comment les changements globaux sont susceptibles de les affecter a été l'objet de notre travail avec Juliette Bloor dans notre équipe.

Nous avons dans un premier temps caractérisé cette compétition avec un dispositif original permettant de distinguer la contribution de la compétition aérienne et de la compétition souterraine dans la compétition totale (Bloor et al. 2007)<sup>18</sup> (Figure 7). Sous serre et avec un Frêne comme arbre et du

---

15 Niboyet A, Barthes L, Hungate BA, Le Roux X, Bloor JMG, et al. (2010) Responses of soil nitrogen cycling to the interactive effects of elevated CO<sub>2</sub> and inorganic N supply. *Plant and Soil* 327: 35-47

16 Niboyet A, Le Roux X, Dijkstra P, Hungate BA, Barthes L, et al. (2011) Testing interactive effects of global environmental changes on soil nitrogen cycling. *Ecosphere* 2: art56

17 Niboyet A, Brown JR, Dijkstra P, Blankinship JC, Leadley PW, et al. (2011) Global Change Could Amplify Fire Effects on Soil Greenhouse Gas Emissions. *PLOS ONE* 6: e20105

18 Bloor JMG, Leadley PW, Barthes L (2007) Responses of *Fraxinus excelsior* seedlings to grass-induced above- and below-ground competition. *Plant Ecology* 194: 293-304

Dactyle comme plante herbacée modèles, nous avons empêché ou autorisé la compétition souterraine ou aérienne grâce un système de partitionnement des parties racinaires ou caulinaires des deux espèces. Le bilan des masses, l'étude de la morphologie et de la répartition de l'azote dans ce dispositif a permis de mettre en évidence que l'impact négatif de la présence du Dactyle sur la croissance du Frêne était liée avant tout à une compétition au niveau racinaire pour la ressource en nutriment (Bloor et al. 2007)<sup>18</sup>.

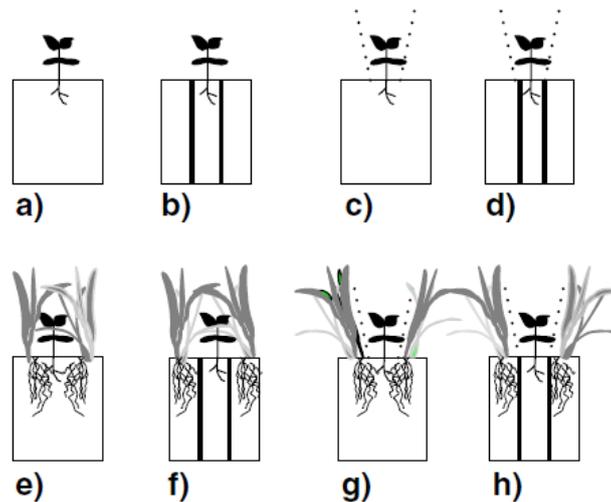


Figure 7 : Dispositif expérimental utilisé pour distinguer la composante souterraine et aérienne de la compétition (Bloor et al., 2007).

Nous avons ensuite caractérisé la compétition entre le Frêne et le Dactyle sous l'effet de deux facteurs du changement global<sup>19</sup> : l'augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique et l'augmentation de la disponibilité en azote. Dans des microcosmes sous serres supplémentés ou non en azote (+ 100 kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>) et sous atmosphère naturelle ([CO<sub>2</sub>] = 380 ppm) ou enrichie en CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>] = 645 ppm) dans un dispositif expérimental de split plot avec le CO<sub>2</sub> en facteur principal, nous avons fait pousser durant trois mois des Frênes, seuls ou en compétition avec du Dactyle. Au bout des 3 mois, nous avons dressé un bilan de la croissance et de la répartition d'azote chez les deux espèces ainsi que des mesures sur le carbone et l'azote dans la biomasse microbienne. Un marquage au <sup>15</sup>N du sol a permis également d'analyser la répartition de <sup>15</sup>N entre le Frêne, le Dactyle et la biomasse microbienne du sol 24h après l'ajout du marqueur<sup>20</sup>. Les résultats principaux de ces expériences montrent :

- Que l'addition d'azote a un effet positif sur la croissance du Frêne en absence de compétition mais un fort effet négatif (-80%) en présence de Dactyle (Figure 8 : Biomasse du Frêne sous les traitements de CO<sub>2</sub> et de N en présence (+COMP) ou en absence (-COMP) de la compétition herbacée. c = CO<sub>2</sub> à 380 ppm C = CO<sub>2</sub> à 665 ppm ; n, teneur ambiante, N teneur en azote élevée (+100 kN ha<sup>-1</sup>). Moyenne et écart-type de la moyenne (n=6) (from Bloor et al. 2007), ce dernier profitant à lui seul de cet apport supplémentaire en azote et augmentant ainsi son effet négatif sur la croissance du Frêne. Le marquage au <sup>15</sup>N montre d'ailleurs que le Dactyle est le puits majoritaire de <sup>15</sup>N (environ 90% du <sup>15</sup>N apporté est retrouvé dans le Dactyle), suivi de loin par la biomasse microbienne (autour de 1%) et par le Frêne (moins de 0,5% du <sup>15</sup>N

19 Bloor JMG, Barthes L, Leadley PW (2008) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and N on tree-grass interactions: an experimental test using *Fraxinus excelsior* and *Dactylis glomerata*. *Functional Ecology* 22: 537-546

20 Bloor JMG, Niboyet A, Leadley PW, Barthes L (2009) CO<sub>2</sub> and inorganic N supply modify competition for N between co-occurring grass plants, tree seedlings and soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 544-552

retrouvé). Ainsi les forts niveaux de fertilisation azotée favorisent le Dactyle et limitent le succès d'implantation du Frêne.

- Que l'enrichissement de l'atmosphère en CO<sub>2</sub> a un effet positif sur la croissance du Frêne quel que soit le niveau de fertilisation azotée et même en présence du Dactyle. Néanmoins cet impact positif lié au CO<sub>2</sub> est beaucoup plus faible que l'impact négatif de la présence de Dactyle sur la croissance du Frêne. L'effet du CO<sub>2</sub> sur le Dactyle dépend du niveau de fertilisation azotée : il est positif sur milieu riche en azote (+25%) et sans effet sur le milieu pauvre. L'absence d'effet du CO<sub>2</sub> sur la croissance du Dactyle au faible niveau d'azote peut s'expliquer par une limitation de la croissance du Dactyle par l'azote, renforcée par l'immobilisation microbienne de l'azote dans la biomasse microbienne plus élevée sous fort CO<sub>2</sub>. L'addition d'azote et l'enrichissement en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère augmente la quantité de N et C dans la biomasse microbienne uniquement en présence de Dactyle.

Les expériences avec addition d'azote confirment donc la contribution de la compétition racinaire pour la ressource azotée dans la compétition entre le Frêne et le Dactyle. Les quantités d'azote retrouvées dans le Frêne et l'analyse de la morphologie du Frêne qui présente des symptômes d'étiollement aux forts niveaux d'apport d'azote suggèrent également une contribution plus importante de la compétition aérienne pour la lumière aux forts niveaux de disponibilité en azote.

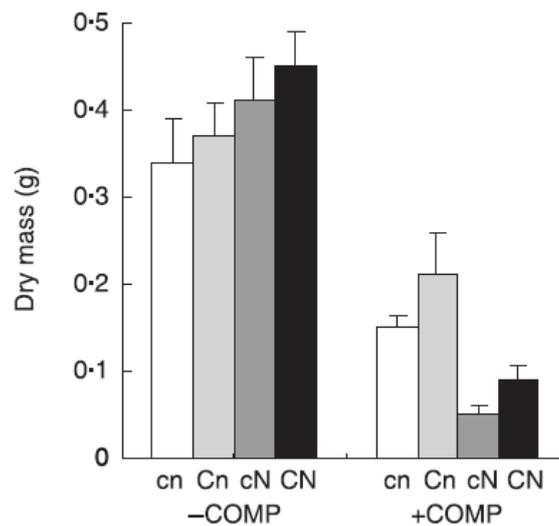


Figure 8 : Biomasse du Frêne sous les traitements de CO<sub>2</sub> et de N en présence (+COMP) ou en absence (-COMP) de la compétition herbacée. c = CO<sub>2</sub> à 380 ppm C = CO<sub>2</sub> à 665 ppm ; n, teneur ambiante, N teneur en azote élevée (+100 kN ha<sup>-1</sup>). Moyenne et écart-type de la moyenne (n=6) (from Bloor et al. 2007)<sup>18</sup>.

L'ensemble de ce travail sur cette période a confirmé la difficulté à anticiper la réponse des écosystèmes aux changements globaux en raison de la complexité des interactions entre les flux à l'œuvre dans ce cycle et des impacts différenciés en fonction du temps d'application des traitements. Au sein du sol, les changements possibles des populations microbiennes au cours du temps sous l'effet des changements renforcent également cette difficulté. Nous pouvons retenir que comparativement au facteur CO<sub>2</sub>, la disponibilité en azote est le facteur le plus déterminant des modifications observées que ce soit en court terme ou sur le long terme : il a en particulier des effets majeurs sur les activités de dénitrification et la compétition arbre-herbe.

Le développement de cette thématique a ensuite été pris en charge par Audrey Niboyet qui en a assuré le leadership. Je me suis investie dans les travaux dans ma nouvelle équipe pour contribuer aux avancées concernant les flux de C et N dans le système arbre sol.

### 3. La compétition entre les arbres et la biomasse microbienne pour l'acquisition de l'azote

Dans une première expérimentation avec Stéphane Bazot, nous avons mis en évidence que la biomasse microbienne était un puits important pour l'azote marqué apporté au sol (Bazot et al. 2016)**Erreur ! Signet non défini.** Dans une deuxième série de manipulations, j'ai souhaité confirmer cette compétition et affiner sa caractérisation en augmentant le nombre de répliquas et les points de prélèvements sur une nouvelle de manip. Nous avons réalisé une nouvelle campagne de mesure, dans le cadre du **stage de Master 2 de Liliana PINEK** (2016) où nous avons suivi le devenir d'une solution marquée en  $^{15}\text{N}$  appliquée sur le sol dans les différents compartiments de l'arbre (feuille, branches, racines), le sol rhizosphérique et la biomasse microbienne du sol. Nous sommes passés de 2 répliquas dans l'expérience 2010 (Bazot et al., 2016) à 5 dans l'expérience 2016 et réalisés 6 dates de prélèvements avant le stade « débourrement » et 4 dates de prélèvements du stade « débourrement » au stade « LAImax ». Ces mesures ont été complétées lors du stage de **Master 1 de Tania MAXWELL** (2017) en dosant le  $^{15}\text{N}$  dans les 3 cernes les plus externes du xylème secondaire et en finissant le dosage des dates que Liliana n'avait pas eu le temps de faire. La publication issue de ces données vient d'être acceptée à Plant and Soil (Maxwell et al. 2020)<sup>21</sup>. Un des principaux résultats de ce travail est la mise en évidence que la biomasse microbienne du sol est un pool important de la rétention d'azote en forêt.

Dans le détail, nos résultats :

- Montrent que **la biomasse microbienne du sol est pool important de rétention de l'azote dans les forêts** puisque qu'il représente environ 20 g d'azote / plot ce qui est équivalent 400 kg ha<sup>-1</sup> dans les premiers 15 cm de sol. Cette valeur peut être comparée à la quantité d'azote contenue dans les feuilles par plot qui est de 56 g N plot<sup>-1</sup> dans les feuilles (moyenne des valeurs du 10 au 21 juin) équivalant à 51 kg N ha<sup>-1</sup> si on considère une surface de houppier d'environ 11 m<sup>2</sup> (nos mesures).
- Confirment que **la biomasse microbienne du sol est un fort compétiteur potentiel pour l'azote**, puisqu'un jour après le marquage 40% du  $^{15}\text{N}$  apporté sont immobilisés dans la biomasse microbienne et que la quantité de  $^{15}\text{N}$  retrouvé dans la biomasse microbienne reste supérieure à 20% durant la quasi-totalité de l'expérience.
- Indiquent que **la construction des feuilles au printemps 2016 mobilise de l'azote du sol de manière plus précoce que celle précédemment constatée** sur une expérience réalisée en 2010 sur le même emplacement (Bazot et al., 2016). En effet nous montrons que le marquage apporté au sol peut se retrouver dans les feuilles de manière importante (15%) dès les 15 jours qui suivent le gonflement des bourgeons ce qui correspond à ce qui est habituellement identifié comme le stade « débourrement ». Cette apparition du marquage

---

21 Maxwell TL, Bazot S, Marmagne A, Pinek L, Laffont B, et al. (2020) In situ fate of mineral N in the tree-soil-microorganism system before and after budburst in 20-year-old Quercus petraea (Matt.) Liebl. Plant and Soil: 1-14

plus précoce que celle montrée par Bazot (2016) peut être mise en relation à des conditions environnementales différentes entre les deux années d'expérimentation : le printemps 2010 étant plus sec que le printemps 2016.

- **Suggèrent donc que la contribution relative de l'utilisation d'azote du sol et de la mobilisation des réserves de courte distance pour la synthèse des nouvelles feuilles dépend des conditions environnementales** liées à la disponibilité en eau.

#### 4. Identification des groupes microbiens présents

Dans cette expérimentation, nos efforts se sont également portés sur la caractérisation de la biomasse microbienne présente. En 2016, nous avons obtenu un financement par le labex BASC pour mettre en place une collaboration avec Valérie POUTEAU et Claire CHENU pour identifier et quantifier les grands groupes microbiens présents grâce aux PLFA (Phospho Lipid Fatty Acid). Ce fut l'objet du stage de **Master 2 de Baptiste LAFFONT (2017)**. Ces dosages ont permis de montrer que les bactéries représentaient 90% de la biomasse microbienne et que le niveau de leur abondance pouvait expliquer les variations de N mesurées dans la biomasse microbienne globale (Figure 9 : Evolution des proportion de bactéries et champignons du 1mars au 13 octobre 2016 sous une chênaie en forêt de Barbeau (article en préparation).

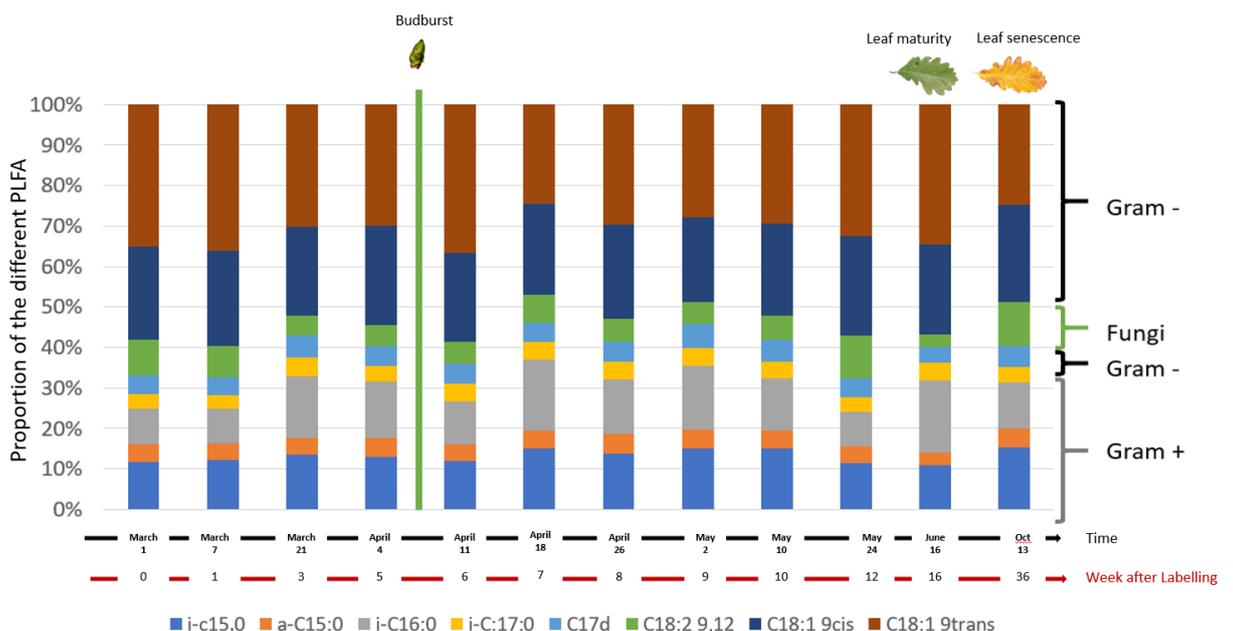


Figure 9 : Evolution des proportion de bactéries et champignons du 1mars au 13 octobre 2016 sous une chênaie en forêt de Barbeau (article en préparation)

Un deuxième aspect de ce travail, qui est en cours de finalisation, est de coupler les résultats acquis sur la teneur globale en C et N dans la biomasse microbienne totale avec ceux acquis sur la quantification des champignons et bactéries par les PLFA, pour connaître la proportion de C et N qui relève de ces deux groupes microbiens. Ces résultats permettront de faire le lien entre des entités biologiques identifiées et leur contenu élémentaire ce qui précisera la localisation des stocks de C et N dans au sein de la biomasse microbienne (Figure 10).

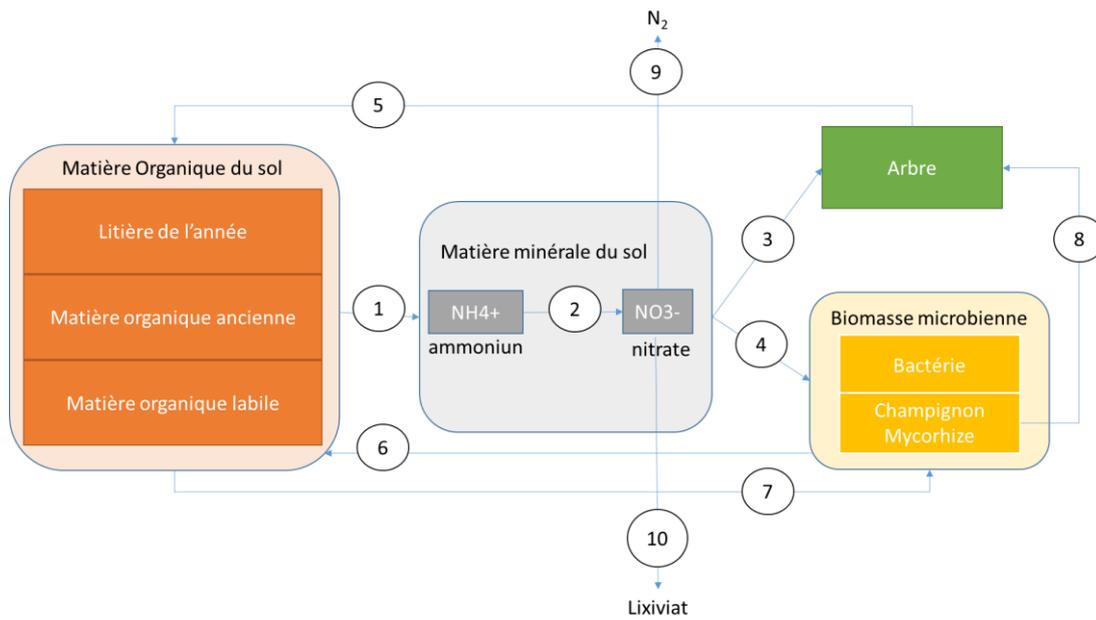


Figure 10 : Schéma conceptuel simplifié des flux d'azote dans le système arbre-sol-microflore : 1) Minéralisation de la matière organique du sol ; 2) Nitrification, 3) Absorption par les arbres, 4) Immobilisation microbienne, 5) Flux de matière provenant des arbres (feuilles, racines exsudats) 6) Mortalité microbienne (turn over) 7) Absorption microbienne de matière organique, 8) Flux de transfert de matière organique aux arbres via les mycorhizes, 9) Dénitrification, 10) Lixiviation

## IV. Projet de recherche

Nous avons vu dans la partie précédente comment, au cours de ma recherche, j'ai évolué d'une perspective agronomique orientée vers l'adaptation de l'agriculture aux changements globaux vers une perspective écologique pour comprendre les effets des changements globaux sur les écosystèmes. Les résultats de ma recherche ont mis en avant et précisé l'importance du cycle de l'azote pour comprendre l'adaptation des plantes et des activités microbiennes aux diverses pressions résultant de ces changements.

Désormais, ma perspective de recherche se situe à la croisée de ces deux champs de réflexion : dans une perspective souvent qualifiée « d'agro-écologique », je voudrais intégrer l'ensemble de mes résultats et questionnements sur le cycle de l'azote au sein d'un système agronomique.

Cette nouvelle perspective, en cours de construction, m'amène sur un terrain où problématiques appliquées et fondamentales se mêlent : il s'agira d'une part d'approfondir l'analyse du cycle de l'azote entre les sols et les systèmes racinaires de différentes plantes, et d'autre part de contribuer à la réflexion pour une agriculture moins polluante en termes de pollution azotée.

Ainsi, j'aimerais participer à la construction d'un nouveau modèle conceptuel décrivant les flux d'azote entre les microorganismes des sols, les plantes ou herbes superficielles, et les arbres. Ces flux pourront être caractérisés selon qu'ils induisent une compétition entre les organismes pour l'azote, ou au contraire une facilitation via des mécanismes de recyclage de l'azote. Ils pourront également être décrits au cours des saisons.

Au-delà de ses apports à l'écologie fondamentale, ce modèle répondra à des problématiques d'agroforesterie. En effet, l'azote est l'un des éléments les plus limitants de la croissance des plantes dans les écosystèmes tempérés. Sa faible disponibilité naturelle dans le sol conduit à l'utilisation massive d'engrais, avec comme conséquences négatives la pollution des nappes phréatiques par les nitrates et l'augmentation des pollutions azotées atmosphériques (Galloway et al. 2003). Ces pollutions conduisent à une augmentation de la concentration des gaz à effet de serre ( $N_2O$ ), à une augmentation de l'ozone et des aérosols troposphériques ainsi qu'à une destruction de l'ozone stratosphérique (Galloway et al. 2003). Cet ensemble de pollutions induit des problèmes sur la santé des hommes et des écosystèmes (Galloway et al. 2003 ; Rennenberg and Dannenmann 2015).

Ainsi, il est nécessaire de bien comprendre les rapports de compétition ou de facilitation entre les différentes composantes d'un écosystème agro-forestier pour permettre une utilisation optimisée de l'azote. Par ailleurs, les questionnements sur les cycles des cultures sont primordiaux en agroécologie. Un modèle évolutif au cours des saisons sera donc pertinent à ce titre.

Pour réaliser ce modèle, plusieurs pistes doivent être envisagées, qui permettront d'affiner les modèles existants (1 et 2). A plus court-terme, mon projet de recherche en cours permettra de contribuer à l'analyse des flux d'azote dans un système agro-forestier, pour comprendre dans quelle mesure les diverses composantes de cet écosystème contribuent à la limitation de la lixiviation de l'azote (3).

## 1. Projet 1 : Le cycle de l'azote au cours des saisons dans les systèmes arbre/sol

L'objectif général est de mieux comprendre le fonctionnement saisonnier des arbres en particulier en ce qui concerne la dynamique de l'azote dans le système sol-arbre en prenant en compte le fonctionnement du compartiment microbien du sol. Le projet vise à quantifier les fluctuations saisonnières des flux d'azote et de comprendre les liens entre ces flux et le fonctionnement de la microflore du sol. En particulier, il s'agira de quantifier l'absorption d'azote par les arbres et l'immobilisation microbienne d'azote à l'automne pour compléter la description du cycle de l'azote au cours des différentes périodes de l'année. Il s'agira également d'identifier les grands groupes microbiens impliqués dans cette immobilisation. *In fine*, ceci devrait nous permettre de dresser un modèle conceptuel, mécaniste et évolutif au cours des saisons, des relations entre les différents acteurs biotiques du cycle de l'azote entre sol et arbre.

## 2. Projet 2 : Contribution relative des champignons et des bactéries au pool de C et N de la biomasse microbienne

L'écologie fonctionnelle a pour objet l'étude des flux de matières entre les différents compartiments d'un écosystème. La caractérisation des pools de C et N est aisée quand les compartiments sont bien identifiés mais cela devient plus difficile dans le sol où la quantification des protagonistes présents est par elle-même une difficulté. Ceci conduit souvent à considérer les microorganismes du sol comme une boîte noire. Cette difficulté se concrétise aussi dans les modèles de flux de C et de N dans le sol où les entités modélisées restent virtuelles car elles ne correspondent pas à des groupes d'organismes réels identifiés.

La compréhension des processus qui ont lieu dans le sol fait généralement appel à deux approches qui ne se combinent pas. La première consiste à quantifier le C et le N dans le pool global de la biomasse microbienne sans connaissance plus fine de la diversité interne à ce pool. La deuxième consiste à identifier et quantifier les organismes présents par différentes techniques moléculaires sans être capables d'attribuer à ces organismes leur contribution spécifique au bilan de C et N du sol.

Ainsi, dans cet axe, mon projet de recherche consistera à préciser la contribution relative des champignons et de bactéries au bilan de carbone et azote total de la biomasse microbienne.

## 3. Projet 3 : La limitation de la lixiviation de l'azote par les systèmes agroforestiers

### 3.1 Problématique

**L'agroforesterie, est un mode d'exploitation agricole en expansion** qui vise d'une part à garantir une production agricole correcte avec des revenus garantis pour les agriculteurs, et d'autre part à préserver la biodiversité et protéger les sols de l'érosion et de la lixiviation des éléments nutritifs (Cardinael et al. 2020). C'est une forme de multi-culture qui consiste à combiner au moins une espèce ligneuse-pérenne avec une culture. Elle est considérée comme l'un des moyens les plus prometteurs de réduire la perte de nitrate avec d'autres avantages environnementaux importants (Somarriba 1992 ; Sinclair 1999). Étant donné que 80% des terres arables européennes ont été classées comme une zone à risque

potentiel d'érosion des sols et de lessivage des nitrates, l'agroforesterie peut être considérée comme un système alternatif d'utilisation des terres pour l'Europe (Reisner et al. 2007). Les pratiques agroforestières étaient courantes en Europe (Eichhorn et al. 2006) mais elles ont décliné en raison de l'intensification de l'agriculture (Herzog 1998). Ce renouveau dans les pratiques agricoles fait que ce système de culture est actuellement en plein essor (den Herder et al. 2017).

Si des études ont déjà été menées ou sont en cours concernant le rôle positif de l'agroforesterie sur la protection de la biodiversité des insectes, celles concernant la capacité des systèmes agroforestiers à limiter la **lixiviation des nutriments** en milieu tempéré sont peu nombreuses (Rowe et al.1998 ; Bergeron et al. 2011 ; Tully et al.2012) et reposent essentiellement sur de la modélisation (Dupraz et al., 2019) sans de larges confrontations à des données expérimentales. De même les arbres en agroforesterie sont considérés comme pouvant maintenir la fertilité du sol et limiter les apports d'engrais mais peu de données expérimentales appuient cette manière de voir les choses.

**Il est important maintenant d'apporter des preuves objectives justifiant ces changements de pratiques de l'agriculture conventionnelle vers une agriculture plus écoresponsable.** C'est l'objet de ce projet. Les données obtenues dans ce cadre pourront également être utiles pour le développement et la paramétrisation des modèles agroforestiers (Keesman et al., 2011).

#### **Qu'elle est la capacité des systèmes agroforestiers à limiter la lixiviation des nitrates ?**

Dans le système agroforestier, les arbres aux racines profondes peuvent potentiellement intercepter les nutriments entraînés par l'eau dans le profil du sol et capturer ce qui n'a pas été absorbé par la culture ou récupérer les nutriments qui se sont accumulés dans le sous-sol sous la profondeur d'enracinement des cultures annuelles (Vanlauwe et al. 2005). Ils peuvent également rentrer en compétition avec la culture pour la lumière ainsi que pour l'eau et les nutriments dans les horizons superficiels (Van Noordwijk et al. 2015). Les éléments nutritifs absorbés par les arbres sous la zone d'enracinement des cultures annuelles deviennent un intrant lorsqu'ils sont transférés au sol de surface sous forme de litière de feuilles, de racines et de fruit ainsi que des produits de la taille des branches (Schroth,1995). Cependant, à l'automne, la translocation de l'azote des feuilles vers les parties pérennes de l'arbre dans le cadre de la mise en réserve provoque une résorption de 40 à 80 % de l'azote foliaire (Millard and Proe 1991 ; Vizoso et al. 2008 ; Jordan et al. 2011 ; Millard and Grelet 2010 ; Babst and Coleman 2018) limitant les possibilités d'apport d'azote aux cultures. La capacité des arbres à rétrocéder de l'azote au culture est donc questionnée.

#### **Quelle est la capacité des arbres à rétrocéder l'azote absorbé à la culture l'année suivante ?**

Néanmoins, le développement du système racinaire des arbres permet aussi le développement d'une biomasse microbienne importante dans la rhizosphère de l'arbre augmentant la biomasse microbienne totale du sol et sa diversité (Lejon et al. 2005 ; Bloor et al. 2009). A la faveur des apports de carbone apportés les exsudats racinaires et le turnover racinaire (rhizodépôts), la biomasse microbienne rhizosphérique peut immobiliser de manière importante l'azote du sol (Diaz et al. 1993 ; Hungate 1999), limitant également sa lixiviation. L'azote contenu dans la biomasse microbienne constitue alors un réservoir temporaire d'azote qui pourra être restitué au sol et donc à l'arbre lors de son propre turnover. La biomasse microbienne du sol peut représenter jusqu'à 21% de l'azote présent dans un écosystème et de 82 à 400 kg N ha<sup>-1</sup> (Rennenberg and Dannenmann 2015 ; Maxwell et al. 2020. La biomasse microbienne du sol constitue donc un puits d'azote important qui reste cependant négligé dans les études.

### **La biomasse microbienne des sols peut-elle contribuer à limiter la lixiviation du nitrate ?**

Selon les systèmes agroforestiers, le sol entre les arbres d'une ligne d'arbres peut être valorisé par des cultures d'arbustes, de plantes aromatiques et médicinales ou bien simplement occupé par une zone enherbée (Cardinael et al. 2020). Cette zone enherbée peut avoir un rôle important dans le fonctionnement des agrosystèmes en particulier comme réservoir et source de mycorhizes pour les cultures (Battie-Laclau et al. 2020). Elle doit également participer à l'établissement d'un réservoir d'azote sous forme de litière et de biomasse microbienne associée. Il est donc crucial de la prendre en compte dans l'analyse du système.

### **Quelle est la contribution de la zone enherbée dans la rétention d'azote dans le système ?**

Dans ce projet, nous proposons donc d'évaluer comment le système « arbre-biomasse microbienne associée aux arbres-zone enherbée » contribue à limiter le lessivage des nitrates apportés par les engrais en récupérant l'azote lessivé

- ➔ Un marquage au  $^{15}\text{N}$  de l'engrais apporté permettra de quantifier la proportion de l'engrais retrouvé dans les différentes entités du système ce qui nous permettra d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de l'engrais et son devenir dans les différents pools et évaluer la capacité des arbres et de la bande herbacée à restituer l'azote à la culture les années suivantes.
- ➔ Les flux de lixiviation, de volatilisation et la dénitrification seront mesurés ou estimés pour évaluer la capacité des systèmes agroforestiers à limiter les pertes d'azote.
- ➔ Les microorganismes présents seront identifiés avec l'aide des PLFA (collaboration Valérie Pouteau et Claire Chenu, Laboratoire ECOSYS)

### 3.2 Proposition de stratégie pour répondre à ces questions : projet de thèse en cours

Ce projet sera développé dans la thèse de Mubarak MAHMUD, financée par l'institut de convergence C-LAND. Cette thèse est co-encadrée avec Stéphane Bazot, Paul Leadley et Nicolas Delpierre.

Ce travail se réalisera en collaboration avec Isabelle Bertrand et Jérôme Ngao de l'UMR ECO & SOL qui nous accueillent dans leur nouveau dispositif d'étude des systèmes agroforestiers DIAMs. Ce dispositif offre de nombreux avantages notamment d'être largement instrumenté et de posséder un dispositif expérimental permettant une analyse statistique des résultats (réplicats, différents témoins).

La stratégie repose d'une part sur la comparaison de la répartition de  $^{15}\text{N}$  apporté à la culture dans la culture, les arbres adjacents, la bande enherbée, la biomasse microbienne du sol dans un système agroforestier et en absence d'arbre ; et d'autre part sur la mesure ou la modélisation des flux de pertes d'azote.

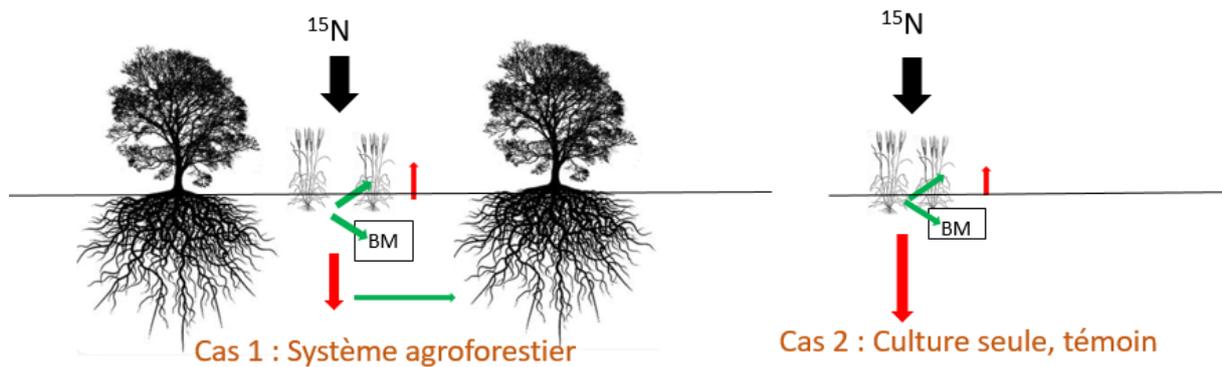


Figure 11 : Modèle représentant le système agroforestier. BM : Biomasse microbienne

Le marqueur se répartit de la manière suivante (Figure 11 : Modèle représentant le système agroforestier)

$^{15}\text{N}$  apporté =  $^{15}\text{N}$  absorbé par la culture +  $^{15}\text{N}$  immobilisé par la biomasse microbienne +  $^{15}\text{N}$  perdu par volatilisation +  $^{15}\text{N}$  perdu par dénitrification +  $^{15}\text{N}$  lixivié +  $^{15}\text{N}$  absorbé par l'arbre +  $^{15}\text{N}$  absorbé par la bande enherbée

**Cas 1 :**  $^{15}\text{N}$  lixivié (1) =  $^{15}\text{N}$  apporté (1) –  $^{15}\text{N}$  culture (1) –  $^{15}\text{N}$  BM (1) –  $^{15}\text{N}$  dénitrification (1) –  $^{15}\text{N}$  volatilisation (1) –  $^{15}\text{N}$  arbre (1) -  $^{15}\text{N}$  absorbé par la bande enherbée (1)

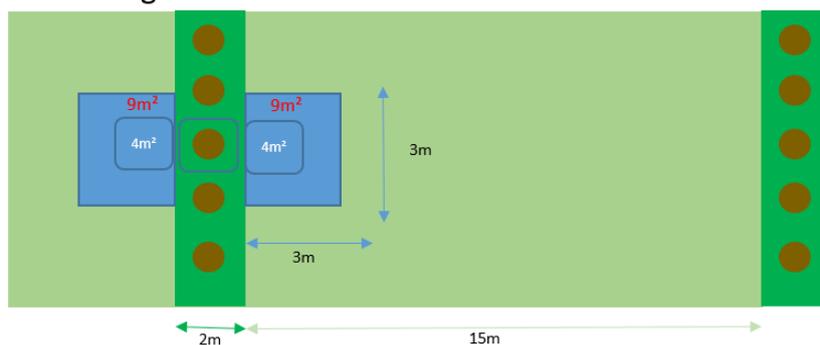
**Cas 2 :**  $^{15}\text{N}$  lixivié (2) =  $^{15}\text{N}$  apporté (2) –  $^{15}\text{N}$  culture (2) –  $^{15}\text{N}$  BM (2) –  $^{15}\text{N}$  dénitrification (2) –  $^{15}\text{N}$  volatilisation (2) –  $^{15}\text{N}$  arbre (2) -  $^{15}\text{N}$  absorbé par la bande enherbée (2)

Nous faisons l'hypothèse que :

$^{15}\text{N}$  lixivié (1) <  $^{15}\text{N}$  lixivié (2) car  $^{15}\text{N}$  arbre,  $^{15}\text{N}$  BM et  $^{15}\text{N}$  arbre et bande enherbée plus grand dans (1) que dans (2)

**Stratégie de marquage proposée :** La marquage se fera en même temps que les apports de fertilisant. La composition isotopique du fertilisant devra être déterminée avant son mélange avec le fertilisant. Le marqueur sera apporté mélangé au fertilisant sous la forme de  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  enrichi à 98% à raison de l'équivalent de  $5 \text{ kgN ha}^{-1}$  ce qui devrait être suffisant pour observer un signal dans les arbres et la culture (Bazot et al. 2016; Maxwell et al. 2020). Dans la parcelle forestière, le marquage s'effectuera sur une surface de  $9 \text{ m}^2$  de chaque côté de l'arbre de manière à obtenir un marquage uniforme de l'arbre (Figure 12 : stratégie de marquage proposée et permettre d'établir un bilan correct dans l'arbre. Dans la parcelle cultivée, une seule surface de  $9 \text{ m}^2$  sera marquée. Le marquage sera répliqué au minimum 3 fois et plus si les financements le permettent. Trois campagnes de prélèvement sont proposées : Au moment de la fertilisation pour avoir les T0 avant et après marquage. A la récolte pour connaître la répartition de l'azote. A l'automne et à la récolte suivante pour connaître les potentialités de restitutions de l'azote récupéré à la récolte suivante. Les prélèvements dans la culture seront faits à la récolte à deux distances de l'arbre pour mettre en évidence l'effet de la distance à l'arbre sur le rendement et prélèvement d'azote par la culture. Cette stratégie pourra être remaniée après discussion avec les collaborateurs.

### Parcelle agroforestière



### Parcelle cultivée

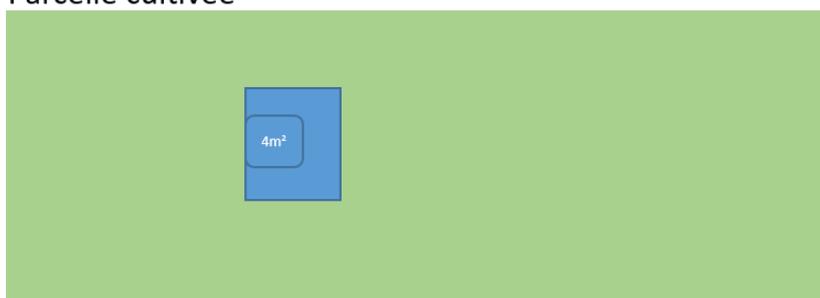


Figure 12 : stratégie de marquage proposée

**Estimation des stocks élémentaires et isotopiques :** La mesure des stocks de N et  $^{15}\text{N}$  se fera à partir des déterminations de biomasse et des analyses élémentaires et isotopiques des différents compartiments (Collaboration Anne Marmagne, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles).

#### Estimation des pertes azotées :

La lixiviation sera mesurée à l'aide de bougies poreuses et de l'estimation par modélisation du flux d'eau de la nappe drainante et de la classification de pédotransfert de Jarmagne de manière similaire à Marie Benoit dans sa thèse (Benoit 2014).

Les pertes par volatilisation et dénitrification seront évaluées par modélisation et confrontées aux données de terrain que l'UMR Eco and Sol souhaite réaliser. Les choix des modèles à utiliser (modèles DNDC, Hi-Safe, STICS, autres) est encore en cours d'évaluation.

#### 3.3 Résultats attendus

L'ensemble de ces données permettra de mettre en évidence :

- ➔ l'impact des systèmes agroforestier sur la lixiviation de l'azote
- ➔ d'établir la contribution de chaque entité (arbre, bande enherbée, biomasse microbienne, culture) dans la rétention d'azote par le système agroforestier
- ➔ identifier les grands groupes microbiens présents et leur contribution respective au bilan d'azote
- ➔ évaluer la capacité des arbres et de la bande enherbée à rétrocéder à la culture suivante une partie de l'azote apporté.

## CONCLUSION

La rédaction de cette H.D.R. a été l'occasion de prendre du recul sur ma carrière et sur le cheminement intellectuel qu'elle m'a permis d'opérer. Partant d'une perspective agronomique, à la recherche du rendement, je me suis orientée vers des problématiques écologiques, à la recherche d'interactions, de flux, de complexité des mécanismes à l'œuvre dans les écosystèmes. J'espère contribuer à l'importation de cette perspective dans l'agriculture de demain.

A bien des égards, mon évolution est à l'image de celle qu'effectuent nos sociétés. Prenant conscience de la complexité du vivant, des interdépendances, l'homme cherche désormais à inclure les problématiques écologiques dans ses modes de production. Le changement de paradigme opéré par l'agroforesterie par exemple, le mène à concevoir son action comme un élément compris au sein d'un écosystème plus vaste. Fondamentalement, c'est peut-être cette évolution de notre cadre conceptuel qui sera le remède le plus efficace aux conséquences néfastes des activités anthropiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aber JD (1992) Nitrogen cycling and nitrogen saturation in temperate forest ecosystems. *Trends In Ecology* 7: 220-224.
- Achouak W, Abrouk D, Guyonnet J, Barakat M, Ortet P, Simon L, Lerondelle C, Heulin T, Haichar FEZ (2019) Plant hosts control microbial denitrification activity. *FEMS Microbiology Ecology* 95.
- Babst BA, Coleman GD (2018) Seasonal nitrogen cycling in temperate trees: Transport and regulatory mechanisms are key missing links. *Plant Sci* 270: 268-277. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.02.021.
- Barbaroux C, Bréda N, Dufrêne E (2003) Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 157: 605-615.
- Bassirirad H, Gutschick VP, Lussenhop J (2001) Root system adjustments: regulation of plant nutrient uptake and growth responses to elevated CO<sub>2</sub>. *Oecologia* 126: 305-320.
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant and Soil* 453: 153-171.
- Bazot S, Fresneau C, Damesin C, Barthes L (2016) Contribution of previous year's leaf N and soil N uptake to current year's leaf growth in sessile oak. *Biogeosciences* 13: 3475-3484. doi: 10.5194/bg-13-3475-2016.
- Benoit M (2014) Les fuites d'azote en grandes cultures céréalières: Lixiviation et émissions atmosphériques dans des systèmes biologiques et conventionnels du bassin de la Seine (France).
- Bergeron M, Lacombe S, Bradley RL, Whalen J, Cogliastro A, Jutras M-F, Arp P (2011) Reduced soil nutrient leaching following the establishment of tree-based intercropping systems in eastern Canada. *Agroforestry Systems* 83: 321-330.
- Bernhard-Reversat F, Poupon H (1980) Nitrogen cycling in a soil-tree system in a sahelian savanna: example of *Acacia senegal*. In: R. T. (ed) *Proceedings of a workshop arranged by the SCOPE/UNEP, Ibadan, Nigeria*.
- Biederbeck VO, Campbell CA (1973) SOIL MICROBIAL ACTIVITY AS INFLUENCED BY TEMPERATURE TRENDS AND FLUCTUATIONS. *Canadian Journal of Soil Science* 53: 363-376. doi: 10.4141/cjss73-053.
- Billen G, Garnier J, Nemery J, Sebilo M, Sferratore A, Barles S, Benoit P, Benoit M (2007) A long-term view of nutrient transfers through the Seine river continuum. *Sci Total Environ* 375: 80-97. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.12.005.
- Bloor JMG, Leadley PW, Barthes L (2007) Responses of *Fraxinus excelsior* seedlings to grass-induced above- and below-ground competition. *Plant Ecology* 194: 293-304. doi: 10.1007/s11258-007-9292-y.
- Bloor JMG, Niboyet A, Leadley PW, Barthes L (2009) CO<sub>2</sub> and inorganic N supply modify competition for N between co-occurring grass plants, tree seedlings and soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 544-552. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.12.013.
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, Spranger T, Alkemade R, Ashmore M, Bustamante M, Cinderby S, Davidson E, Dentener F, Emmett B, Erisman J-W, Fenn M, Gilliam F, Nordin A, Pardo L, de Vries W (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications* 20: 30-59.
- Bond B (2000) Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science* 5: 349-353.
- Bradley RL, Fyles JW (1995) Growth of paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings increases soil available C and microbial acquisition of soil-nutrients. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 1565-1571. doi: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00089-W](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00089-W).

- Bryla DR, Eissenstat DM (2005) Respiratory costs of mycorrhizal associations. *plant respiration*. Springer.
- Cardinael R, Mao Z, Chenu C, Hinsinger P (2020) Belowground functioning of agroforestry systems: Recent advances and perspectives. Springer.
- Castro-Rodríguez V, Cañas RA, de la Torre FN, Pascual MB, Avila C, Cánovas FM (2017) Molecular fundamentals of nitrogen uptake and transport in trees. *Journal of Experimental Botany* 68: 2489-2500.
- Chapin FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *BioScience* 37: 49-57.
- Chapin III SF (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual review of ecology and systematics* 11: 233-260.
- Cicerone RJ (1989) Analysis of sources and sinks of atmospheric nitrous oxide (N<sub>2</sub>O). *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 94: 18265-18271.
- Conant RT, Ryan MG, Ågren GI, Birge HE, Davidson EA, Eliasson PE, Evans SE, Frey SD, Giardina CP, Hopkins FM, Hyvönen R, Kirschbaum MUF, Lavelle JM, Leifeld J, Parton WJ, Megan Steinweg J, Wallenstein MD, Martin Wetterstedt JÅ, Bradford MA (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates – synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change Biology* 17: 3392-3404. doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02496.x.
- Cotrufo M, Gorissen A (1997) Elevated CO<sub>2</sub> enhances below-ground C allocation in three perennial grass species at different levels of N availability. *New Phytologist* 137: 421-431.
- Davidson EA, Hart SC, Shanks CA, K. FM (1991) Measuring gross nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification by <sup>15</sup>N isotopic pool dilution in intact soil cores *Journal of Soil Sciences* 42: 335-349.
- DeLucia EH, Drake JE, Thomas RB, Gonzalez-Meler M (2007) Forest carbon use efficiency: is respiration a constant fraction of gross primary production? *Global Change Biology* 13: 1157-1167. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01365.x>.
- den Herder M, Moreno G, Mosquera-Losada RM, Palma JHN, Sidiropoulou A, Santiago Freijanes JJ, Crous-Duran J, Paulo JA, Tomé M, Pantera A, Papanastasis VP, Mantzanas K, Pachana P, Papadopoulos A, Plieninger T, Burgess PJ (2017) Current extent and stratification of agroforestry in the European Union. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 241: 121-132. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.005>.
- Diaz S, Grime J, Harris J, McPherson E (1993) Evidence of a feedback mechanism limiting plant response to elevated carbon dioxide. *Nature* 364: 616-617.
- Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann For Sci* 46: 631s-647s.
- Dik E (1984) Estimating the wood volumes of standing trees in forestry practice. *Uitvoering Verslag De Dorschkamp* (Netherlands).
- Dise N, Rothwell J, Gauci V, Van der Salm C, De Vries W (2009) Predicting dissolved inorganic nitrogen leaching in European forests using two independent databases. *Science of the Total Environment* 407: 1798-1808.
- Dise NB, Wright RF (1995) Nitrogen leaching from European forests in relation to nitrogen deposition. *For Ecol Manage* 71. doi: 10.1016/0378-1127(94)06092-w.
- Dommergues Y, Duhoux E, Diem HG (1999) Les arbres fixateurs d'azote: caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. *Espaces* 34, Montpellier.
- Dong S, Cheng L, Scagel CF, Fuchigami LH (2002) Nitrogen absorption, translocation and distribution from urea applied in autumn to leaves of young potted apple (*Malus domestica*) trees. *Tree Physiology* 22: 1305-1310.
- Drake JE, Raetz LM, Davis SC, DeLucia EH (2010) Hydraulic limitation not declining nitrogen availability causes the age-related photosynthetic decline in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant, Cell & Environment* 33: 1756-1766. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02180.x.

- Ehrenfeld JG, Parsons WFJ, Han X, Parmelee RW, Zhu W (1997) Live and dead roots in forest soil horizons: contrasting effects on nitrogen dynamics. *Ecology* 78: 348-362. doi: [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1997\)078\[0348:LADRIF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1997)078[0348:LADRIF]2.0.CO;2).
- Eichhorn MP, Paris P, Herzog F, Incoll LD, Liagre F, Mantzanas K, Mayus M, Moreno G, Papanastasis VP, Pilbeam DJ, Pisanelli A, Dupraz C (2006) Silvoarable Systems in Europe – Past, Present and Future Prospects. *Agroforestry Systems* 67: 29-50. doi: 10.1007/s10457-005-1111-7.
- El Zein R, Breda N, Gerant D, Zeller B, Maillard P (2011) Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an in situ (<sup>15</sup>N) labeling approach. *Tree Physiology* 31: 1390-1400. doi: 10.1093/treephys/tpr118.
- Ellis (1979) The most abundant protein in the world TIBS: 241-244.
- Farley R, Fitter A (1999) Temporal and spatial variation in soil resources in a deciduous woodland. *Journal of Ecology* 87: 688-696.
- Fierer N, Colman BP, Schimel JP, Jackson RB (2006) Predicting the temperature dependence of microbial respiration in soil: A continental-scale analysis. *Global Biogeochemical Cycles* 20: n/a-n/a. doi: 10.1029/2005gb002644.
- Fontaine S, Bardoux G, Benest D, Verdier B, Mariotti A, Abbadie L (2004) Mechanisms of the Priming Effect in a Savannah Soil Amended with Cellulose. *Soil Science Society of America Journal* 68: 125. doi: 10.2136/sssaj2004.0125.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35: 837-843. doi: 10.1016/s0038-0717(03)00123-8.
- Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465: 219-235.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M (2013) The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20130164. doi: 10.1098/rstb.2013.0164.
- Foyer CH, Ferrario-Méry S, Noctor G (2001) Interactions between carbon and nitrogen metabolism. *Plant nitrogen*. Springer.
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MM (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME journal* 1: 19-27.
- Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ (2003) The nitrogen cascade. *BioScience* 53: 341-356.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, Cleveland C, Green P, Holland E (2004) Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70. doi: 10.1007/s10533-004-0370-0.
- Genet H, Bréda N, Dufrene E (2010) Age-related variation in carbon allocation at tree and stand scales in beech (*Fagus sylvatica* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. *Tree Physiology* 30: 177-192.
- Gessler A, Schneider S, Von Sengbusch D, Weber P, Hanemann U, Huber C, Rothe A, Kreuzer K, Rennenberg H (1998) Field and laboratory experiments on net uptake of nitrate and ammonium by the roots of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees. *New Phytol* 138: 275-285.
- Guo Y, Chen F, Zhang F, Mi G (2005) Auxin transport from shoot to root is involved in the response of lateral root growth to localized supply of nitrate in maize. *Plant Science* 169: 894-900.
- Habel JC, Dengler J, Janišová M, Török P, Wellstein C, Wiezik M (2013) European grassland ecosystems: threatened hotspots of biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 22: 2131-2138. doi: 10.1007/s10531-013-0537-x.
- Heller R, Esnault R, Lance C (2004) *Physiologie végétale - Tome 1, Nutrition*. Dunod, Paris.
- Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez JC, Martin-Laurent F, Brauman A, Philippot L (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of microbiological methods* 59: 327-335.

- Herzog F (1998) Streuobst: a traditional agroforestry system as a model for agroforestry development in temperate Europe. *Agroforestry Systems* 42: 61-80. doi: 10.1023/a:1006152127824.
- Hoch G, Richter A, Körner C (2003) Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell & Environment* 26: 1067-1081.
- Hodge A, Fitter AH (2010) Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 13754-13759.
- Hodge A, Robinson D, Fitter A (2000) Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? *Trends in Plant Science* 5: 304-308. doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01656-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01656-3).
- Hodge A, Storer K (2015) Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant and Soil* 386: 1-19.
- Högberg P (2007) Nitrogen impacts on forest carbon. *Nature* 447: 781-782. doi: 10.1038/447781a.
- Horz H-P, Barbrook A, Field CB, Bohannan BJ (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 15136-15141.
- Howitt SM, Udvardi MK (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465: 152-170.
- Hungate BA (1999) Ecosystem responses to rising atmospheric CO<sub>2</sub>: feedbacks through the nitrogen cycle. *Carbon dioxide and environmental stress*. Elsevier.
- Hungate BA, Dukes JS, Shaw MR, Luo Y, Field CB (2003) Atmospheric science. Nitrogen and climate change. *Science* 302: 1512-1513. doi: 10.1126/science.1091390.
- Imsande J, Touraine B (1994) N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiology* 105: 3.
- Jackson LE, Schimel JP, Firestone MK (1989) Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 409-415.
- Jackson LE, Strauss RB, Firestone MK, Bartolome JW (1998) Plant and soil nitrogen dynamics in California annual grassland *Plant and Soil* 110: 9-17.
- Jordan M-O, Wendler R, Millard P (2011) Autumnal N storage determines the spring growth, N uptake and N internal cycling of young peach trees. *Trees* 26: 393-404. doi: 10.1007/s00468-011-0600-8.
- Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Fuchslueger L, Schnecker J, Schweiger P, Rasche F, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitsch A, Richter A (2010) Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytologist* 187: 843-858. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03321.x>.
- Kaur A, Chaudhary A, Kaur A, Choudhary R, Kaushik R (2005) Phospholipid fatty acid—a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*: 1103-1112.
- Kirkham D, Bartholomew WV (1955) Equations for Following Nutrient Transformations in Soil, Utilizing Tracer Data: II. *Soil Science Society of America Journal* 19: 189-192. doi: <https://doi.org/10.2136/sssaj1955.03615995001900020020x>.
- Kuypers MM, Marchant HK, Kartal B (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology* 16: 263.
- Leake J, Johnson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 82: 1016-1045.
- LeBauer DS, Treseder KK (2008) Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371-379.
- Lejon DP, Chaussod R, Ranger J, Ranjard L (2005) Microbial community structure and density under different tree species in an acid forest soil (Morvan, France). *Microbial Ecology* 50: 614-625.
- Li X, Rennenberg H, Simon J (2016) Seasonal variation in N uptake strategies in the understorey of a beech-dominated N-limited forest ecosystem depends on N source and species. *Tree Physiology* 36: 589-600. doi: 10.1093/treephys/tpv132.

- Lilleskov EA, Kuyper TW, Bidartondo MI, Hobbie EA (2019) Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: a review. *Environ Pollut* 246: 148-162.
- Luo Y, Su B, Currie WS, Dukes JS, Finzi A, Hartwig U, Hungate B, McMurtrie RE, Oren R, Parton WJ (2004) Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *BioScience* 54: 731-739.
- Maes SL, Perring MP, Vanhellefont M, Depauw L, Van den Bulcke J, Brümelis G, Brunet J, Decocq G, den Ouden J, Härdtle W, Hédli R, Heinken T, Heinrichs S, Jaroszewicz B, Kopecký M, Máliš F, Wulf M, Verheyen K (2019) Environmental drivers interactively affect individual tree growth across temperate European forests. *Global Change Biology* 25: 201-217. doi: 10.1111/gcb.14493.
- Magnani F, Mencuccini M, Borghetti M, Berbigier P, Berninger F, Delzon S, Grelle A, Hari P, Jarvis PG, Kolari P, Kowalski AS, Lankreijer H, Law BE, Lindroth A, Loustau D, Manca G, Moncrieff JB, Rayment M, Tedeschi V, Valentini R, Grace J (2007) The human footprint in the carbon cycle of temperate and boreal forests. *Nature* 447: 848-850. doi: 10.1038/nature05847.
- Marmann P, Wendler R, Millard P, Heilmeyer H (1997) Nitrogen storage and remobilization in ash (*Fraxinus excelsior*) under field and laboratory conditions. *Trees* 11: 298-305. doi: 10.1007/pl00009675.
- Maxwell TL, Bazot S, Marmagne A, Pinek L, Laffont B, Vincent G, Barthes L (2020) In situ fate of mineral N in the tree-soil-microorganism system before and after budburst in 20-year-old *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Plant and Soil*: 1-14.
- Millard P, Grelet GA (2010) Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology* 30: 1083-1095. doi: 10.1093/treephys/tpq042.
- Millard P, Nielsen GH (1989) The Influence of Nitrogen Supply on the Uptake and Remobilization of Stored N for the Seasonal Growth of Apple Trees. *Annals of Botany* 63: 301-309. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a087746.
- Millard P, Proe M (1991) Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. *New Phytologist* 117: 587-596.
- Miller AJ, Cramer MD (2005) Root Nitrogen Acquisition and Assimilation. *Plant and Soil* 274: 1-36. doi: 10.1007/s11104-004-0965-1.
- Morin X, Améglio T, Ahas R, Kurz-Besson C, Lanta V, Lebourgeois F, Miglietta F, Chuine I (2007) Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology* 27: 817-825. doi: 10.1093/treephys/27.6.817.
- Morot-Gaudry JF (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes: Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris.
- Mosier A, Kroeze C, Nevison C, Oenema O, Seitzinger S, Van Cleemput O (1998) Closing the global N<sub>2</sub>O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient cycling in Agroecosystems* 52: 225-248.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U (2009) Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182: 31-48. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x.
- Niboyet A, Le Roux X, Dijkstra P, Hungate BA, Barthes L, Blankinship J, Brown J, Field C, Leadley P (2011) Testing interactive effects of global environmental changes on soil nitrogen cycling. *Ecosphere* 2: 1-24.
- Nicolardot B, Fauvet G, Cheneby D (1994) Carbon and nitrogen cycling through soil microbial biomass at various temperatures. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 253-261.
- Nuñez LMV, Gérant D, Maillard P, Bréda N (2010) Seasonal dynamics of total soluble proteins in adult trees of *Quercus petraea* (Matts.) Liebl. and *Fagus sylvatica* L. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1: 75-83.

- Nunez LMV, Gérant D, Maillard P, Bréda N, Cervantes GG, Cohen IS (2011) Evidence for a 26kDa vegetative storage protein in the stem sapwood of mature pedunculate oak. *Interciencia* 36: 142-147.
- Peyraud J-L, Peeters A, A. DV (2012) Place et atouts des prairies permanentes en France et en Europe. *Fourrages* 211: 195-204.
- Philippot L, Hallin S, Schloter M (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in agronomy* 96: 249-305.
- Pinay G, Barbera P, Carreras-Palou A, Fromin N, Sonié L, Couteaux MM, Roy J, Philippot L, Lensi R (2007) Impact of atmospheric CO<sub>2</sub> and plant life forms on soil microbial activities. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 33-42.
- Poly F, Wertz S, Brothier E, Degrange V (2008) First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS microbiology ecology* 63: 132-140.
- Pregitzer KS, Euskirchen ES (2004) Carbon cycling and storage in world forests: biome patterns related to forest age. *Global Change Biology* 10: 2052-2077.
- Prevost-Boure NC, Christen R, Dequiedt S, Mougél C, Lelievre M, Jolivet C, Shahbazkia HR, Guillou L, Arrouays D, Ranjard L (2011) Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS one* 6: e24166.
- Prosser JI (1990) Autotrophic Nitrification in Bacteria. In: AH Rose, DW Tempest (eds) *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press.
- Raynaud X, Lata J-C, Leadley PW (2006) Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant and Soil* 287: 95-116. doi: 10.1007/s11104-006-9003-9.
- Rebulard S (2018) *Le défi alimentaire*. Belin.
- Reich PB, Hobbie SE, Lee T, Ellsworth DS, West JB, Tilman D, Knops JM, Naeem S, Trost J (2006) Nitrogen limitation constrains sustainability of ecosystem response to CO<sub>2</sub>. *Nature* 440: 922-925. doi: 10.1038/nature04486.
- Reisner Y, de Filippi R, Herzog F, Palma J (2007) Target regions for silvoarable agroforestry in Europe. *Ecological Engineering* 29: 401-418. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.09.020>.
- Rennenberg H, Dannenmann M (2015) Nitrogen Nutrition of Trees in Temperate Forests—The Significance of Nitrogen Availability in the Pedosphere and Atmosphere. *Forests* 6: 2820-2835.
- Ryan M, Binkley D, Fownes JH (1997) Age-related decline in forest productivity: pattern and process. *Advances in ecological research*. Elsevier.
- Saggar S, Jha N, Deslippe J, Bolan NS, Luo J, Giltrap DL, Kim DG, Zaman M, Tillman RW (2013) Denitrification and N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Sci Total Environ* 465: 173-195. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.050.
- Sarathchandra S, Perrott K, Littler R (1989) Soil microbial biomass: influence of simulated temperature changes on size, activity and nutrient-content. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 987-993.
- Schimel JP, Bennett J (2004) Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology* 85: 591-602.
- Scott EE, Rothstein DE (2011) Amino acid uptake by temperate tree species characteristic of low-and high-fertility habitats. *Oecologia* 167: 547-557.
- Selosse M-A (2000) *La symbiose: structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*. Vuibert.
- Shahzad T, Chenu C, Genet P, Barot S, Perveen N, Mougín C, Fontaine S (2015) Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biology and Biochemistry* 80: 146-155. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.09.023.
- Shenk MK (1996) Regulation of nitrogen uptake on the whole plant level. *Plant and Soil* 181: 131-137.
- Silla F, Escudero A (2003) Uptake, demand and internal cycling of nitrogen in saplings of Mediterranean *Quercus* species. *Oecologia* 136: 28-36. doi: 10.1007/s00442-003-1232-5.

- Simon J, Dannenmann M, Pena R, Gessler A, Rennenberg H (2017) Nitrogen nutrition of beech forests in a changing climate: importance of plant-soil-microbe water, carbon, and nitrogen interactions. *Plant and Soil* 418: 89-114.
- Sinclair FL (1999) A general classification of agroforestry practice. *Agroforestry Systems* 46: 161-180. doi: 10.1023/a:1006278928088.
- Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology* 67: 6-20.
- Smith MS, Tiedje JM (1979) Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 11: 261-267.
- Somarriba E (1992) Revisiting the past: an essay on agroforestry definition. *Agroforestry Systems* 19: 233-240. doi: 10.1007/bf00118781.
- Sparks JP (2009) Ecological ramifications of the direct foliar uptake of nitrogen. *Oecologia* 159: 1-13. doi: 10.1007/s00442-008-1188-6.
- Stein LY, Klotz MG (2016) The nitrogen cycle. *Current Biology* 26: R94-R98.
- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell & Environment* 22: 583-621.
- Sutton MA, Mason KE, Sheppard LJ, Sverdrup H, Haeuber R, Hicks WK (2014) Nitrogen deposition, critical loads and biodiversity. Springer Science & Business Media.
- Thomas QR, Canham CD, Weathers KC, Goodale CL (2009) Increased tree carbon storage in response to nitrogen deposition in the US. *Nature Geoscience* 3: 13. doi: 10.1038/ngeo721.
- Tiedje JM (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Biology of anaerobic microorganisms* 717: 179-244.
- Touraine B (2000) Nutrition. Pour la science Edition Belin: 158.
- Tsay Y-F, Chiu C-C, Tsai C-B, Ho C-H, Hsu P-K (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS letters* 581: 2290-2300.
- Ueda MU, Mizumachi E, Tokuchi N (2010) Winter nitrate uptake by the temperate deciduous tree *Quercus serrata*. *Journal of Forest Research* 15: 411-414. doi: 10.1007/s10310-010-0219-4.
- Valenzuela Nunez LM (2006) Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composés azotés et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes: effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves. Nancy 1.
- van Noorden GE, Verbeek R, Dinh QD, Jin J, Green A, Ng JLP, Mathesius U (2016) Molecular Signals Controlling the Inhibition of Nodulation by Nitrate in *Medicago truncatula*. *Int J Mol Sci* 17: 1060. doi: 10.3390/ijms17071060.
- Van Noordwijk M, Lawson G, Hairiah K, Wilson J (2015) Root distribution of trees and crops: competition and/or complementarity. *Tree-Crop Interactions: Agroforestry in a Changing Climate* CABI, Wallingford, UK: 221-257.
- Vanlauwe B, Aihou K, Tossah BK, Diels J, Sanginga N, Merckx R (2005) *Senna siamea* trees recycle Ca from a Ca-rich subsoil and increase the topsoil pH in agroforestry systems in the West African derived savanna zone. *Plant and Soil* 269: 285-296. doi: 10.1007/s11104-004-0599-3.
- Varik M, Aosaar J, Ostonen I, Lõhmus K, Uri V (2013) Carbon and nitrogen accumulation in belowground tree biomass in a chronosequence of silver birch stands. *Forest Ecology and Management* 302: 62-70. doi: 10.1016/j.foreco.2013.03.033.
- Vicca S, Luysaert S, Penuelas J, Campioli M, Chapin FS, Ciais P, Heinemeyer A, Högberg P, Kutsch WL, Law BE, Malhi Y, Papale D, Piao SL, Reichstein M, Schulze ED, Janssens IA (2012) Fertile forests produce biomass more efficiently. *Ecol Lett (Print)* 15: 520-526.
- Vitousek PM, Matson PA, Van Cleve K (1989) Nitrogen availability and nitrification during succession: primary, secondary, and old-field seres. *Plant and Soil* 115: 229-239.
- Vizoso S, Gerant D, Guehl JM, Joffre R, Chalot M, Gross P, Maillard P (2008) Does elevation of CO<sub>2</sub> concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? *Tree Physiology* 28: 1729-1739.

- Vries W, Reinds GJ, Gundersen P, Sterba H (2006) The impact of nitrogen deposition on carbon sequestration in European forests and forest soils. *Glob Change Biol* 12. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01151.x.
- Vries W, Solberg S, Dobbertin M, Sterba H, Laubhann D, Oijen M, Evans C, Gundersen P, Kros J, Wamelink G (2009) The impact of nitrogen deposition on carbon sequestration by European forests and heathlands. *For Ecol Manage* 258. doi: 10.1016/j.foreco.2009.02.034.
- Wrage N, Velthof G, Van Beusichem M, Oenema O (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1723-1732.
- Xu C, Fisher R, Wullschleger SD, Wilson CJ, Cai M, McDowell NG (2012) Toward a mechanistic modeling of nitrogen limitation on vegetation dynamics. *PLoS one* 7: e37914.
- Zak DR, Holmes WE, MacDonald NW, Pregitzer KS (1999) Soil temperature, matric potential, and the kinetics of microbial respiration and nitrogen mineralization. *Soil Science Society of America Journal* 63: 575-584.
- Zak DR, Pregitzer KS, Curtis PS, Teeri JA, Fogel R, Randlett DL (1993) Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and feedback between carbon and nitrogen cycles. *Plant and Soil* 151: 105-117.
- Zelles L (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils* 29: 111-129. doi: <https://doi.org/10.1007/s003740050533>.
- Zhang C, Liu G, Xue S, Zhang C (2012) Rhizosphere soil microbial properties on abandoned croplands in the Loess Plateau, China during vegetation succession. *European Journal of Soil Biology* 50: 127-136. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.002>.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616.