# Thèse de doctorat

Biologie cellulaire et moléculaire spécialité biotechnologies végétales

présentée à

## L'Université de Picardie Jules Verne

par

Guillaume LEBAS

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

# *Etude du métabolisme carboné et azoté de Miscanthus x giganteus*

Soutenue le 28/09/2012, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

| | |
|---|---|
| M. B. Hirel, Directeur de Recherches | Rapporteur |
| M. J. Le Gouis, Directeur de Recherches | Rapporteur |
| M. G. Decocq, Professeur | Examinateur |
| Mme. M. Brancourt, Chargée de Recherches | Co-directrice de thèse |
| M. F. Dubois, Professeur | Directeur de thèse |

## REMERCIEMENTS

Dans un premier temps je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer à celui-ci, et en particulier Bertrand Hirel et Jacques Le Gouis pour y tenir le rôle de rapporteur de mon manuscrit ainsi que Guillaume Decocq pour son rôle d'examinateur. Je remercie également la région Picardie pour son financement du projet MISCAZOTE dans lequel s'inscrit ma thèse et le FEDER pour le financement de la thèse.

Je tiens à remercier Frédéric pour son encadrement tout au long de ces quatre années de thèse et notamment durant la rédaction épineuse de ce manuscrit, sans jamais perdre son sens de l'humour ni sa patience. Je pense qu'il me faudra encore méditer quelques années afin de maitriser entièrement ton précepte « du-donc-auquel » qui, il faut le dire, reste encore obscur pour certains initiés bien plus sages que moi. Un grand merci à Maryse, notamment pour ses encouragements et les corrections lors de la dernière ligne droite de cette rédaction.

Je voudrai remercier également les autres membres de l'équipe AEB avec qui j'ai eu la chance de travailler quotidiennement. Manuella, qui m'a accueilli dans son bureau durant deux années et m'a beaucoup aidé pour les analyses IRMS et les enseignements. Anthony, pour les nombreuses heures passées en tête à tête avec le broyeur à billes à ma place. Thomas, pour les longues discussions, et ses recommandations pour la thèse et l'après. David, Jérôme, Thierry, M. et Mme Sangwan pour leurs mots d'encouragement, et Vivien, Benjamin, Gérard et N'Diaga pour les moments passés à « tchopèrer » devant le hall entre deux manips. Je n'oublie pas les stagiaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet : Arthur, Romain, Baptiste, Matthieu et Cindy. Certains continuant dans cette voix, j'aime à croire que je n'ai pas dû être un si mauvais maître de stage…

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai collaboré sur le projet MISCAZOTE aussi bien lors la mise en place des expérimentations que lors des prélèvements aux champs ou des parties de baby-foot durant la pause du midi à Estrées-Mons.

Je n'oublie pas Jean-Xavier, ancien thésard de l'équipe, avec qui j'ai collaboré sur les analyses par RMN. Karine et Sophie, elles aussi ex-membres de l'équipe, avec qui j'ai toujours pu discuter recherche et de milliers d'autres choses parfois surprenantes. Je remercie également les autres membres du laboratoire avec qui j'ai partagé les salles de manip, les

pauses café et déjeuner et beaucoup de bons moments pendant ces quatre années. Une pensée particulière aux thésards et post-doc partis du laboratoire et qui ont contribué à faire de ces années un souvenir inoubliable : Roro, Jojo, Jéjé, M. Ndong et Linda. Il en va de même pour Fabien et Christopher qui ont en plus dû supporter la vision apocalyptique de mon bureau durant ces deux dernières années et qui seront les prochains à vivre l'expérience de la rédaction (courage les gars!!!).

J'aimerai remercier à présent les membres de ma famille. Tout d'abord mes parents qui m'ont fait confiance et m'ont permis de reprendre mes études même si ça ne semblait pas gagné. Hélène, Mathieu, Sébastien, Tatiana, Marion et Justine pour leur soutien et pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail. Ma belle-famille picarde et vosgienne qui a toujours cru en moi et m'a toujours encouragé.

Un grand merci aux amis que j'ai la chance de connaitre depuis la maternelle pour certains, ou depuis le lycée ou l'université pour les autres : Bubub, Aurélie et Carla, Lapin, Pauline et Clémentine, Bourriquet, Jenny et Maxou, Dave, Camille et Elioth, Cyril et Diana et Oliv et Maïté. Qui aurait parié il y quelques années qu'on allait faire de moi un docteur? Vous avez été une véritable bouffée d'oxygène lors de chaque moment passé ensemble depuis le début de la rédaction même si ces derniers sont devenus trop rares.

Mes dernières pensées vont vers Laëtitia. Tu m'as pris la main il y a huit ans et n'as cessé chaque jour de me guider et de me soutenir. Tu m'as permis d'arriver jusqu'ici aujourd'hui et de m'envoler vers le Danemark demain… Sans toi je ne serai jamais allé aussi loin. Merci pour ton aide précieuse jusqu'aux dernières lignes du manuscrit et d'avoir supporté le rythme étrange qui a accompagné cette longue période de rédaction.

## SOMMAIRE

**LISTE DES FIGURES** 9

**LISTE DES TABLEAUX** 12

**ABREVIATIONS** 13

**INTRODUCTION GENERALE** 15

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE** 17

**I- Le miscanthus** 17

**I-1 Origine** 17

**I-2 Physiologie de la plante** 19

**I-3 Culture du miscanthus** 21

I-3-1 Implantation 21

I-3-2 Récolte 21

I-3-3 Fertilisation 22

I-3-4 Irrigation et traitement 23

**II- Synthèse des principaux glucides non structuraux** 24

**II-1 Fixation du $CO_2$** 24

II-1-1 Différents types de photosynthèse 24

II-1-2 Métabolisme photosynthétique de miscanthus 25

II-1-3 Avantages du métabolisme des plantes C4 à enzyme malique NADP dépendante chloroplastique 27

**II-2 Synthèse des glucides dans les feuilles en C4** 28

II-2-1 Saccharose 28

II-2-2 Amidon 30

**II-3 Synthèse des glucides de réserve** 32

II-3-1 Amidon 32

II-3-2 Fructanes 33

II-3-3 Glucomannanes 35

**III- Synthèse des molécules azotées** 36

**III-1 Absorption du nitrate et de l'ammonium** 37

III-1-1 Absorption du nitrate 37

III-1-2 Réduction du nitrate en ammonium 38

*III-1-2-1 Nitrate Réductase (NR)* 38

*III-1-2-2 Nitrite Réductase (NiR)* 39

III-1-3 Absorption de l'ammonium 39

**III-2 Assimilation de l'ammonium** 39

III-2-1 Cycle GS/GOGAT 40

*III-2-1-1 Glutamine synthétase (GS)* 41
*III-2-1-1-1 GS2* 41
*III-2-1-1-2 GS1* 42
*III-2-1-1-3 Régulation de l'expression de la GS* 44
*III-2-1-2 Glutamate synthase (GOGAT)* 44
III-2-2 Glutamate déshydrogénase (GDH) 45
III-2-3 Asparagine synthétase (AS) 46
**III-3 Synthèse des acides aminés et des protéines** 48
III-3-1 Synthèse des acides aminés 48
III-3-2 Synthèse des protéines 50
**IV- Transport et remobilisation des molécules carbonées et azotées** 52
**IV-1 Transport** 52
IV-1-1 Transport des molécules carbonées 52
IV-1-2 Transport des molécules azotées 53
**IV-2 Remobilisation** 54
IV-2-1 Remobilisation des molécules carbonées 54
IV-2-2 Remobilisation des molécules azotées 56
**OBJECTIFS DE L'ETUDE** 59
**MATERIELS ET METHODES** 60
**I- Matériel végétal** 60
**I-1 Dispositif 1** 60
**I-2 Dispositif 2** 61
**I-3 Dispositif 3** 62
**I-4 Dispositif 4** 62
**II- Méthodes d'analyse** 64
**II-1 Analyses élémentaires** 64
**II-2 Analyse des métabolites** 67
II-2-1 Analyse des ions 67
II-2-2 Analyse des acides aminés libres 68
II-2-3 Dosage des glucides non structuraux 69
**II-3 Analyse des protéines** 74
II-3-1 Dosage des protéines solubles 74
II-3-2 Dosage des activités enzymatiques 74
II-3-3 Western-blots 79
**II-4 Analyse RMN** 81
**II-5 Analyses cytologiques** 83
**II-6 Analyses statistiques** 84

**RESULTATS ET DISCUSSIONS** 85

**I- Stockage et dynamique saisonnière des glucides non structuraux dans les rhizomes et pousses de *Miscanthus x giganteus*.** 85

**I-1 Introduction** 85

**I-2 Matériel et méthodes** 87

I-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental 87

I-2-2 Extraction et dosages des glucides non structuraux 89

*I-2-2-1 Extraction et dosage des sucres libres* 89

*I-2-2-2 Extraction et dosage de l'amidon* 90

*I-2-2-3 Extraction et dosage des fructanes et des glucommananes* 90

I-2-3 Analyses cytologiques 90

I-2-4 Analyses statistiques 91

**I-3 Résultats** 92

I-3-1 Dosages enzymatiques des sucres 92

*I-3-1-1 Etude des sucres de réserves des organes souterrains durant l'hiver* 92

*I-3-1-2 Etude des sucres dans les organes souterrains au cours de la croissance sur un cycle annuel* 93

*I-3-1-3 Etude des sucres dans les tiges au cours de l'année* 96

*I-3-1-4 Etude des sucres dans les feuilles au cours de l'année* 98

I-3-2 Etude cytologique 101

**I-4 Discussion** 104

I-4-1 Stockage de glucides de réserve dans les parties souterraines de miscanthus en hiver 104

I-4-2 Remobilisation printanière des réserves carbonées des parties souterraines 105

I-4-3 Synthèse des glucides dans les feuilles en été et automne 106

I-4-4 Etude du saccharose 107

I-4-5 Reconstitution des réserves glucidiques 108

I-4-6 Bilan des flux glucidiques 109

**I-5 Conclusion** 112

**II- L'asparagine et l'arginine jouent un rôle central dans le stockage et la remobilisation de l'azote chez *Miscanthus x giganteus*** 113

**II-1 Introduction** 113

**II-2 Matériel et méthodes** 115

II-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental 115

II-2-2 Extraction et dosages 117

*II-2-2-1 Dosages C/N et excès isotopiques ($^{15}N$)* 117
*II-2-2-2 Extraction des acides aminés* 117
*II-2-2-3 Dosage des acides aminés totaux* 117
*II-2-2-4 Dosage des acides aminés individuels* 118
*II-2-2-5 Extraction et dosage des protéines* 118
*II-2-2-6 Extraction et dosages des ions* 118
*II-2-2-7 Analyses statistiques* 119
**II-3 Résultats** 120
II-3-1 Variation des quantités d'azote total chez *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance : mise en évidence de trois phases clés 120
II-3-2 Etude des teneurs et des quantités d'azote dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* 122
II-3-3 Etude des teneurs en acides aminés et en protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* 125
II-3-4 Relations entre les teneurs en azote et les acides aminés et entre les teneurs en azote et en protéines dans les organes de *Miscanthus x giganteus* 128
II-3-5 Dosages des acides aminés individuels dans les rhizomes de *Miscanthus x giganteus* 131
II-3-6 Dosage des ions nitrate et ammonium chez *Miscanthus x giganteus* 134
II-3-7 Etude des teneurs et des flux d'azote $^{15}N$ dans les plantes de *Miscanthus x giganteus* cultivées en condition N2 137
**II-4 Discussion** 140
II-4-1 Remobilisation printanière et automnale de l'azote 140
II-4-2 Formes de l'azote chez *Miscanthus x giganteus* 141
II-4-3 Etude de l'apport d'azote chez *Miscanthus x giganteus* 145
**II-5 Conclusion** 148
**III- Approches physiologiques et intégrées de la remobilisation printanière et de la remobilisation automnale des réserves azotées dans le *Miscanthus x giganteus*** 150
**III-1 Introduction** 150
**III-2 Matériel et méthodes** 151
III-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental 151
III-2-2 Extraction et dosages 152
*III-2-2-1 Dosages C/N et excès isotopiques ($^{15}N$)* 152
*III-2-2-2 Méthode de calcul du flux de mobilisation des parties souterraines* 152
*III-2-2-3 Extraction et dosages des acides aminés* 153
*III-2-2-4 Dosages des protéines et des activités GS et GDH* 154

*III-2-2-5 Western-blot* 154
*III-2-2-6 Marquage $^{15}N$ et analyse de l'assimilation d'azote par RMN* 155
*III-2-2-7 Etudes cytologiques* 157
*III-2-2-8 Statistiques* 157
**III-3 Résultats** 158
III-3-1 Remobilisation de l'azote des parties souterraines 158
III-3-2 Réduction des nitrates 158
III-3-3 Etude des acides aminés libres 161
*III-3-3-1 Analyse des acides aminés pendant la phase de remobilisation printanière* 162
*III-3-3-2 Analyse des acides aminés pendant la phase de remobilisation automnale* 164
*III-3-3-3 Analyse des acides aminés de transport* 165
*III-3-3-4 Etude des relations entre l'arginine et la glutamine dans les rhizomes* 166
III-3-4 Etude des activités GS et GDH 167
*III-3-4-1 Etude des activités GS durant les phases de remobilisation printanière et automnale* 168
*III-3-4-2 Etude des activités GDH durant les phases de remobilisation printanière et automnale* 173
III-3-5 Etude de la synthèse d'asparagine 175
III-3-6 Etude l'assimilation de l'azote par RMN 175
**III-4 Discussion** 178
III-4-1 Réduction des nitrates 178
III-4-2 Remobilisation printanière de l'azote des parties souterraines 179
III-4-3 Assimilation de l'azote dans les parties aériennes 182
III-4-4 Remobilisation automnale de l'azote vers les parties souterraines 185
**III-5 Conclusion** 188
**DISCUSSION GENERALE** 189
**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES** 197
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 200
**RESUME** 218

## LISTE DES FIGURES

- **Synthèse bibliographique**

**Figure 1.** Phénotypes de *Miscanthus x giganteus* et de ces deux géniteurs : *M. sinsensis* et *M. sacchariflorus* 17
**Figure 2.** Relations phylogénétiques entre le miscanthus le switchgrass, le sorgho, le maïs, et la canne à sucre 18
**Figure 3.** Cycle de croissance annuel du miscanthus 19
**Figure 4.** Schéma simplifié du métabolisme photosynthétique dans un chloroplaste de plante C3 25
**Figure 5.** Schéma du métabolisme photosynthétique C4 à enzyme malique NADP dépendante chloroplastique 26
**Figure 6.** Structure du saccharose 28
**Figure 7.** Synthèse du saccharose 29
**Figure 8.** Structure de l'amidon 30
**Figure 9.** Structure interne d'un grain d'amidon 32
**Figure 10.** Structure des trisaccharides des fructanes 33
**Figure 11.** Structure des glucomannanes 35
**Figure 12.** Représentation du cycle GS/GOGAT 41
**Figure 13.** Représentation des activités aminante et désaminante de la GDH 45
**Figure 14.** Représentation de l'activité asparagine synthétase 47
**Figure 15.** Représentation schématique de l'assimilation de l'ammonium et de la synthèse des autres acides aminés 49

- **Matériels et méthodes**

**Figure 1.** Représentation schématique du « sandwich » de transfert 80

- **Résultats et Discussions**
  - **Stockage et dynamique saisonnière des glucides non structuraux dans les rhizomes et pousses de *Miscanthus x giganteus***

**Figure 1.** Anatomie des parties basses de *Miscanthus x giganteus* 88
**Figure 2.** Cycle de croissance annuel de *Miscanthus x giganteus* 89
**Figure 3.** Dosages des glucides de réserves dans les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* durant l'hiver 92

**Figure 4.** Dosages des glucides dans les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle 94
**Figure 5.** Dosages des glucides dans les rhizomes secondaires et les tiges de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle 97
**Figure 6.** Dosages des glucides dans les feuilles de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle 99
**Figure 7.** Localisation histologique des glucides 103
**Figure 8.** Schématisation des flux de glucides au sein de *Miscanthus x giganteus* au cours d'un cycle de croissance 110

❖ **L'asparagine et l'arginine jouent un rôle central dans le stockage et la remobilisation de l'azote chez *Miscanthus x giganteus***

**Figure 1.** Dosages de l'azote total dans les parties souterraines et aériennes de *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance 120
**Figure 2.** Ratios d'azote contenu dans les parties souterraines et aériennes de *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance 121
**Figure 3.** Proportions d'azote et teneurs en azote contenues dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* 123
**Figure 4.** Concentration en acides aminés et protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* 126
**Figure 5.** Relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en acides aminés ou les teneurs en protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* 129
**Figure 6.** Proportions des principaux acides aminés dans les rhizomes des plantes de *Miscanthus x giganteus* en fin de cycle 132
**Figure 7.** Proportion de l'arginine et de l'asparagine par rapport à l'ensemble des acides aminés des rhizomes 132
**Figure 8.** Relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en azote des acides aminés dans les différents rhizomes de *Miscanthus x giganteus* 134
**Figure 9.** Dosage des ions nitrates et ammonium dans les plantes entières de *Miscanthus x giganteus* en conditions N1 et N2 au cours de l'année 135
**Figure 10.** Dosage des ions nitrate et ammonium dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 au mois de juin 136
**Figure 11.** Evolution des quantités d'azote marqué ($^{15}N$) dans les plantes de *Miscanthus*

*x giganteus* ayant subi ou non un apport d'azote marqué $^{15}N$ en avril 138

❖ **Approches physiologiques et intégrées de la remobilisation printanière et de la remobilisation automnale des réserves azotées dans le *Miscanthus x giganteus***

**Figure 1.** Dosages des activités NR dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet 159

**Figure 2.** Western-blot réalisés sur dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet avec des anticorps anti-NR 160

**Figure 3.** Dosages des activités NR dans les feuilles basses et hautes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet 161

**Figure 4.** Proportion des cinq acides aminés (Arg, Asn, Asp, Gln et Glu) par rapport à l'ensemble des acides aminés libres 163

**Figure 5.** Proportions des acides aminés de la sève xylemienne durant la phase de mobilisation 166

**Figure 6.** Relations entre les proportions d'arginine et de glutamine dans les rhizomes de *Miscanthus x giganteus* cultivées en condition N1 167

**Figure 7.** Dosages des activités GS dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 169

**Figure 8.** Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation printanière avec des anticorps anti-GS 170

**Figure 9.** Immunolocalisation histologique de la GS 172

**Figure 10.** Dosages des activités GDH dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 174

**Figure 11.** Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation avec des anticorps anti-GDH 174

**Figure 12.** Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation avec des anticorps anti-AS 175

**Figure 13.** Spectres RMN HSQC et HMBC de feuilles marquées à t = 3h et t = 6h 177

**Figure 14.** Schéma du catabolisme de l'arginine 181

**Figure 15.** Schéma du métabolisme des acides aminés et des amines chez les plantes 184

## LISTE DES TABLEAUX

- **Synthèse bibliographique**

**Tableau 1.** Les cinq types de fructans présentes dans les plantes et leur plante respective 34

- **Matériels et méthodes**

**Tableau 1.** Composition du tampon d'extraction pour le dosage de l'activité NR 75
**Tableau 2.** Composition du tampon de réaction EDTA 75
**Tableau 3.** Composition du tampon d'extraction pour le dosage des activités GS/GDH 76
**Tableau 4.** Composition du milieu réactionnel pour le dosage des activités GS 77
**Tableau 5.** Composition du milieu réactionnel pour le dosage des activités GDH 78

- **Résultats et Discussions**
  - **L'asparagine et l'arginine jouent un rôle central dans le stockage et la remobilisation de l'azote chez *Miscanthus x giganteus***

**Tableau 1.** Données des régressions multiples standardisées 131

## ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| $^{15}N$ | Azote avec un marquage isotopique |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AOA | Oxaloacétate |
| ARN | Acide ribonucléique |
| AS | Asparagine synthétase |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BS | Gaine périvasculaire |
| BSA | Sérum albumine bovine |
| c | Cortex |
| C3 | Photosynthèse de type C3 |
| C4 | Photosynthèse de type C4 |
| CAM | Photosynthèse de type Crassulacean Acid Metabolism |
| cc | Cylindre central |
| $CO_2$ | Dioxyde carbone |
| e | Endoderme |
| Fb | Feuilles basses |
| Fh | Feuilles hautes |
| Fm | Feuilles moyennes |
| GDH | Glutamate déshydrogénase |
| GOGAT | Glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase |
| GS | Glutamine synthétase |
| HATS | High affinity transport system, système de transport à haute affinité |
| IRMS | Isotope-ratio mass spectrometry, spectrométrie de masse à ratio isotopique |
| LAI | Leaf area index, indice de surface foliaire |
| LATS | Low affinity transport system, système de transport à faible affinité |
| MS | Matière sèche |
| N1 | Condition standard de culture, sans apport d'azote |
| N2 | Condition de culture avec apport d'azote (120 kg/ha) |
| $N_2$ | Diazote |
| NAD/H | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADP/H | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |

| | |
|---|---|
| $NH_4^+$ | Ion ammonium |
| NiR | Nitrite réductase |
| $NO_2^-$ | Ion nitrite |
| $NO_3^-$ | Ion nitrate |
| NR | Nitrate réductase |
| NUE | Nitrogen use efficiency, efficacité de l'utilisation de l'azote |
| NUpE | Nitrogen Uptake Efficiency, efficacité de l'absorption de l'azote |
| NUtE | Nitrogen Utilization efficiency, efficacité de l'assimilation de l'azote |
| $O_2$ | Dioxygène |
| P | Coupe précoce |
| PEP | Phosphoénol pyruvate |
| PGA | Acide 3-phosphoglycérique |
| Ph | Phloème |
| Pi | Phosphate inorganique |
| Rac | Racines |
| Rhi | Rhizome primaire |
| RhII | Rhizome secondaire |
| RMN | Nuclear magnetic resonance, spectromètre de résonance magnétique nucléaire |
| RSA | Rapport d'allocation spécifique |
| rubisco | Ribulose bis phosphate carboxylase oxygénase |
| RuBP | Ribulose-1,5-bisphosphate |
| SDS-PAGE | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium |
| T | Coupe tardive |
| Tb | Tiges basses |
| Th | Tiges hautes |
| Tm | Tiges moyennes |
| UDP | Uridine diphosphate |
| UTP | Uridine triphosphate |
| vb | Faisceau vasculaire |
| VSP | Vegetative storage protein, protéines de stockage végétatives |
| Xy | Xylème |

# INTRODUCTION GENERALE

Dans un contexte écologique et économique difficile (réchauffement climatique, diminution des réserves de carburant fossiles, la hausse du prix de ces carburants) la production de biocarburants de première, deuxième voire de troisième génération est de plus en plus mise en avant.

Les biocarburants de première génération sont fabriqués à partir de graines de céréales ou d'oléagineux (colza, tournesol), de racines (betterave) ou de fruits (palmiers à huile). Cependant les organes utilisés pour cette production sont généralement utilisés pour la consommation humaine grâce à leur capacité de stockage de sucre, d'amidon ou d'huile. Dans ce cas la production de biocarburants se fait au détriment de la production alimentaire. L'impact de ces biocarburants de première génération sur le prix des denrées alimentaires et sur l'environnement ont causé de plus en plus d'inquiétudes et ont conduit à une mauvaise presse de ces productions ces dernières années.

Suite aux limites des biocarburants de première génération, la meilleure alternative pour la production de biocarburants a semblé être l'utilisation de biomasse végétale. Ce sont les biocarburants de deuxième génération. Le terme «biomasse végétale» désigne de manière générale la matière lignocellulosique qui représente la majorité des matériaux non alimentaires, bon marché et peu utilisé provenant des plantes (Naik *et al.*, 2010). Ces biocarburants lignocellulosiques présentent l'avantage de réduire les émissions de gaz à effet de serre de 85% par rapport aux carburants classiques (Wang *et al.*, 2007).

Actuellement, en parallèle du développement de biocarburant de deuxième génération, la mise en place d'une troisième génération est au stade expérimental. Les pistes de recherche principales sont la production d'hydrogène, d'éthanol ou de biogaz par des micro-algues (*Dunaliella sp, Chlorococum sp, Chlamydomonas, Spirulina*) (Costa et Greque de Morais, 2011).

Une bonne plante candidate à la fabrication de biocarburants doit présenter plusieurs caractéristiques. Pour Nonhebel (2002) une plante possède un fort potentiel si le rendement énergétique provenant de sa transformation en biocarburant est plus important que celui issu de la production de cette plante et des intrants nécessaires à la culture. Dans ce cas, le *Miscanthus x giganteus* semble être un bon candidat (Greef et Deuter, 1993; Clifton-Brown *et al.*, 2004). De plus, le *Miscanthus x giganteus* semble être une culture énergétique idéale, car elle possède les caractéristiques suivantes: fort coefficient de conversion de l'énergie

lumineuse pour la production de biomasse, haute efficacité d'utilisation de l'eau et haut niveau d'efficacité d'utilisation de l'azote dans les feuilles (Taylor *et al*., 2010). Ceci s'observe dans des conditions climatiques fraiches et tempérées (Lewandowski *et al*., 2000). Enfin une culture énergétique doit potentiellement augmenter l'accumulation du carbone organique du sol par la séquestration du carbone et ainsi minimiser les émissions de gaz à effet de serre. Elle devrait également présenter l'avantage supplémentaire d'améliorer la structure des sols et la disponibilité des nutriments (Hansen *et al.*, 2004). Le miscanthus remplissant également cette condition, ceci en fait un des meilleurs candidats pour la production de biocarburants de deuxième génération.

Le miscanthus est une plante vivace originaire d'Asie de la famille des Poacées (Hastings *et al*., 2008). La récolte du miscanthus peut se faire à deux dates différentes : en automne ou en hiver. En automne (mi-octobre) la plante contient son maximum de biomasse : elle est au stade floraison, n'a pas encore perdu beaucoup de feuilles mais contient encore beaucoup d'humidité. En hiver (fin février) la plante a perdu plupart de ses feuilles et son potentiel de rendement est moins important qu'en octobre. Par contre, elle a perdu beaucoup d'humidité. Son rendement en biomasse en Europe (sans irrigation et selon les conditions climatiques) varie de 15 à 25 t de matière sèche par hectare pour la récolte d'automne et de 7 à 19 t de matière sèche par hectare pour la récolte d'hiver (Clifton-Brown *et al.*, 2004). La forte productivité du miscanthus peut s'expliquer par son métabolisme photosynthétique particulier, dit « en C4 », que partagent également d'autres plantes d'origine tropicale : maïs, canne à sucre, sorgho. Grâce à ce métabolisme, la plante est plus efficace dans la captation du gaz carbonique et dans la transformation de ce gaz carbonique en matière organique qui pourra permettre la production de biomasse. Une autre grande particularité du miscanthus est que, lors de récoltes tardives, la fertilisation azotée semble avoir peu d'influence sur sa production de biomasse (Christian *et al.*, 2008).

Afin de comprendre comment cette plante était capable de produire aussi rapidement autant de biomasse sans apport d'azote, nous nous sommes intéressés à son métabolisme carboné ainsi qu'à son métabolisme azoté. Nous avons commencé par identifier et quantifier les glucides non structuraux de la plante au cours de son cycle de développement. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les différentes formes d'azote présentes dans chaque organe de la plante. Enfin nous avons identifié les enzymes clés du métabolisme azoté afin de définir les phases d'assimilation et de remobilisation de l'azote au sein de la plante au cours d'un cycle annuel de croissance.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I- Le miscanthus

### I-1 Origine

Le miscanthus a été observé pour la première fois par Anderson en 1885. Cette plante, utilisée majoritairement en ornementation botanique, n'est étudiée pour son fort potentiel de biomasse que depuis quelques années (Jones et Walsh, 2001).

La culture du miscanthus en Europe est principalement basée sur une seule espèce, *Miscanthus x giganteus* (*M. giganteus*). Cette dernière est un hybride naturel issu d'un croisement deux espèces (figure 1) : *Miscanthus sinensis*, espèce diploïde (2x=2n=38) décrite comme étant auto-incompatible et *Miscanthus sacchariflorus*, espèce tétraploïde (4x=2n = 76) (Greef et Deuter, 1993).

*Miscanthus sinensis* *Miscanthus sacchariflorus* *Miscanthus x giganteus*

**Figure 1 : Phénotypes de *Miscanthus x giganteus* et de ces deux géniteurs : *M. sinensis* et *M. sacchariflorus***
(INRA)

*Miscanthus x giganteus* est une espèce triploïde avec 3x=2n=57 chromosomes. Cette triploïdie a une répercussion directe sur la fertilité et la stabilité génétique. En effet, les triploïdes, et d'une manière générale les polyploïdes impairs, sont toujours fortement stériles,

ce qui se vérifie pour *Miscanthus x giganteus*. Des études cytogénétiques soulignent la difficulté pour cette espèce, d'acquérir la fertilité par le doublement de ses chromosomes en raison du grand nombre d'univalents (Linde-Laursen 1993).

Les plantes de miscanthus disponibles aujourd'hui en Europe sont issues d'une partie des clones prélevés en 1935 à Yokohama au Japon qui ont ensuite été repiqués au Danemark (Greef et Deuter, 1993).

La taxonomie de *Miscanthus x giganteus* a été définie par Greef et Deuter en 1993. Il appartient à la famille des Poaceae, à la sous-famille des Panicoidae, à la tribu des Andropogonae et à la section des Sacchariniae. Selon la classification proposée par Adati et Shiotani (1958), dans Greef et Deuter (1993), le genre Miscanthus est organisé en quatre sections: Triarrhena (*M. sacchariflorus*, *M. giganteus*), Eumiscanthus (*M. sinensis*, *M. floridulus*, *M. condensatus*), Kariyasua (*M. oligostachyus*) et Diandra (*M. nepalensis*).

Il a également été montré que le genre miscanthus est taxonomiquement proche du switchgrass, du sorgho et du maïs, et plus proche encore de la canne à sucre (figure 2, Lawrence and Walbot, 2007).

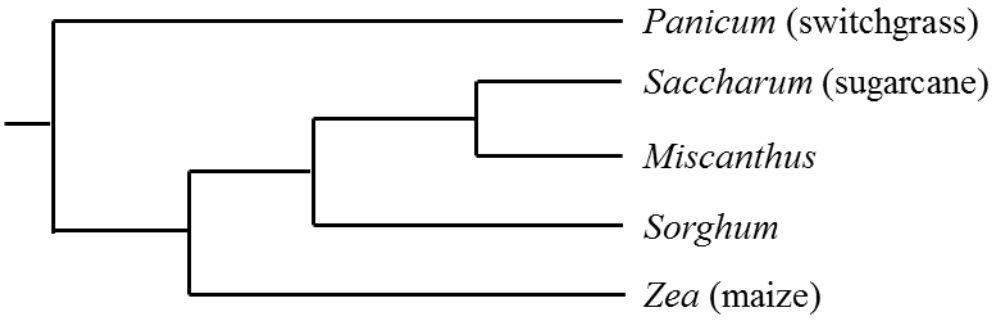



**Figure 2 : Relations phylogénétiques entre le miscanthus le switchgrass, le sorgho, le maïs, et la canne à sucre**
(Lawrence and Walbot, 2007).

Les premiers travaux de Li *et al.* (1961) ont montré une homologie partielle des chromosomes de miscanthus à ceux de quelques espèces de *Saccharum*. Ceci peut être renforcé par le fait que la variabilité génétique de la canne à sucre peut être augmentée grâce à des croisements avec des miscanthus (Cai *et al.*, 2005). Une amélioration de la production de matière sèche a également été constatée sur des hybrides en F1 issue du croisement entre *Saccharum* et miscanthus (Burner *et al.*, 2009).

Le genre miscanthus contient plus de 20 espèces, la plupart d'entre elles étant situées sur un large éventail de zones géographiques. Les aptitudes de cette plante à l'hybridation et à la polyploïdie rendent favorable une dispersion à large échelle, grâce à une création constante de génotypes adaptés. Le genre se répartit ainsi sur un large panel de climats et de sols. Probablement originaire d'Asie de l'est, il occupe les zones subtropicales et tempérées chaudes de l'Asie du sud-est, de l'Inde et du Pacifique, jusqu'au Japon (Clifton et Lewandowski, 2002). Ces plantes se trouvent aussi bien sur des sols secs, humides, salés ou pollués (Clifton-Brown *et al.*, 2008). Des clones similaires à ceux de *Miscanthus x giganteus* ont été observés à l'état spontané en Asie (Greef et Deuter, 1993). Les données concernant l'écologie de *Miscanthus x giganteus* sont rares, il peut s'implanter dans des zones ayant une plus forte amplitude de température que ses géniteurs (Lewandovski *et al.*, 2000).

**<u>I-2 Physiologie de la plante</u>** (figure 3)

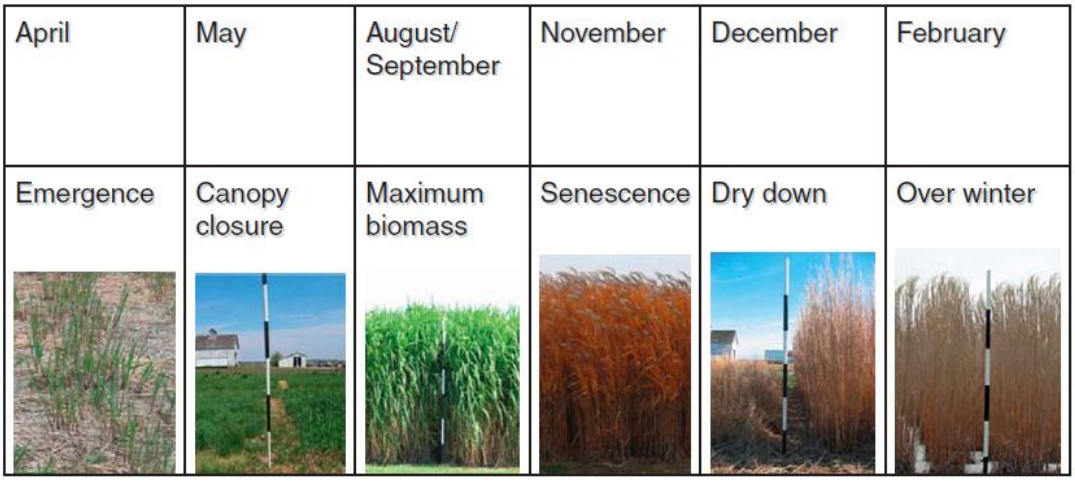



**Figure 3 : Cycle de croissance annuel du miscanthus**
(Heaton *et al.*, 2010)

Le miscanthus est une plante pérenne rhizomateuse. Les pousses de miscanthus commencent à émerger du sol dès le début du printemps. Le nombre de pousses produit par plante augmente rapidement au cours des mois de mai, juin et juillet (jusqu'à 40 tiges / plante pour *Miscanthus x giganteus*, Bullard *et al.*, 1997). Pendant la période de croissance, le nombre de pousses diminue jusqu'à 25 tiges / plante. Ce phénomène peut être comparé au phénomène de régression de talles observé chez certaines graminées tels que le blé ou l'orge (Aspinall, 1961 ; Thorne, 1962 ; Gillet, 1980). Les plus jeunes tiges déclinent tandis que les plus anciennes continuent de croître en août, septembre ou même octobre, selon le climat et le temps qui s'écoule entre l'émergence et la floraison. Pendant la période de croissance, le

développement de la surface foliaire augmente rapidement. Les valeurs maximales de l'indice de surface foliaire (LAI : ratio de la surface totale supérieure des feuilles à la surface du sol sur laquelle la végétation se développe) ont été observées pendant la phase de floraison, après quoi la canopée commence à sénescer (Cosentino *et al.*, 2007). Un peuplement mature de *Miscanthus x giganteus* est capable d'intercepter près de 90% du rayonnement photosynthétique utile quand le LAI atteint 3,2 (Clifton-Brown *et al.*, 2000). Le coefficient d'extinction lumineuse (k) à travers le couvert feuilles fournit une mesure de l'absorption de la lumière par les feuilles : *Miscanthus x giganteus* atteint entre 0,56 et 0,68 (Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Cosentino *et al.*, 2007). Ces valeurs sont proches de celle rapportée pour le maïs qui est de 0,67 (Clifton-Brown et Jones, 1997).

La fin de la période de croissance coïncide avec une baisse des températures, et la sénescence complète se produit avec les premières gelées (Christian et Haase, 2001). Cependant, les feuilles les plus âgées du bas de tige commencent à vieillir plus tôt. A la fin de la saison de croissance, Christian et Haase (2001) suggèrent que les nutriments et assimilas issus de la photosynthèse pourraient être remobilisés à partir des tiges et des feuilles vers les rhizomes. Les tiges non régressées vont sécher progressivement pendant l'hiver, jusqu'en février / mars.

Une bactérie fixatrice d'azote du genre *Azospirillium* a été identifiée comme étant associée aux racines de *Miscanthus x giganteus* (Eckert *et al.*, 2001). Une autre du genre *Rhizobia* a elle été trouvé au niveau des racines et des tiges de *M. sinensis,* favorisant également l'absorption de l'azote (Miyamoto *et al.*, 2004 dans Stewart *et al.*, 2009). Un deuxième type de symbiose, par des mycorhizes arbusculaires (*Glomus*) logées dans les racines, a également été décrit chez *M. sinensis* (An *et al.*, 2008). Ces bactéries pourraient être une source d'azote expliquant que la fertilisation azotée semble avoir peu d'influence sur sa production de biomasse.

## I-3 Culture du miscanthus

### I-3-1 Implantation

La mise en place d'un champ de miscanthus se fait par l'implantation de fragments de rhizome ou de microplantes. La date d'implantation optimale conseillée est fin avril-mai afin d'éviter les gelées tardives et améliorer les taux de levée (Christian et Haase, 2001). [2]

En général, une amélioration du taux d'implantation dans les zones les plus sèches (Europe du sud) semble être constatée suite à l'irrigation des rhizomes nouvellement plantés. En raison du coût de production élevé des rhizomes ou des microplantes la densité de plantation conseillée est de 2 plants/$m^2$, mais elle peut être augmentée à 5 plants/$m^2$ (Lewandowski *et al.*, 2000). Cependant, Christian *et al.* (2008) recommande, pour atteindre la densité végétale requise, la mise en terre de rhizomes issus de plantes âgées de 5 ans avec une densité augmentée d'au moins 14%. Le miscanthus, comme de nombreuses Poacées, présente la propriété de taller après la levée. Cette propriété explique la faible densité de semis pour cette culture. En effet le tallage permet de produire de multiples tiges à partir de la plantule initiale assurant ainsi la formation de touffes denses. Les plantes de *Miscanthus x giganteus* peuvent vivre entre 20 et 25 ans. Les rendements deviennent intéressants après deux années de culture et atteignent leur maximum après 3 à 5 ans (Lewandowski *et al*., 2003).

### I-3-2 Récolte

La récolte du miscanthus peut se réaliser grâce à une ensileuse à maïs ou à fourrage. Elle peut se faire à différentes dates :

- Aux environs de la mi-octobre où la plante détient son maximum de biomasse environ 15 à 25 $t.ha^{-1}$ sans irrigation en Europe (Zub et Brancourt, 2010), on parle de récolte « en vert ». La plante qui est proche de la floraison n'a pas encore perdu beaucoup de feuilles. Le rendement est donc élevé car la plante entière contenant encore toutes ses tiges et feuilles peut être valorisée. Néanmoins, le produit reste humide.
- Après l'hiver, on parle de récolte « en sec ». Le rendement baisse jusqu'à des valeurs de 15 à 19 $t.ha^{-1}$ (Zub et Brancourt, 2010) en partie en raison de la chute des feuilles. Les feuilles tombées au sol constituent une litière appelée «mulch» et enrichissent le sol en matière organique.

### I-3-3 Fertilisation

De nombreuses études démontrent que la fertilisation azotée semble avoir peu effet sur la production de biomasse aérienne pour les cultures récoltées après l'hiver. Ceci suggère que l'apport d'azote provenant non seulement du sol mais aussi de la biomasse souterraine a été suffisant pour atteindre le maximum de production de biomasse aérienne (Schwarz *et al.*, 1994 ; Himken *et al.*, 1997 ; Clifton-Brown *et al.*, 2007; Danalatos *et al.*, 2007 ; Christian *et al.*, 2008). Néanmoins l'étude de Schwarz *et al.* (1994) rapporte des teneurs très élevées en azote minéral du sol au cours de la période de croissance (60-380 $kg.ha^{-1}$). L'étude de Christian *et al.* (2008), elle, laisse supposer une contribution importante de la minéralisation de l'azote en raison de prairies permanentes ayant été cultivés sur le site dans le passé.

D'autres études ont montré au contraire que la fertilisation azotée était nécessaire afin d'atteindre une production maximale de biomasse (Ercoli *et al.*, 1999 ; Cosentino *et al.*, 2007). Les connaissances actuelles sur les besoins exacts en azote de la culture durant le cycle de croissance ne sont donc pas encore bien déterminées. Cependant, des recommandations pour la fertilisation azotée apparaissent afin de subvenir aux besoins en azote de la culture tout en maintenant la réserve d'azote du sol et en limitant les pertes d'azote par lessivage. Selon les travaux de Cadoux *et al.* de 2011, il est conseillé d'appliquer pour un rendement en matière sèche de 10 t/ha à la récolte 49 kg de N, 4,7 kg de P et 70 kg de K par an. Pour un rendement en matière sèche de 15 t/ha à la récolte, il est conseillé d'appliquer 73.5 kg de N, 7 kg de P et 105 kg de K par an. Enfin, pour un rendement en matière sèche de 20 t/ha à la récolte, il est conseillé d'appliquer 98 kg de N, 9.4 kg de P et 140 kg de K par an. Ce rendement de 20 t/ha semble être le rendement maximum que l'on peut obtenir pour cette culture.

Alors que le besoin en azote de la plante est faible, le lessivage des nitrates est potentiellement élevé dans la première année après l'implantation. Ceci peut également se vérifier dans une moindre mesure lors de la deuxième année. Par conséquent, la fertilisation azotée n'est pas recommandée au cours des deux premières années de culture, sauf pour des sols pauvres en azote (Cadoux *et al.* de 2011).

Il semble également que la réponse des miscanthus à l'azote semble être dépendante de la quantité d'eau disponible dans le sol et de l'âge de la culture (Lewandowski et Schmidt, 2006 ; Cosentino *et al.*, 2007).

### I-3-4 Irrigation et traitement

Un des farceurs limitant de la culture de *Miscanthus x giganteus* est la disponibilité en eau. Une irrigation peut être envisagée pour favoriser l'implantation de la plante. En effet, il a été montré que la disponibilité en eau du sol a une forte influence sur la production de biomasse (Heaton *et al.*, 2004). La période la plus sensible à la sècheresse semble être la période de croissance de la plante (Richter *et al.*, 2008). De même Christian et Haase (2001) ont démontré que l'irrigation exerce une influence importante sur le rendement surtout lorsque *Miscanthus x giganteus* est cultivé sur des sites pauvres en eau. D'autres études (sous différents niveaux d'apports d'azotés) démontrent que la production de biomasse peut augmenter de 25% à 84% avec irrigation (Zub et Brancourt, 2010). Cependant, d'un point de vue environnemental et économique, cette irrigation ne semble pas se justifier.

De plus, la culture de *Miscanthus x giganteus* semble sensible à l'hydromorphie et l'exposition au gel. En effet, elle semble assez sensible aux sols saturés ponctuellement ou couramment en eau (Jones and Walsh 2001). De plus, la tolérance au froid de plants jeunes est limitée et un gel prolongé peut défavoriser le potentiel de la culture et son développement (Clifton-Brown, 2001).

Peu de pathogènes qu'ils soient de type insectes ou parasites invertébrés ont pour le moment été identifiés comme infectant le miscanthus. Les quelques cas recensés ne semblent pour le moment pas influencer sur le rendement en biomasse de la culture (Anderson *et al.*, 2011).

## II- Synthèse des principaux glucides non structuraux

Les plantes sont des organismes autotrophes. Elles sont capables, au cours de la réaction de photosynthèse, d'utiliser l'énergie du rayonnement solaire grâce à des pigments assimilateurs pour assimiler le dioxyde de carbone atmosphérique. Celui-ci sera ensuite incorporé dans des molécules organiques nécessaires à la croissance des végétaux (sucres, lipides, acides aminés…).

La photosynthèse est un mécanisme composé de deux phases se passant à des moments distincts. La première phase (phase lumineuse ou photochimique) est caractérisée par le déroulement d'une activité photochimique, qui correspond à un déclenchement de transfert d'électrons suite à la capture de l'énergie électromagnétique des photons lumineux. Ces transferts d'électrons conduisent à la synthèse d'un composé réducteur riche en énergie, l'ATP. La seconde phase (phase métabolique ou phase de fixation du carbone) est celle au cours de laquelle l'utilisation de cette énergie chimique permet la fixation du $CO_2$ et d'assurer le déroulement des voies de biosynthèse des molécules carbonées.

La photosynthèse permet l'obtention de trioses phosphates, synthétisés au sein des chloroplastes, qui seront convertis en hexoses phosphates. Ces derniers pourront être utilisés dans différentes voies métaboliques telles que la glycolyse et le cycle de Krebs. Ils pourront également permettre la synthèse de saccharose ou de sucres de réserve. Ils serviront alors de source d'énergie ou de carbone pour la croissance de la plante. Dans l'idéal, les plantes doivent atteindre un équilibre entre l'assimilation du carbone, son stockage et leur croissance. Cependant peu de choses sont connues sur ces régulations (Smith et Stitt, 2007)

### II-1 Fixation du $CO_2$

#### II-1-1 Différents types de photosynthèse

Plusieurs mécanismes de fixation et d'assimilation photosynthétique existent chez les plantes : la photosynthèse C3 (majoritaire chez les espèces de plantes de zones tempérées), la photosynthèse C4 et CAM (majoritairement dans les zones sub-tropicales et désertiques).

La photosynthèse C3 (figure 4) se caractérise par une fixation directe et unique du $CO_2$ par la rubisco (ribulose bisphosphate carboxylase oxygénase) sur le RuBP (ribulose-1,5-bis phosphate) pour former deux molécules à 3 carbones de PGA (acide 3-

phosphoglycérique). C'est la première étape du cycle de Calvin se déroulant entièrement dans le stroma du chloroplaste. Ce cycle contient deux étapes supplémentaires : la réduction du PGA en trioses phosphates et régénération du RuBP (Farineau et Morot-Gaudry, 2011).

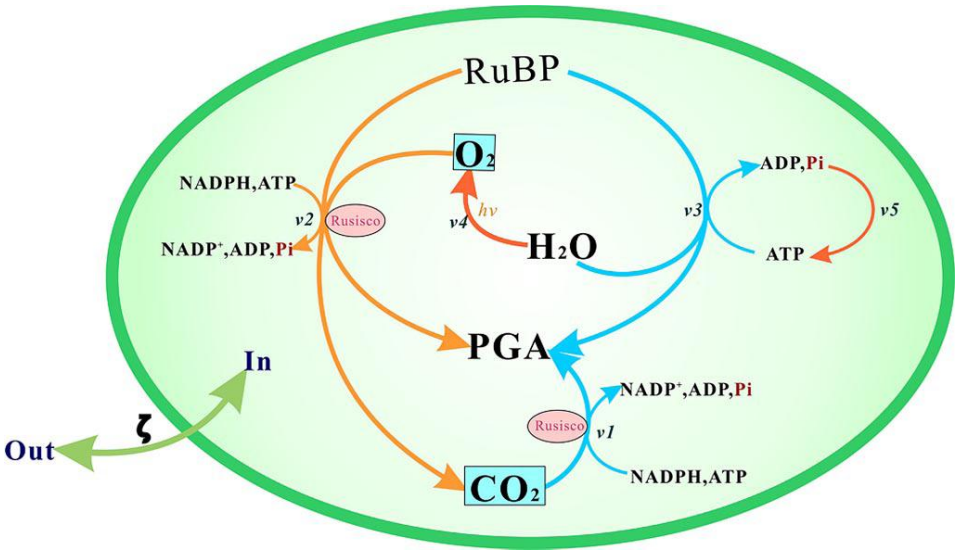



**Figure 4. Schéma simplifié du métabolisme photosynthétique dans un chloroplaste de plante C3**

(Luo *et al.*, 2009)

La photosynthèse C4, elle, implique deux carboxylases fonctionnant en série, la PEP carboxylase (phosphoénolpyruvate carboxylase) et la rubisco. La PEP carboxylase est localisée dans les cellules mésophylliennes, elle incorpore le $CO_2$ atmosphérique à une molécule d'oxaloacétate. La rubisco est elle localisée dans les cellules de la gaine périvasculaire, elle permet l'assimilation secondaire du $CO_2$ par le cycle de Calvin comme pour les plantes ayant une photosynthèse de type C3 (Farineau et Morot-Gaudry, 2011).

### II-1-2 Métabolisme photosynthétique de miscanthus

Il existe trois groupes de plantes C4 selon la nature des mécanismes de décarboxylation des acides C4 mis en jeu dans la gaine périvasculaire :

- Les plantes C4 à enzyme malique NADP dépendante chloroplastique (figure 5)
- Les plantes en C4 à enzyme malique NAD-dépendante mitochondriale
- Les plantes en C4 à PEP carboxykinase.

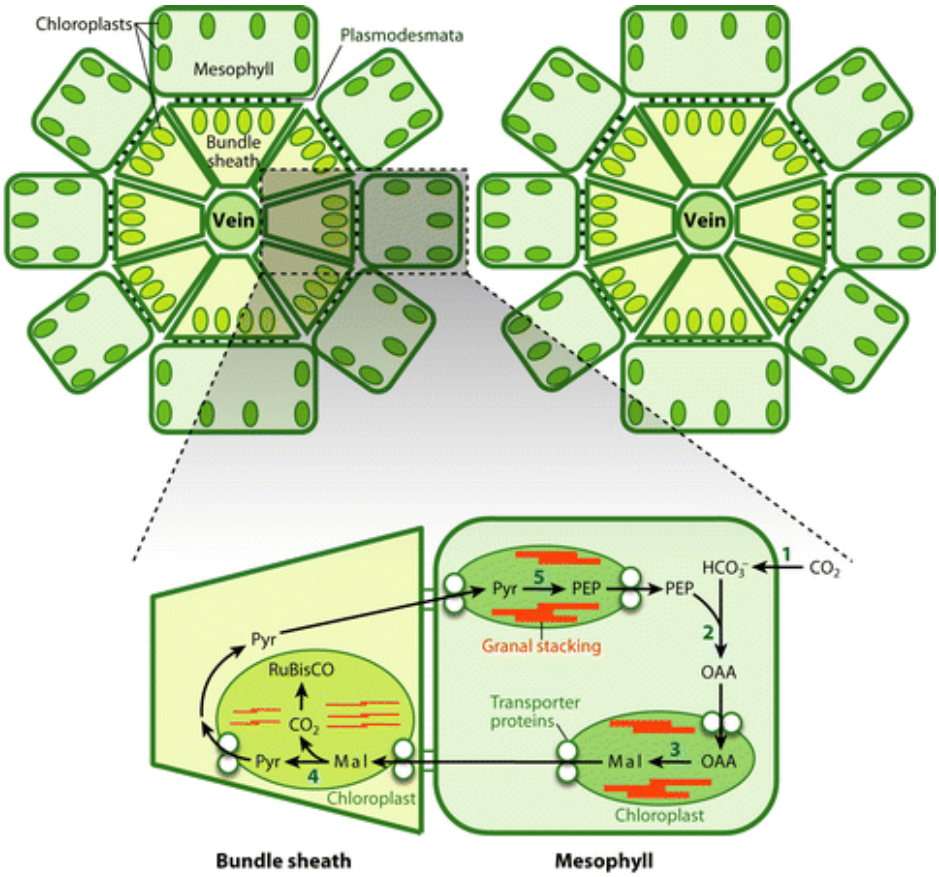



**Figure 5. Schéma du métabolisme photosynthétique C4 à enzyme malique NADP dépendante chloroplastique**

(Hibberd and Covshoff, 2010)

Le miscanthus appartient au premier groupe comme le sorgho, le maïs et la canne à sucre (Drincovich *et al*., 2001). Dans ce groupe, le $CO_2$ est incorporé en une molécule en C4 instable, l'oxaloacétate (AOA) grâce à la PEP carboxylase. Cette réaction se déroule dans le cytosol des cellules mésophylliennes. Une grande partie de l'AOA entre ensuite dans le chloroplaste pour y être réduite en malate par une malate déshydrogénase à $NADP^+$ utilisant l'activité réductrice des chloroplastes. Le reste d'AOA se retrouve aminée en aspartate par une aminotransférase cytoplasmique (Farineau et Morot-Gaudry, 2011).

Le malate et l'aspartate diffusent ensuite jusqu'aux cellules de la gaine périvasculaire. Dans les chloroplastes de ces cellules, le malate est décarboxylé par une enzyme malique $NADP^+$ dépendante libérant du $CO_2$, du pyruvate et du NADPH. Le malate est donc le fournisseur de $CO_2$ et de NADPH nécessaires au fonctionnement du cycle de Calvin. Le pyruvate va lui diffuser en sens inverse, il sera métabolisé pour régénérer le PEP, le premier accepteur de $CO_2$ en présence de $P_i$ et d'ATP.

### II-1-3 Avantages du métabolisme des plantes C4 à enzyme malique NADP dépendante chloroplastique

Le bilan énergétique global de la fixation d'une molécule de $CO_2$ par le métabolisme photosynthétique C4 est supérieur à celui du métabolisme C3. En effet, pour le métabolisme C3, le cycle de Calvin ne nécessite que l'utilisation de 2 NADPH et 3 ATP. Pour le métabolisme C4, il y a consommation de 2 ATP supplémentaires pour la régénération du PEP à partir du pyruvate. Cependant, le métabolisme photosynthétique en C4 est considéré comme ayant la plus grande efficacité théorique et le plus grand potentiel de productivité parmi toutes les formes de photosynthèses des plantes supérieures.

La rubisco, en plus de posséder une activité carboxylase lui permettant de fixer le $CO_2$ atmosphérique, possède une activité oxygénase. Ceci permettra à la rubisco, en cas de forte concentration en $O_2$, l'incorporation d'$O_2$ sur le RuBP. Ce processus concurrent de la photosynthèse est appelé photorespiration. Chez les plantes en C4, ce mécanisme est en grande partie éliminé (Long, 1999; Sage *et al.*, 1999). En effet, comme nous l'avons vu précédemment (cf §II-1-1 pp 24), il y séparation spatiale de la fixation du $CO_2$ atmosphérique et de la fixation du $CO_2$ par la rubisco, cette organisation particulière est appelée anatomie de Kranz. Chez les plantes en C4, la rubisco se trouve dans les cellules de la gaine périvasculaire. Ces cellules sont entourées par du mésophylle et sont quasiment imperméables aux gaz. La rubisco se trouve donc isolé de l'$O_2$ atmosphérique et le $CO_2$ libéré par la première étape de la photosynthèse s'accumule transitoirement dans les cellules de la gaine. Ce système permet donc à la rubisco d'agir quasi exclusivement comme carboxylase et de limiter le phénomène de photorespiration. Cette capacité à limiter la photorespiration rend ces plantes plus performantes que les autres dans des environnements secs et chauds, où les stomates sont fermés et les niveaux internes de $CO_2$ sont faibles. Du fait de cette organisation, moins de rubisco est nécessaire chez les plantes en C4 que chez les plantes en C3. Dans les plantes en C3, la rubisco représente 50% de l'ensemble des protéines solubles (soit 20 à 30% de l'azote total de la feuille) contre 20% de l'ensemble des protéines solubles chez les plantes en C3 (soit moins de 10% de l'azote total de la feuille) (Sage *et al.*, 1987).

Les plantes à métabolisme C4 sont normalement présentes et majoritaires dans des environnements chauds, humides avec de fortes intensités lumineuses. Néanmoins, ce type de photosynthèse rend ces plantes moins performantes à basses températures, ce qui limite leur croissance (Long, 1999). Cultivé en plein champ, *Miscanthus x giganteus* maintient une haute

activité photosynthétique et un rendement en biomasse important dans les climats tempérés frais tel que le nôtre. En effet, *Miscanthus x giganteus* est une espèce en C4 qui est capable de résister au froid (Beale et Long 1995 ; Bullard *et al.*, 1995 ; Beale *et al.*, 1996). Contrairement aux autres espèces cultivées de type C4 à enzyme malique NADP dépendante (canne à sucre, sorgho et maïs), le miscanthus est capable de développer des feuilles photosynthétiquement actives même en cas de températures basses (entre 14 et 25°C voire même inférieures à 10°C selon les études) (Beale *et al.*, 1996 ; Naidu *et al.*, 2003). Cette plante semblerait être unique dans sa capacité à atteindre en cas de basses températures des rendements élevés de conversion d'énergie tout en accumulant de grandes quantités de biomasse (Beale et Long, 1995).

## II-2 Synthèse des glucides dans les feuilles en C4

Lorsque 3 molécules de $CO_2$ sont fixées sur 3 molécules de RuBP, une molécule de triose phosphate sur 6 est utilisée pour la synthèse de produits terminaux de la photosynthèse. Dans les feuilles des plantes C4, le fonctionnement en série des cycles C4 et C3 aboutit à une synthèse de saccharose dans les cellules du mésophylle ainsi que d'amidon dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire. Ce sucre s'accumule ensuite dans ces cellules (Heldt, 1997 ; Hatch, 2002).

### II-2-1 Saccharose

Le saccharose (figure 6) est un diholoside résultant de l'union par une liaison osidique d'un glucose et d'un fructose.

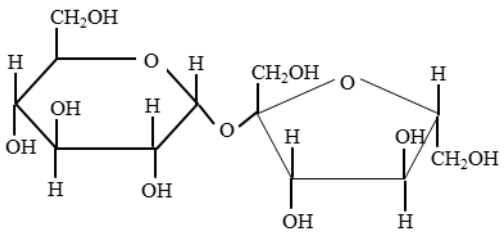



**Figure 6 : Structure du saccharose**

La voix de synthèse du saccharose se déroule dans le cytoplasme des cellules foliaires *via* la transformation de trioses phosphates (figure 7).

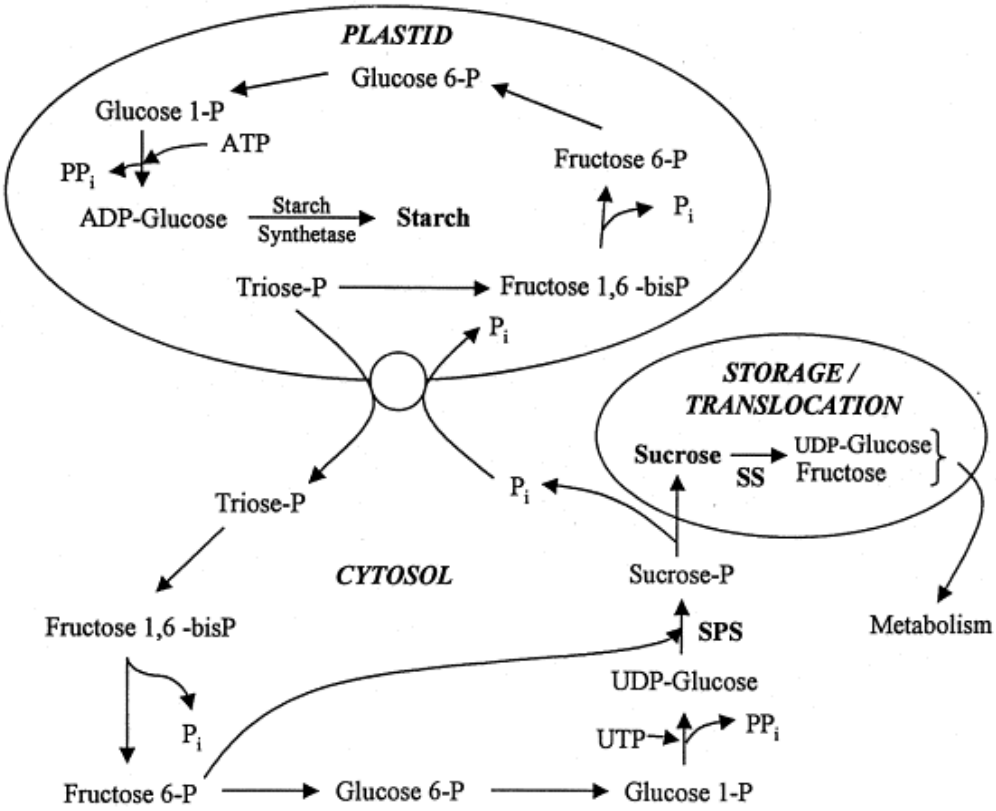



**Figure 7 : Synthèse du saccharose**
(Touchette et Burkholder, 2000)

La combinaison de deux trioses phosphates fournit un fructose 1.6-bis phosphate (Fru 1.6-bisP) qui sous l'action de deux enzymes (fructose bisphosphatase ou pyrophosphatase-fructose 6-P et 1-phosphotransférase) résultera en un fructose 6-phosphate (Fru 6-P). Ce Fru 6-P va ensuite être transformé en glucose 1-phosphate sous l'action conjuguée de la glucose 6 isomérase et de la phosphoglucomutase. Ensuite, ce glucose 1-P se combine à l'uridine triphosphate (UTP) pour aboutir à la synthèse d'uridine diphosphoglucose (UDP glucose) sous l'action de l'UDP-glucose phosphorylase). Puis, sous l'action de l'UDP-glucose phosphorylase, le glucose 1-P se combine à l'uridine triphosphate (UTP) pour aboutir à la synthèse d'uridine diphosphoglucose (UDP glucose). Enfin, la molécule d'UDP glucose va réagir avec une molécule de fructose 6-P grâce à l'action d'une saccharose P synthase (SPS) pour donner le saccharose-phosphate. Celui-ci est finalement hydrolysé en saccharose grâce à une phosphatase (Farineau et Morot-Gaudry, 2011).

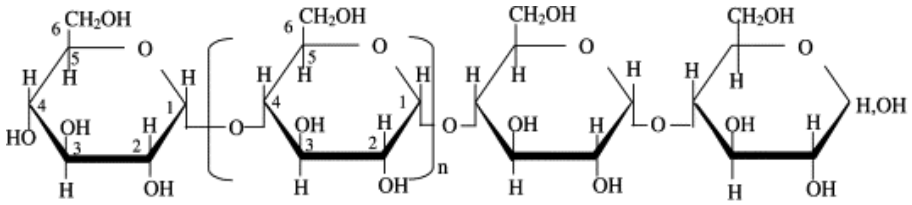
En joignant les deux fonctions carbonyles du glucose et du fructose (par une union osidique stable), la formation de saccharose protège les deux premières molécules de

l'oxydation. Pour cette raison, le saccharose est défini comme un sucre non réducteur. Le saccharose est généralement la forme principale de transport des glucides à longue distance et le principal composant soluble de la sève phloèmienne (Lemoine, 2000).

### II-2-2 Amidon

L'amidon est un glucide insoluble ayant une structure complexe, semi-cristalline à amorphe composée de deux polymères de glucose, l'amylopectine (figure 8-B) et l'amylose (figure 8-A).

A



B

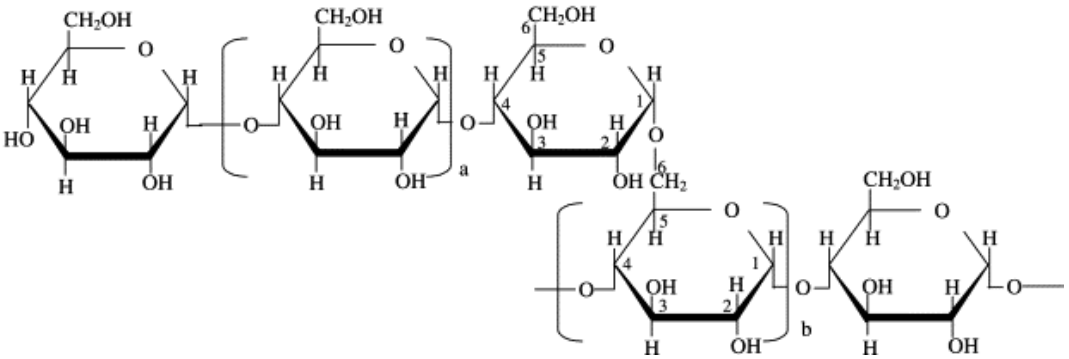


**Figure 8. Structure de l'amidon**

A : Structure de l'amylose ; B : Structure de l'amylopectine

(Tester *et al.*, 2004)

Chez les plantes supérieures, l'amidon est synthétisé dans les plastes de cellules à la fois photosynthétiques et non photosynthétiques. L'amidon joue un rôle important pendant le cycle de vie de la plante.

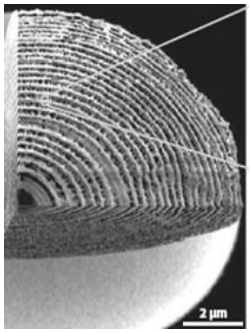
Dans les feuilles des plantes de type C4, le principal site de synthèse de l'amidon se trouve être les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire. Cette localisation permet

de mieux coordonner le taux de synthèse de l'amidon avec le taux de photosynthèse (Lunn et Furbank, 1996).

Sous l'action des mêmes enzymes que celles de la synthèse de saccharose, les trioses phosphophates vont former de l'ADP-glucose. Un ADP-glucose est ensuite incorporé à un fragment d'unité primaire d'α-glucane, augmentant ainsi d'une unité glucose la taille du fragment carboné. Cette condensation d'unités glucoses en une chaine linéaire glucosidique (de plus de 1000 unités glucosidique reliées en α1-4), appelée amylose est catalysée par une enzyme : l'amidon synthase (ADP-glucose : [1-4]–α–D-glucan 4- α –D-glucosyltransferase ; EC : 2.4.1.21).

La ramification de l'amylopectine a lieu simultanément avec l'allongement de la chaîne d'amylose. La ramification est catalysée par des enzymes de branchement (BE; α-1 ,4-glucane: α-1 ,4-glucane-6-glycosyltransférase; CE: 2.4.1.18) qui coupent les chaines d'α-1 ,4-glucane existantes et transfèrent le segment coupé de six unités de glucose ou plus à la position C6 d'un résidu glucosidique d'une autre chaîne glucosidique (ou sur la mêmes). Chez les plantes supérieures, les enzymes branchantes se divisent en deux classes (I et II). Les enzymes de classe I transfèrent préférentiellement de chaînes plus longues que les enzymes de classe II. On obtient ainsi des chaînes branchées de glucose de (10 000 à 100 000 unités) appelées amylopectine (Zeeman *et al.*, 2010).

La fraction de carbone assimilée par la photosynthèse est conservée dans les chloroplastes sous forme d'amidon plutôt que d'être convertie en saccharose qui sera ensuite exporté vers les sites de croissance. Cet amidon s'accumule sous forme de grains, structures formées de couches concentriques (figure 9), et localisés dans le stroma plastidial. Ils sont constitués de 20 à 30% d'amylose et de 70 à 80% d'amylopectine. La taille des grains d'amidon est maximale en fin de journée. Une partie de cet amidon est ensuite dégradé durant la nuit pour fournir des substrats pour la respiration des feuilles et pour poursuivre la synthèse de saccharose, permettant l'exportation de glucides vers le reste de la plante (Zeeman *et al.*, 2010).




Structure concentrique

**Figure 9. Structure interne d'un grain d'amidon**
(Zeeman *et al.*, 2010)

## II-3 Synthèse des glucides de réserve

Aucune référence bibliographique n'est disponible sur le métabolisme des glucides non structuraux chez le miscanthus. Cependant, le miscanthus est une plante géophyte et il est connu que chez les géophytes, les organes souterrains qui assurent le passage de l'hiver et la pérennité de la plante sont également des organes de stockage de différents types de composés énergétiques de réserve. L'amidon est un des glucides de réserve les plus fréquemment rencontré mais d'autres formes telles que des fructanes et des glucomannanes peuvent également être présents à la place de, ou en plus, de l'amidon (Miller, 1992).

### II-3-1 Amidon

Nous avons vu précédemment (cf § II-2-2 pp 30) que la synthèse d'amidon avait lieu dans les chloroplastes des feuilles et que la nuit une dégradation de cet amidon est observée. Les deux principaux produits de dégradation de l'amidon sont le maltose et le glucose. Ceux-ci pourront alors générer du saccharose. Dans les organes non photosynthétiques (tels que les racines, les rhizomes, les tubercules, les tiges ou les graines), le saccharose provenant de la photosynthèse ou de la dégradation de l'amidon des chloroplastes foliaires est amené via le phloème. Il pourra être ensuite converti en amidon pour un stockage à long terme, dans les plastes spécialisés appelés amyloplastes. C'est la forme de stockage majoritaire de ce sucre dans ce type d'organe (Zeeman *et al.*, 2010).

L'amidon de stockage pourra être remobilisé pour soutenir les phases de croissance ou pour satisfaire la demande locale élevée en carbone pour des processus spécifiques. La source de carbone issue de l'amidon peut être vitale pour la croissance normale des plantes. En effet,

des plantes mutantes d'Arabidopsis incapables de synthétiser de l'amidon présentent une croissance réduite et des carences en carbone. Chez le maïs et le pois un avortement des graines est observé en réponse à un épisode soudain de sécheresse ou de stress thermique. Les auteurs estiment ces avortements sont une conséquence d'une carence en carbone provenant de ces stress plutôt que de l'effet direct de ces contraintes sur la croissance des semences (Zeeman *et al.*, 2010).

### II-3-2 Fructanes

On estime que les fructanes sont la principale réserve de glucide dans 15% des angiospermes (Hendry, 1993). Ces espèces contenant des fructanes peuvent être trouvés dans un large éventail de familles aussi bien chez les dicotylédones que chez les monocotylédones, y compris chez certaines Poacées, (Hendry et Wallace, 1993)

Ces fructanes sont composés de trois trisaccharides différents : le 1-kestose, le 6-kestose et le neokestose. Les structures de ces trisaccharides sont présentées ci-dessous figure 10.

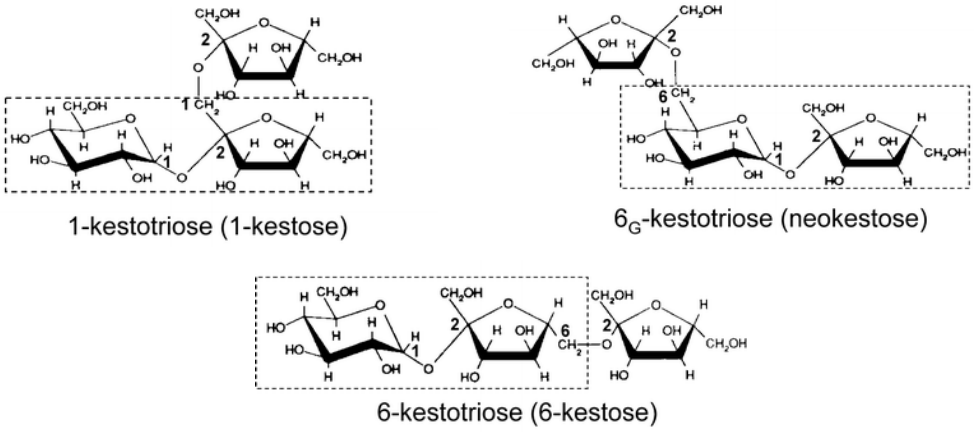



**Figure 10. Structure des trisaccharides des fructanes**

(Livingston *et al.*, 2009)

Les cinq principaux types de fructanes sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous :

**Tableau 1. Les cinq types de fructans présentes dans les plantes et leur plante respective** (Livingston *et al.*, 2009)

| Type | Espèces | Liaison (β) | Trisaccharide initial |
|---|---|---|---|
| Inulin | Chicory, Jerusalem artichoke | 2-1 | 1-kestose |
| Levan | *Dactylis glomerata* | 2-6 | 6-kestose |
| Branched | Wheat, barley | 2-1 and 2-6 | 1- and 6-kestose |
| Inulin neoseries | Onion, asparagus, Lolium | 2-1 | 6G-kestotriose (neokestose) |
| Levan neoseries | Lolium, oats | 2-6 | 6G-kestotriose (neokestose) |

- Les fructanes de type inuline se caractérisent principalement par leur forme linéaire. Ils contiennent des résidus fructosyles liés par des liaisons *O*-glycosidiques en β (2→1) avec une molécule de saccharose qui se trouve en position terminale. Les inulines sont présentes principalement chez les dicotylédones et plus particulièrement dans la famille des *Asteraceae* (*Helianthus tuberosus*).
- Les fructanes de type lévane contiennent des résidus fructosyles liés par des liaisons *O*-glycosidiques en β (2→6) et se présentent toujours sous forme linéaire. Les lévanes présentent une molécule de glucose en bout de chaîne. Ils sont surtout présents dans les plantes de la famille des Poacées comme le blé (*Triticum aestivum*) ou l'orge (*Hordeum vulgare*).
- Les inulines de type néoséries possèdent des liaisons en β (2→1) entre les résidus fructosyles. Ils sont présents notamment chez les Liliacées (oignon et asperge) (Shiomi, 1989).
- Les lévanes néoséries possèdent des liaisons en β (2→6) entre les résidus fructosyles. Les inulines néoséries sont présentes dans des plantes de la famille des Poacées comme l'avoine (*Avena sativa* ; Ritsema et Smeekens, 2003).
- Les fructanes mixtes ou fructanes branchés présentent des structures beaucoup plus complexes. Dans ce cas, les deux types de liaisons peuvent être présents dans une même molécule. Ils peuvent présenter ou non le glucose interne typique des néoséries. Ce type de fructanes se trouve dans la plupart des espèces végétales appartenant à la famille des Poacées (Bonnett *et al.*, 1997).

Qu'ils soient linéaires ou ramifiés, les fructanes végétaux ont des tailles variables comprises entre 3 et 60 résidus. Les fructanes végétaux sont synthétisés à partir de saccharose grâce à des enzymes qui appartiennent à la famille des fructosyltransférases (FTs) : sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST, EC 2.4.1.99) et fructan:fructan frucosyltransferase (FFT, EC 2,4.1.100). La dégradation des fructanes est réalisée par des enzymes de type fructane exohydrolases (FEHs, EC 3.2.1.80) (Ritsema et Smeekens 2003). Les fructanes sont synthétisés dans la vacuole mais les fructanes peuvent également être présents dans l'apoplaste, le phloème et les tissus du xylème (Valluru et Van den Ende, 2008).

Les géophytes peuvent, au sein d'un même organe de stockage, ne contenir que des fructanes et pas d'amidon (*Allium caeruleum*) ou le contraire (*Crocus vernus*) ou encore simultanément des fructanes et de l'amidon. Chez certaines espèces on constate une accumulation plus forte d'amidon que de fructanes (*Tulipa turkestanica*), d'autres en accumulent moins (*Muscari armeniacum*) (Orthen, 2001 ; Ranwala et Miller, 2008).

En plus de son rôle de glucide de réserve, d'autres fonctions ont été proposées pour les fructanes comme des fonctions d'osmorégulation et de cryoprotection (Pollock, 1986 ; Hendry, 1987).

### II-3-3 Glucomannanes

Les glucomannanes sont des hétéropolymères de glucose et de mannose peu ramifiés (figure 11) synthétisés par des glucomannanes synthases (EC 2.4.1.32). Ce sont des composants des hémicelluloses présents dans presque toutes les parois des cellules végétales. Ils peuvent également faire partie des glucides de réserve chez certains géophytes. Ils sont néanmoins moins présents que l'amidon et les fructanes. Les glucomannanes sont localisés dans les vacuoles des cellules du parenchyme des racines ou des tubercules de certaines Liliacées et Aracées (Ranwala et Miller, 2008).

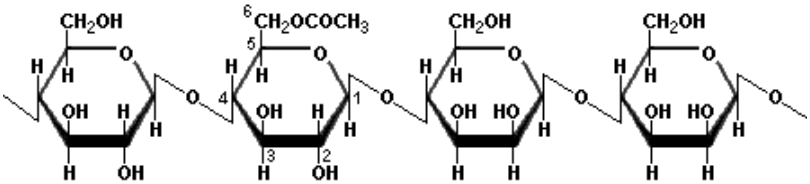



**Figure 11 : Structure des glucomannanes**
(Ranwala et Miller, 2008)

## III- Synthèse des molécules azotées

L'azote est un élément indispensable à la survie des plantes. Chaque année, l'agriculture mondiale nécessite l'utilisation de 80 à 90 millions de tonnes de fertilisants azotés (Good *et al*., 2004). Ce type d'intrant représente la part budgétaire la plus importante de la production. On estime que 50 à 70% de l'azote apporté au champ est perdu (Hodge *et al.*, 2000). Cette part non utilisée par les plantes peut devenir une source de pollution des eaux. Le prélèvement de l'azote du sol par les plantes dépend en partie de l'environnement, du type de sol, de la disponibilité en composés azotés, mais est surtout déterminé par les besoins en azote dans la plante (Touraine *et al.*, 2001).

Diminuer les apports d'azote et cultiver des plantes ayant la meilleure efficacité d'utilisation de l'azote (Nitrogen Use Efficience, NUE) est l'un des principaux objectifs de la recherche sur la nutrition des plantes cultivées (Hirel *et al.*, 2007). Outre la NUE, il existe aussi d'autres notions comme la NUtE (Nitrogen Utilization Efficiency), la NUpE (Nitrogen Uptake Efficiency). Les définitions de la NUE diffèrent dans la littérature selon si les plantes sont annuelles, bisannuelles ou pérennes et si elles sont cultivées pour leur biomasse ou le grain. En effet, pour les céréales, la NUE a été défini comme le rendement en grain par unité d'azote disponible dans le sol, y compris les engrais azotés. Pour les plantes à biomasse, la NUE est exprimée en quantité de matière fraîche ou sèche produite par teneur en azote dans la plante (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

La NUE moyenne de la biomasse aérienne de *Miscanthus x giganteus* a été calculée à environ 277 kg de $MS.kg^{-1}$ d'azote apporté, mais une importante variabilité a été observée, allant de 143 kg $MS.kg^{-1}$ en Irlande à 613 kg $MS.kg^{-1}$ au Portugal (Zub et Brancourt, 2010).

Avec un apport d'azote de 100 $kg.ha^{-1}.an^{-1}$, et en calculant les quantités d'azote déjà présents dans le sol, Lewandowsky et Schmidt (2006) ont obtenu une NUE de l'ordre de 350 kg $MS.kg^{-1}$ d'azote et des valeurs de NUE de l'ordre 140 et 110kg de $MS.kg^{-1}$ d'azote pour le triticale et le reed canary grass.

L'utilisation de l'azote par les plantes nécessite plusieurs étapes : l'absorption, l'assimilation, la translocation et quand les plantes vieillissent, le recyclage et la remobilisation (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

## III-1 Absorption du nitrate et de l'ammonium

### III-1-1 Absorption du nitrate

La majeure partie des plantes peut absorber et assimiler le nitrate ($NO_3^-$), l'ammonium ($NH_4^+$), l'urée et les acides aminés. La disponibilité en azote du sol peut varier en fonction de facteurs tels que les précipitations, la température, le type de sol, le pH et les apports. Par conséquent, la forme préférée dans laquelle l'azote est prélevé dépend de l'adaptation des plantes aux conditions du sol. En règle générale, les plantes adaptées aux sols acides, pauvres en oxygène (réducteurs) ont tendance à absorber de l'ammonium ou des acides aminés tandis que les plantes adaptées aux sols à pH plus élevés et riches en oxygène absorbent préférentiellement du nitrate (Maathuis, 2009).

La première et plus importante étape de cette assimilation est le passage des ions $NO_3^-$ et $NH_4^+$ au travers de la membrane des cellules racinaires. Au cours de cette phase, la plante contrôle sa nutrition minérale et plus particulièrement sa nutrition azotée. Ce contrôle permet de répondre à la variation des besoins de la plante au cours de sa croissance (Crawford et Glass, 1998).

L'absorption du $NO_3^-$ s'effectue au niveau des racines grâce à des systèmes de transport de haute affinité (HATS : high affinity transport system) et de basse affinité (LATS : low affinity transport system) (Crawford et Glass, 1998 ; Forde, 2000). Les HATS transportent efficacement les ions $NO_3^-$ jusqu'à des concentrations du milieu de quelques dizaines de micromolaires. Cependant lorsque les concentrations en $NO_3^-$ du milieu augmentent, les HATS sont rapidement saturées. Dans ce cas, les LATS entrent en jeu et permettent de rester efficaces dans le transport du $NO_3^-$ même lorsque les concentrations de cet ion avoisinent les 50 mM (Glass *et al.*, 1992).

Suite à son absorption par les racines, le $NO_3^-$ peut avoir plusieurs devenirs. Il peut soit être réduit en $NH_4^+$ dans ce même organe, soit être stocké dans les vacuoles, soit être exporté vers les parties aériennes dans lesquelles il pourra être également mis en réserve ou métabolisé. Le $NH_4^+$ provenant de la réduction du $NO_3^-$ est ensuite rapidement incorporé à des molécules carbonées afin de permettre la synthèse de composés azotés indispensables à la croissance et au développement des plantes (Hirel et Lea, 2001).

### III-1-2 Réduction du nitrate en ammonium

La réduction du nitrate ($NO_3^-$) en ammonium ($NH_4^+$) s'effectue en deux étapes. La première étape correspondant à la réduction du $NO_3^-$ en nitrite ($NO_2^-$) est catalysée par la nitrate réductase (NR ; EC 1.6.6.1). La seconde étape consistant en la réduction du $NO_2^-$ en $NH_4^+$ et est catalysée par la nitrite réductase (NiR ; EC 1.7.7.1) (Beevers et Hageman, 1969).

Chez la majorité des plantes, la réduction du nitrate peut se faire aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes. Chez les plantes herbacées, cette réduction s'effectue principalement dans les parties aériennes alors que chez les ligneux elle se produit majoritairement dans les racines (Faure *et al.*, 1997). De plus, la localisation de cette réduction dépend de nombreux facteurs tels que la quantité de nitrate, de l'espèce, de l'âge de la plante (Andrews, 1986). Chez les plantes de type C4, les cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire, connues comme ayant un rôle dans l'assimilation du $CO_2$, sont également impliquées dans l'assimilation du nitrate. Dans ce cas, la NR et la NiR sont présentes dans les cellules du mésophylle mais sont absentes dans les cellules de la gaine. Cette localisation permet d'utiliser l'énergie lumineuse pour la réduction et l'assimilation du nitrate dans les cellules du mésophylle et pour la fixation du $CO_2$ dans les cellules de la gaine. Cette organisation est probablement responsable de la supériorité de la NUE chez les C4 par rapport aux C3 (Sage *et al.*, 1987).

#### *III-1-2-1 Nitrate Réductase (NR)*

La nitrate réductase est une enzyme soluble généralement cytosolique (Sechley *et al.*, 1992). Elle agit *via* le transfert de deux électrons d'un cofacteur (NADH ou NADPH) au $NO_3^-$ pour permettre la réduction du $NO_3^-$ en $NO_2^-$ (Meyer et Stitt, 2001). Chez les plantes supérieures, deux isoformes existent. Elles sont différenciées par le donneur d'électron utilisé (Rouzé et Caboche, 1992). La NADH:NR (EC 1.6.6.1) est l'isoforme la plus répandue chez les végétaux supérieurs et les algues. Une isoforme bispécifique NAD(P)H:NR (EC 1.6.6.2) utilisant comme cofacteur NADH ou le NADPH est présente chez quelques mousses, algues et chez les végétaux supérieurs en association ou non avec la forme NADH:NR. Celle-ci n'est codée que par un seul gène chez les plantes supérieures (Kant *et al.*, 2011). C'est une enzyme localisée dans les chloroplastes des feuilles, les plastes des racines et des autres organes non chlorophylliens.

La présence de nitrate induit fortement et rapidement (quelques heures) l'expression des gènes de la NR (Patterson *et al.*, 2010). L'expression des gènes de la NR est stimulée par la lumière, le saccharose et les cytokinines. Différents mécanismes permettent sa régulation. Ils servent notamment à prévenir l'accumulation de $NO_2^-$, toxique à forte concentration pour les cellules (Lillo, 2008). Leur expression est réprimée notamment en cas de forte concentration de glutamine, l'un des premiers produits issu de l'assimilation de l'azote (Krapp *et al.*, 1998).

#### *III-1-2-2 Nitrite Réductase (NiR)*

La Nitrite réductase (EC 1.7.7.1), localisée dans les chloroplastes des feuilles et dans les plastes des racines est codée par un seul gène (Wray, 1993 ; Faure *et al.*, 1997 ; Meyer et Stitt, 2001). C'est une enzyme monomérique qui catalyse la réduction du $NO_2^-$ en $NH_4^+$ avec l'apport au $NO_2^-$ de 6 électrons issus de la ferrédoxine.

### III-1-3 Absorption de l'ammonium

L'ammonium est absorbé par les végétaux au niveau de la racine par deux systèmes de transport similaires à ceux liés à l'absorption du nitrate (cf § III-1-1 pp 37) : les transporteurs à haute (HATS) et à faible (LATS) affinité. Des études menées sur l'orge montrent qu'il existerait également un cycle futile de l'ammonium. En effet un mécanisme de transport actif de d'ammonium des racines vers le sol a été observé (Britto *et al.*, 2001). Les protéines impliquées dans cet efflux ne sont pas encore connues. Il existe en plus d'autres transporteurs de $NH_4^+$ présents au niveau des feuilles et qui jouent un rôle important dans le transport et le recyclage de l'ammonium produit au cours de la photorespiration (Howitt et Udvardi, 2000).

## III-2 Assimilation de l'ammonium

L'ammonium joue un rôle central dans le métabolisme azoté. Il peut être absorbé par les racines, peut être rejeté dans les sols, assimilé ou stocké dans les vacuoles des racines ou alors transporté vers les parties aériennes. Il est établi que l'ammonium n'est pas une forme importante du transport à longue distance de l'azote. Cependant, des dosages de sève xylémienne ont montré la présence de concentration en ammonium de l'ordre du millimolaire (Yuan *et al.*, 2007). Le $NH_4^+$ présent au sein de la plante peut avoir plusieurs origines. Il peut

être issu soit de son absorption directe au niveau des racines, de la réduction des $NO_3^-$, soit de l'action de diverses enzymes telles que la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) lors de la biosynthèse des lignines (Joy, 1988). Il peut également provenir du catabolisme des acides aminés et des protéines, ou être issu de l'activité photorespiratoire comme indiqué ci-dessus (Hirel et Lea, 2001).

L'ammonium est un composé toxique même lorsqu'il est présent à faible concentration dans les cellules végétales pouvant amener la nécrose des tissus. Généralement, les concentrations en ammonium n'excèdent pas 1 à 30 mM dans le cytosol et 2 à 45 mM dans les vacuoles (Miller *et al.*, 2001). Son assimilation rapide est donc une nécessité vitale pour les cellules.

Chez les végétaux supérieurs, l'incorporation du $NH_4^+$ dans des molécules organiques implique deux enzymes clés : la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) (Lea et Forde, 1994). D'autres enzymes telles que la glutamate déshydrogénase ou l'asparagine synthétase jouent également un rôle important dans l'assimilation du $NH_4^+$ (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

### III-2-1 Cycle GS/GOGAT

Le cycle GS/GOGAT (figure 12) est la voie principale d'assimilation du $NH_4^+$ (Ratcliffe et Shachar-Hill, 2001; Lea et Miflin, 2004). La réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS) occupe un rôle central dans le métabolisme azoté des végétaux supérieurs. En effet, la GS participe avec la glutamate synthase (GOGAT), à l'incorporation de plus de 95% de l'azote inorganique sous forme de $NH_4^+$ en azote organique sous forme de glutamate. Le $NH_4^+$ est incorporé au glutamate au cours d'une réaction catalysée par la GS pour former de la glutamine en présence d'ATP. La GOGAT, elle, catalyse la deuxième réaction impliquée dans l'assimilation du $NH_4^+$. Elle va transférer le groupement amide (-NH2) de la glutamine (formée par la GS) sur 2 molécules d'α-cétoglutarate pour former 2 molécules de glutamate. L'une des molécules de glutamate servira à réalimenter le cycle GS/GOGAT et l'autre à la synthèse de tous les autres composés azotés de la cellule. L'azote des groupes amide de la glutamine et amine du glutamate peut ensuite être transféré à d'autres molécules pour former les différents composés azotés de la cellule comme les acides aminés, les nucléotides ou les polyamines.

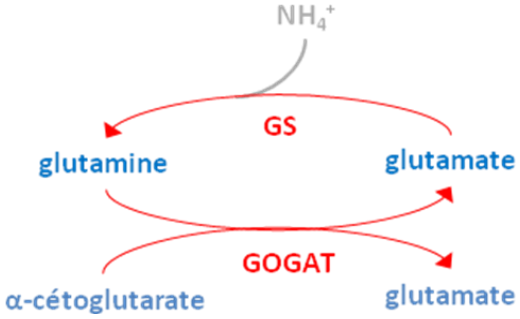



**Figure 12 : Représentation du cycle GS/GOGAT**
GS : glutamine synthétase; GOGAT : glutamate synthase

*III-2-1-1 Glutamine synthétase (GS)*

La GS est une protéine octamérique formée de 8 sous-unités disposées en deux tétramères superposés (Hirel et Lea, 2001). L'enzyme native a un poids moléculaire compris entre 350 kDa et 400 kDa. L'affinité (Km) de la GS pour le $NH_4^+$ de la GS est généralement de l'ordre de 10 à 20 µM, ce qui dénote d'une forte affinité de l'enzyme pour ce substrat (Lam *et al*., 1996). Chez les végétaux supérieurs, il existe deux isoformes de GS se différenciant par leur taille et leur localisation. La GS1 est localisée dans le cytosol et la GS2 dans les plastes (Cren et Hirel, 1999). Les activités spécifiques mais également les proportions de GS1 et GS2 varient en fonction de l'espèce étudiée, des organes de la plante, des conditions de culture et du stade de développement de la plante (McNally et Hirel, 1983 ; Cren et Hirel, 1999).

*III-2-1-1-1 GS2*

Chez la plupart des végétaux, la GS plastidiale (GS2) est codée par un seul gène (Lightfoot *et al*., 1988; Becker *et al*., 1992). La sous-unité de la protéine native a un poids moléculaire d'environ 44 kDa. Elle est synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'une protéine précurseur d'environ 49 kDa. Cette dernière possède un peptide signal localisé à l'extrémité N-terminal de la protéine qui est clivé lors de son entrée dans le chloroplaste. En effet la GS2 est essentiellement présente dans les tissus chlorophylliens, en particulier dans le stroma des chloroplastes (Cullimore *et al*., 1984 ; Cullimore et Benett, 1988 ; Carvalho *et al*., 1992 ; Pereira *et al*., 1992).

La GS2 joue un rôle important dans l'assimilation du $NH_4^+$ provenant de la réduction du $NO_3^-$ absorbé chez les plantes en C3 et en C4. Il joue également un rôle dans la réassimilation du $NH_4^+$ issu de la photorespiration chez les espèces en C3 (Lea et Miflin, 1974 ; Woo *et al*., 1982). Ainsi, alors que chez les plantes en C3 comme le blé, la GS2 est prédominante dans tous les tissus photosynthétiques (mésophylle foliaire), chez les plantes en C4, où la photorespiration est minime, des quantités égales de GS1 et GS2 sont détectées dans les différents organes (McNally *et al*., 1983 ; Becker *et al*., 1992). Il existe donc une réelle différence entre les plantes C3 et C4 vis-à-vis de l'assimilation du $NH_4^+$, ces dernières semblant être globalement plus efficaces au niveau de l'assimilation de l'azote (Oaks, 1994).

Dans les feuilles photosynthétiques, qu'elles soient jeunes ou matures, les activités des GS chloroplastiques et cytosoliques ont été mesurées chez différentes espèces et ont confirmé qu'elles assimilent toutes les deux l'ammonium. Les quantités de GS1 et de GS2 sont équivalentes dans les cellules de la gaine périvasculaire du maïs (espèce C4). Malgré tout, le niveau de GS cytosolique (GS1) est 1,8 fois plus élevée que celui des enzymes chloroplastiques (GS2) dans les cellules du mésophylle ce qui montre bien l'importance de cette enzyme (Becker *et al.*, 1993).

### *III-2-1-1-2 GS1*

La GS1 est généralement une protéine hétéro-octamérique chez laquelle chaque sous-unité est codée par un gène d'une famille multigénique. La modification de la composition en sous-unités de la GS1 est principalement due à une expression différentielle des gènes codant la GS1 au sein des différents organes de la plante, au cours de son développement (Cock *et al.*, 1991). La GS1 est codée par 2 à 5 gènes selon l'espèce étudiée. Des études ont montré la présence de 5 gènes codant la GS1 chez Arabidopsis (Ishiyama *et al.*, 2004) et le maïs (Hirel *et al.*, 2005) et 3 gènes codant la GS1 chez le blé (Habash *et al.*, 2007).

Une étude menée sur le maïs par Martin *et al.* en 2006 a permis de localiser l'expression de gènes codant 5 isoformes de la GS1. Ils se trouvent dans le mésophylle des feuilles (*GS1-3*), dans les cellules de la gaine périvasculaire (*GS1-4*), dans l'épiderme des feuilles (*GS1-5*). Certaines isoformes se trouvent également dans d'autres organes tels que le cortex des racines (*GS1-1*) ou dans le phloème (*GS1-2*).

La GS1 (cytosolique) est particulièrement importante pour l'assimilation d'ammonium provenant de différentes sources, à la fois pour l'assimilation de l'ammonium primaire et le recyclage de l'azote (Bernard et Habash, 2009). En effet, un certain nombre d'études suggèrent que la GS1 serait majoritairement impliquée dans le contrôle du transport des acides aminés et dans le recyclage de l'ammonium libéré au cours du catabolisme des protéines (Dubois *et al.*, 1996 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2000 ; Tercé-Larforgue *et al.*, 2004). Elle jouerait également un rôle dans la remobilisation de l'azote inorganique provenant de la sénescence des feuilles pour le remplissage du grain chez les espèces annuelles (Hirel *et al.*, 2007). Une étude réalisée chez le blé montre la présence de GS1 dans les tissus vasculaires. Lors de la sénescence foliaire, les transcrits de GS1 sont fortement présents au niveau des cellules compagnes de phloème et dans les cellules du parenchyme proche du xylème. Ces résultats suggèrent un rôle majeur de la GS1 dans l'assimilation du $NH_4^+$ lors des phases de remobilisation de l'azote vers le grain (Bernard *et al.*, 2008).

Chez le maïs, la GS1-4 est susceptible d'être impliquée dans la réassimilassions de l'ammonium libéré pendant la dégradation des protéines pour fournir de la glutamine pendant la période de remplissage du grain (Martin *et al.*, 2006). Toujours chez le maïs, l'induction du gène *gln1-3* à la fin de la croissance foliaire a également été observée. Ceci suggère qu'une isoforme spécifique de la GS (GS1-3) est impliquée dans la remobilisation du $NH_4^+$ issu de la dégradation de protéines au cours de la sénescence (Brugière *et al*., 2000 ; Tercé-Laforgue *et al*., 2004 ; Hirel *et al*., 2005 ; Bernard *et al*., 2008).

L'étude de Martin *et al.* menée en 2006 remet en cause le rôle de l'isoenzyme GS1-3 dans la remobilisation. Il suggère qu'elle serait spécifiquement impliquée dans l'assimilation de l'ammonium provenant de la réduction des nitrates. D'autres études sur la GS présente dans les racines indiquent que la GS cytosolique est importante pour l'efficacité d'assimilation de l'azote, la croissance des plantes et l'accumulation de la biomasse (Bernard et Habash, 2009). Dans les racines d'orge, l'activité GS est plus élevée chez les plantes cultivées en présence de nitrate. Cette plus grande activité suggère que la GS cytosolique serait impliquée dans l'assimilation de l'ammonium provenant de la réduction des nitrates dans les racines (Peat et Tobin, 1996 ; Tobin et Yamaya, 2001).

Une étude de mutants d'insertion pour le gène *Os-Gln1;1* menée sur le riz montrent une réduction très importante de leur croissance et de leur rendement, due à une baisse des teneurs en protéine GS1 et de l'activité enzymatique correspondante (Tabuchi *et al*., 2005).

Cependant des études sur des pois surexprimant cette GS1 dans les racines n'a montré aucun effet cohérent sur la biomasse totale (Fei *et al.*, 2003).

Même si les fonctions de certaines isoformes de la glutamine synthétase semblent assez controversées, la glutamine semble être une enzyme clé du métabolisme azoté.

### *III-2-1-1-3 Régulation de l'expression de la GS*

L'expression de la GS dans la cellule végétale est peut être régulée à plusieurs niveaux (Cren et Hirel, 1999). La transcription du gène codant la GS2 est régulée par la lumière et le nitrate (Edwards et Coruzzi, 1989 ; Migge *et al*., 1996). Finnemann et Schjoerring, (1999) et Oliveira et Coruzzi (1999) ont montré que la présence de saccharose et d'acides aminés dans le milieu de culture d'Arabidopsis modifiaient l'expression des gènes *GLN1;1, GLN1;2* et *GLN1;3.* Ceci suggère donc que la régulation métabolique de la GS1 est liée à la présence relative de squelettes carbonés et d'acides aminés (notamment la glutamine) accumulés dans les racines (Ishiyama *et al*., 2004). D'autres facteurs tels que le vieillissement de la feuille et les stress biotiques et abiotiques semblent également affecter l'expression de la GS1 (Bauer *et al*., 1997 ; Buchanan-Wollaston et Ainsworth, 1997). D'autres travaux ont montré que la GS1 était également régulée au niveau post-transcriptionnel. L'activité de la GS1 est ainsi régulée par des systèmes de phosphorylation et déphosphorylation qui la protègerait de la dégradation lors de la sénescence foliaire (Finnemann et Schjoerring, 2000). Ces phosphorylations permettraient donc à la plante d'assurer la remobilisation de l'azote le plus longtemps possible.

### *III-2-1-2 Glutamate synthase (GOGAT)*

Chez les végétaux supérieurs, on distingue deux types d'activité GOGAT, l'une dépendante de la ferrédoxine (Fd-GOGAT: EC 1.4.7.1) et l'autre des pyridines nucléotides (NADH-GOGAT : EC 1.4.1.14 et NADPH-GOGAT : EC 1.4.1.13) (Suzuki et Gadal, 1984).

Les deux GOGAT sont catalysées par des protéines distinctes, de masses moléculaires et de charges différentes. Pour la spécificité NADH ou NADPH, on ignore encore s'il s'agit d'une protéine sans spécificité ou de deux protéines distinctes vis-à-vis des pyridines nucléotides. Les GOGAT sont des enzymes monomériques d'un poids moléculaire variant de 130 à 180 kDa pour les Fd-GOGAT et de 200 à 240 kDa pour les NAD(P)H-GOGAT (Suzuki et Gadal, 1984).

Les activités relatives des Fd-GOGAT et NAD(P)H-GOGAT varient largement en fonction des organes et surtout de l'âge de la plante. La Fd-GOGAT et la NADH-GOGAT sont localisées toutes les deux dans les plastes et les chloroplastes (Oliveira *et al*., 1997). La Fd-GOGAT joue un rôle majeur dans les tissus chlorophylliens où, comme la GS2, elle est localisée dans les chloroplastes. L'activité de la Fd-GOGAT augmente au cours de la maturation des tissus et tend de manière générale à remplacer l'activité de la NADH-GOGAT (Suzuki et Gadal, 1984). Chez les plantes supérieures, les gènes de Fd-glutamate synthase et de NADH-glutamate synthase sont régulés par la lumière, et par les métabolites de carbonés et azotés (Suzuki et Knaff, 2005).

### III-2-2 Glutamate déshydrogénase (GDH)

La glutamate déshydrogénase est une enzyme ubiquiste présente chez tous les organismes vivants. Elle est caractérisée biochimiquement chez de nombreux végétaux (Stewart *et al*., 1980 ; Srivastava et Singh, 1987). La GDH catalyse une réaction réversible en présence de NAD(H) ou de NADP(H) (figure 13). Dans le sens de l'amination, elle permet de synthétiser du glutamate à partir d'α-cétoglutarate et de $NH_4^+$. Dans le sens de la désamination, elle permet de produire de l' α-cétoglutarate et du $NH_4^+$ à partir d'une molécule de glutamate et d'une molécule d'eau.

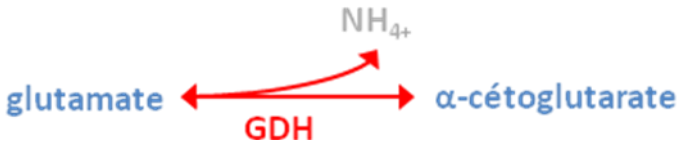



**Figure 13 : Représentation des activités aminante et désaminante de la GDH**
GDH : glutamate déshydrogénase

Actuellement, deux formes de la GDH ont été identifiées chez les plantes : une forme dépendante du NADH (NAD(H)-GDH : EC 1.4.1.2) localisée dans les mitochondries (Loulakakis et Roubelakis-Angelakis, 1990 ; Turano *et al*., 1997 ; Restivo, 2004) et une forme dépendante du NADPH (NADP(H)-GDH : EC 1.4.1.4). Cette forme est localisée préférentiellement dans les chloroplastes (Bascomb et Schmidt, 1987). Chez toutes les plantes étudiées, au moins deux gènes GDH codant deux sous-unités distinctes α et β ont été

identifiés (Purnell *et al*., 2005). Des analyses protéiques effectuées chez de nombreuses espèces ont permis de déterminer que le poids moléculaire de chacune des sous-unités de la GDH est de l'ordre de 43 à 42,5 kDa pour les sous-unités distinctes α et β. Le poids moléculaire de la GDH native est compris entre 208 et 270 kDa. L'affinité de la GDH pour le $NH_4^+$ est très faible (> 1mM) par comparaison avec l'affinité de la GS (10 à 20 µM) pour cet ion (Stewart *et al.*, 1980). Ceci constitue une argumentation supplémentaire confortant la conclusion que la GDH n'intervient peu ou pas dans l'assimilation primaire du $NH_4^+$ *in vivo* (Lam *et al.*, 1996 ; Melo-Oliviera *et al.*, 1996).

Avant la découverte du couple d'enzymes GS/GOGAT (Lea et Mifflin, 1974), il était admis que la GDH jouait un rôle majeur au cours de l'assimilation du $NH_4^+$. En réalité, la GDH ne semble pas jouer un rôle majeur dans son assimilation, sauf en cas de stress ou lors de phases particulières de développement comme la remobilisation de l'azote (Becker *et al*., 2000 ; Dubois *et al*., 2003 ; Masclaux-Daubresse *et al*., 2006).

L'ensemble des études suggèrent qu'*in vivo*, en condition de culture non stressante, la GDH joue un rôle catabolique. La régulation de la GDH repose sur les disponibilités cellulaires en carbone. En conditions limitantes en carbone, la GDH désaminerait le glutamate pour fournir de l'α-cétoglutarate au cycle de Krebs (Robinson *et al*., 1991; Melo-Oliveira *et al*., 1996 ; Masclaux-Daubresse *et al*., 2002 ; Restivo, 2004). Dans le cas précis de culture soumise à un stress ammoniacal, la GDH serait capable d'aminer de l'α-cétoglutarate en glutamate permettant de contrecarrer les effets toxiques d'un excès d'ammonium (Tercé-Laforgue *et al*., 2004 ; Melo-Oliveira *et al*., 1996).

### III-2-3 Asparagine synthétase (AS)

L'asparagine synthétase (AS; EC 6.3.5.4) catalyse en présence d'ATP le transfert de l'ammonium (ou du groupement amide de la glutamine) sur l'aspartate pour générer du glutamate et de l'asparagine (figure 14).

**Figure 14 : Représentation de l'activité asparagine synthétase**
AS : asparagine synthétase

L'asparagine est un acide aminé important dans les plantes telles que le maïs. L'AS étant la voie principale de la synthèse de l'asparagine dans les plantes, elle joue donc un rôle très important dans le métabolisme de l'azote. Toutes les AS des plantes étudiées à ce jour ont montré une très forte préférence pour la glutamine par rapport à l'ammonium comme donneur de groupement amide (Duff *et al.*, 2011). Le nombre de gènes codant pour les AS varie selon les espèces. L'assimilation de l'ammonium inorganique en asparagine est utilisé pour le recyclage de l'azote, le transport et le stockage est un processus essentiel pour le développement des plantes en réponse aux signaux environnementaux et internes tels que la lumière, l'obscurité, la disponibilité en azote et en sucres, ainsi qu'aux stress biotiques et abiotiques (Gaufichon *et al.*, 2010).

La structure de l'asparagine synthétase étudiée chez toutes les espèces végétales est homologue à celle observée chez *E. coli*. Il y a trois gènes chez Arabidopsis codant une asparagine synthétase : *ASN1*, *ASN2* et *ASN3*. Ils codent respectivement pour des polypeptides de 65,5 kDa, 65 kDa et de 65,2 kDa. On trouve de fortes similitudes entre leurs séquences d'acides aminés. Selon la terminologie utilisée par Lam *et al.* en 1998, l'ASN1 *d'Arabidopsis thaliana* appartient à la classe I tandis que l'ASN 2 et 3 appartiennent à la classe II. Plusieurs études ont montré que les *ASN1* et *ASN2* sont exprimées différentiellement lors du développement des plantes. Il a été suggéré qu'ASN1 jouerait un rôle dans la mobilisation de l'azote pendant la germination des semences. Elle aurait également un rôle lors de la remobilisation de l'azote pendant la sénescence des feuilles et le développement des graines. ASN2 quant à elle serait impliquée dans le recyclage de l'azote en cas de stress pendant le développement végétatif (Gaufichon *et al.*, 2010).

Chez le maïs, 4 gènes d'asparagine synthétase ont été identifiés : le gène *AsnS1* code une protéine de 65 kDa appartenant à la classe II, *AsnS2* pour une protéine de 66 kDa de

classe I et *AsnS3* et *AsnS4* pour des protéines entrant dans la classe III avec des poids moléculaires respectivement de 65 et 67.5 kDa. *AsnS1* et *AsnS4* sont exprimés dans l'ensemble des tissus, *AsnS3* uniquement dans les racines et *AsnS2* est exprimé dans les tissus non-chlorophylliens (Todd *et al.*, 2008).

## III-3 Synthèse des acides aminés et des protéines

Les acides aminés dont des petites molécules organiques, cristallisables, en majeure partie solubles dans l'eau. Ils portent sur leur carbone α des fonctions amines ($-NH_2$) et acide (COOH), un hydrogène et un radical R, groupement organique qui diffère selon l'acide aminé. Ils jouent des rôles essentiels dans l'assimilation de l'azote, le transport des organes sources vers les organes puits, la synthèse des hormones, les mécanismes de défenses des plantes et bien sur dans la synthèse des protéines. Même si les plantes peuvent contenir plus de 200 acides aminés différents, seuls 20 d'entre eux sont nécessaires pour la synthèse des protéines (Marshner, 1995).

### III-3-1 Synthèse des acides aminés

Les voies de biosynthèse des acides aminés sont maintenant bien connues chez les plantes. Les voies de synthèse sont très souvent branchées, c'est-à-dire que plusieurs acides aminés peuvent être issus d'un précurseur unique (Miflin et Lea, 1982 ; Lea et Forde, 1994). Le métabolisme des acides aminés nécessite de l'énergie et des squelettes carbonés qui seront principalement fournis par la photosynthèse durant la journée et par la respiration durant la nuit. La synthèse des acides aminés serait régulée par la lumière, la disponibilité en sucres, en certains acides aminés comme la glutamine ou encore en nitrate (Morot-Gaudry *et al.*, 2001).

Le glutamate est une molécule centrale dans le métabolisme des acides aminés chez les plantes supérieures. Le groupement amine du glutamate est directement impliqué dans les l'assimilation de l'ammonium et peut être transféré à tous les autres acides aminés (Forde et Lea, 2007). Des transaminases catalysent le transfert d'un groupe α-aminé d'un acide aminé au carbone α d'un acide cétonique, produisant ainsi un nouvel acide aminé et un acide cétonique (Givan, 1980). Les transaminases des plantes peuvent catalyser toutes les réactions de transaminations avec tous les acides aminés à l'exception de la proline (Givan, 1980 ; Ireland et Joy, 1985). Ces enzymes se trouvent dans différents compartiments de la cellule : cytosol, mitochondries, plastes, et peroxysomes (Forde et Lea, 2007).

La glutamine puis le glutamate sont les deux premiers acides aminés synthétisés par les plantes après l'intégration de l'ion $NH_4^+$ aux squelettes carbonés au cours du cycle GS/GOGAT. Le groupement amine peut ensuite être transféré de la glutamine et du glutamate vers l'aspartate au cours d'une réaction catalysée par l'aspartate aminotransférase (AspAT ; EC. 2.6.1.1) ou vers l'asparagine par l'asparagine synthétase (AS ; EC. 6.3.5.4) (figure 15).

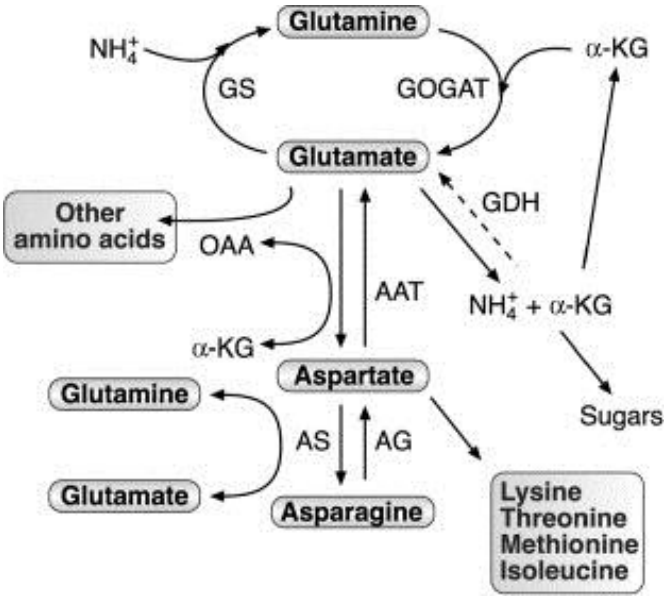



**Figure 15 : Représentation schématique de l'assimilation de l'ammonium et de la synthèse des autres acides aminés**

GS : glutamine synthétase ; GOGAT : glutamate synthase ; AAT : aspartate amino-transférase ; GDH : glutamate déshydrogénase ; AS : asparagine synthétase ; AG : asparaginase ; OAA : oxaloacétate ; α-KG : α-cétoglutarate

(Galili *et al.*, 2008).

Ces quatre acides aminés sont majoritaires chez la plupart des plantes supérieures. Par exemple, chez Arabidopsis, ils représentent à eux seuls plus de 60% des acides aminés totaux (Lam *et al.*, 1995). Le groupe amine du glutamate peut également être transféré au pyruvate pour former l'alanine sous l'action de l'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2). Il peut être transféré à l'oxaloacétate pour former l'aspartate sous l'action de l'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1). L'aspartate est un précurseur de la proline et de la glycine (Forde et Lea, 2007), de l'asparagine (Lea *et al.*, 2007) et de la lysine, la thréonine, la méthionine et isoleucine (Azevedo *et al.*, 2006). Le glutamate est également le précurseur de l'arginine et permet la synthèse de l'ornithine, la citrulline, et l'arginosuccinate (Slocum, 2005).

### III-3-2 Synthèse des protéines

Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés unis par une liaison amide, dite liaison peptidique, établie entre le groupement α-carbonyle de l'un et le groupement α-aminé du suivant. Les acides aminés sont assemblés par les ribosomes au cours de la traduction de l'ARNm lui-même issu de la transcription de l'ADN. Plusieurs protéines peuvent être codées par un même gène, donc un organisme possède une très grande diversité de protéines. Les protéines comptent entre 100 et 2 000 résidus d'acides aminés et leur poids moléculaire moyen est compris entre 11 000 et 220 000 daltons. Chez les plantes, la synthèse de protéines se passent dans trois compartiments cellulaires distincts : environ 75% sont synthétisées dans le cytoplasme, 20% dans les chloroplastes et 2 à 5% dans les mitochondries (Buchanan, 2000).

Plusieurs classifications existent pour les protéines, selon leur composition : holoprotéines ou hétéroprotéines (constituées uniquement d'acides aminés ou contenant un groupement prosthétique) ou encore selon leur forme globale : protéines fibreuses, globulaires ou mixtes. Depuis quelques années, avec le développement de la protéomique (étude des ensembles de protéines : rôle, structure, localisation, interactions ...), on essaie de classer les protéines selon leur fonction. La PPDB (Plant Proteomics Database) est une base de données recensant l'ensemble des protéines expérimentalement identifiées chez Arabidopsis et le maïs. Elle permet une classification des protéines en 34 catégories selon leur fonction.

L'azote assimilé au cours de la croissance est surtout utilisé pour l'élaboration de l'équipement enzymatique et en particulier pour la construction de la machinerie photosynthétique.

Chez les céréales, au cours de la sénescence, ces protéines enzymatiques sont hydrolysées et l'azote qui en est issu est réutilisé pour la synthèse des protéines du grain. Les protéines représentent 10 à 15% de la matière sèche dans les graines de céréales 40 à 50% chez certaines légumineuses. Environ 50 à 85% de ces protéines sont des protéines de stockage (Shewry, 2007). Ces protéines sont classées en fonction de leur solubilité 3 groupes : les albumines, les globulines and les prolamines (Heldt et Piechulla, 2011).

Chez les herbacées, l'azote est stocké temporairement sous forme de protéines de réserve dans les racines. Après la coupe, ces protéines sont hydrolysées pour assurer les besoins en azote des nouvelles repousses. Chez les ligneux, l'azote est stocké dans les racines,

l’écorce et les parenchymes ligneux et réutilisé au besoin lors de la croissance des nouvelles tiges et feuilles. Des protéines particulières de réserve (Vegetative Storage Proteins) ont été mises en évidence dans les différents tissus des plantes herbacées et ligneuses (Morot-Gaudry *et al.*, 2001). Les VSP peuvent représenter jusqu'à 50% des protéines solubles totales dans les divers organes de stockage. Les VSP se distinguent des protéines de stockage des graines dans le sens où elles s'accumulent transitoirement et sont dégradées au sein d'un cycle de vie de la plante.

# IV- Transport et remobilisation des molécules carbonées et azotées

## IV-1 Transport

Les tissus du phloème sont constitués d'éléments conducteurs, les tubes criblés, associés à des cellules compagnes, des cellules parenchymateuses et parfois des fibres. Les tubes criblés sont des cellules vivantes allongées mais dépourvues de noyau, connectées par des cribles. Le phloème joue un rôle essentiel dans la distribution de différents composés (sucres, acides aminés, protéines, vitamines, hormones, ions ou encore ARNm)

Le phloème assure le transport de la sève élaborée des organes photosynthétiques (organes sources) vers les organes (puits). Dans les feuilles, la direction des flux de sève phloémienne varie en fonction du développement de la plante, en réponse à la capacité d'exportation des photoassimilats. Mais les feuilles ne sont pas les seuls organes se comportant, suivant les conditions physiologiques, comme puits ou source. Nous pouvons citer par exemple les organes de stockage ou de transport à partir desquels les sucres peuvent être remobilisés.

La vitesse du flux de sève phloémienne, qui peut atteindre 1 m/h, est considérable, compte tenu du diamètre des éléments criblés (de l'ordre de quelques microns). Elle est contrôlée par un flux de masse généré par la pression hydrostatique résultant de la différence de pression osmotique entre les organes «sources» et les organes «puits». Les relations source–puits, qui régulent la force respective des différents «puits» et des différentes «sources», restent l'objet d'intenses investigations par modélisation (Dinant, 2008).

### IV-1-1 Transport des molécules carbonées

Le saccharose est la forme principale de transport des glucides à longue distance. Sa concentration dans la sève élaborée peut atteindre, suivant les espèces de 0,5 à 1 M (Dinant, 2008). Même chez des espèces translocant des dérivés du saccharose (raffinose, stachyose et verbascose) ou des polyols (mannitol, sorbitol), le saccharose est toujours présent en grande quantité dans la sève phloèmienne (Lemoine, 2000).

Les glucides issus de la photosynthèse (trioses phosphates) et synthétisés dans les chloroplastes des tissus chlorophylliens sont convertis en saccharose dans le cytoplasme. Il est assez généralement admis que le saccharose est acheminé des cellules où il est synthétisé vers

les tissus vasculaires en suivant la voie symplasmique, c'est-à-dire par les plasmodesmes. Chez les espèces ayant un transport de type apoplasmique, le saccharose serait ensuite chargé dans l'apoplasme, c'est à-dire l'espace extracellulaire, au niveau de la gaine périvasculaire ou du parenchyme phloémien, par un mécanisme peu documenté. L'étape de chargement proprement dit, dans le complexe cellule compagne-élément criblé, se fait suivant les espèces soit par des transporteurs de disaccharides (voie apoplasmique) soit directement par les plasmodesmes (voie symplasmique) (Kühn et Grof, 2010).

L'identification des transporteurs de saccharose a constitué une avancée majeure. Ces transporteurs fonctionnent contre le gradient de concentration de saccharose grâce à l'action d'une pompe à proton couplée à une ATPase membranaire qui génère une force proton-motrice (cotransport proton/saccharose). Des transporteurs de saccharose sont localisés au niveau la membrane plasmique des cellules compagnes ou des éléments criblés du phloème. Les transporteurs présents dans les cellules compagnes sont impliqués dans le chargement, tandis que les transporteurs présents dans les éléments criblés sont impliqués dans le rechargement.

Des transporteurs permettant le chargement de sucres alcools, mannitol et sorbitol, ont également été identifiés. Certains transporteurs de saccharose sont localisés dans d'autres organes, comme les racines ou la graine. Ils peuvent être induits en réponse à des stress, et interviennent dans le déchargement des sucres (Dinant, 2008). Outre les transporteurs membranaires spécifiques du saccharose, les transporteurs de saccharose sur le tonoplaste contribuent à la capacité à augmenter l'accumulation de saccharose dans les organes de stockage tels que les racines de betterave à sucre ou les tiges de cannes à sucre. L'expression des transporteurs de saccharose est fortement régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel par la lumière, les phytohormones et les molécules de saccharoses elles-mêmes (Kühn et Grof, 2010).

### IV-1-2 Transport des molécules azotées

Le transport à longue distance des acides aminés est réalisé soit par la sève du xylème quand ils sont synthétisés dans les racines, soit par la sève du phloème quand ils sont synthétisés dans les feuilles. Le complexe phloémien constitué des tubes criblés et de cellules compagnes transporte les acides aminés des feuilles aux autres organes de la plante.

Le chargement des acides aminés dans le système phloémien correspond à un transport actif secondaire, comparable à celui observé dans le transport du nitrate. C'est un transport de composés chargés contre un gradient de concentration entraînant ainsi une dépense d'énergie. Un système de transport primaire, une ATPase à protons couple l'hydrolyse d'ATP à une excrétion de protons. Son fonctionnement crée un gradient de pH et une différence de potentiel électrique de chaque côté de la membrane. Ces déséquilibres entraînent le fonctionnement de systèmes de transports secondaires, des symports et des antiports, les transporteurs d'acides aminés (Morot-Gaudry *et al*., 2006). Ces dernières années, des dizaines de transporteurs d'acides aminés ont été identifiés. Ils sont spécifiques de tissus et d'organes mais pas toujours spécifiques d'un acide aminé ou d'un groupe d'acides aminés donné (Delrot *et al*., 2001). Une fois chargés dans les tubes criblés du phloème, les composés sont entraînés par le flux de masse et distribués à tous les organes de la plante. Le flux de masse résulte de la différence de concentration en composés entre le lieu de chargement et de déchargement et des mouvements d'eau qui l'accompagnent (Brouquisse *et al*., 2001).

La composition en acides aminés, en particulier dans le phloème est différente entre les espèces (Winter *et al*., 1992 ; Caputo et Barneix, 1997) et varie en fonction de l'âge de la plante (Peeters et van Laere, 1994). Les composés principaux que l'on trouve dans les sèves sont des amides tels que l'asparagine (qui peut représenter jusqu'à 86% de l'azote transporté ; Lea et Miflin, 1980) et la glutamine et des acides aminés acides comme le glutamate et l'aspartate (Hayashi et Chino, 1990). Les concentrations en acides aminés dans le phloème sont largement supérieures à celles trouvées dans le xylème. De plus, les concentrations et les rapports en acides aminés ne sont pas constants le long des faisceaux conducteurs et il existe de nombreux échanges entre xylème et phloème afin de répondre rapidement aux besoins de la plante (Pate, 1980).

## IV-2 Remobilisation

### IV-2-1 Remobilisation des molécules carbonées

Les processus de dégradation et de remobilisation des réserves carbonées ont fait l'objet de nombreuses reviews ces dernières années. Pendant la journée, l'amidon et le saccharose ainsi que les produits d'assimilation du carbone photosynthétique sont synthétisés dans les feuilles. Le saccharose est exporté vers les parties non photosynthétiques de la plante, et l'amidon s'accumule dans les chloroplastes. Dans les organes non photosynthétiques (par

exemple, tiges, racines, tubercules et graines), le saccharose peut être converti en amidon pour un stockage à long terme, souvent à des niveaux élevés, dans les plastes spécialisés appelés amyloplastes. Cet amidon de stockage est remobilisé pour soutenir les phases de croissance (par exemple, l'établissement des plantules après germination) ou pour satisfaire la demande locale élevée pour le carbone pour des processus spécifiques (Smith *et al.*, 2005 ; Smith et Stitt, 2007 ; Zeeman *et al.*, 2010).

- *Dans les feuilles*

Pendant la nuit suivant la synthèse, l'amidon est dégradé pour fournir des substrats pour la synthèse de saccharose pour permettre l'exportation en continu vers les parties non photosynthétiques de la plante. Ceci permettra de fournir des squelettes carbonés, de l'énergie, et des pouvoirs réducteurs à la cellule de la feuille. L'offre de glucides fournis par la dégradation de l'amidon des feuilles durant la nuit est essentielle pour la croissance normale de la plante. Il peut y avoir des variations dans la voie de dégradation de l'amidon entre les espèces et l'évolution des conditions de développement et d'environnement. En effet, certaines espèces comme la fléole des prés (*Phleum pratense*) accumulent peu ou pas d'amidon dans leurs feuilles pendant la journée et comptent principalement sur le saccharose vacuolaire ou les fructanes pour un apport de glucides pendant la nuit (Smith et *al.*, 2005).

La dégradation de l'amidon fait intervenir plusieurs enzymes. La première étape dans la voie de dégradation de l'amidon est catalysée par des enzymes capables de métaboliser les polymères à la surface du grain d'amidon. Plusieurs types d'enzymes semblent capables de libérer des glucanes solubles à partir des grains d'amidon : l'α-amylase ainsi que des enzymes phosphorylant l'amidon comme les GWD (glucan water dikinase) et les PWD (phosphoglucan water dikinase). Les activités enzymatiques dégradant de l'amidon sont modulées par les niveaux de pH, de potentiel redox, et de concentrations en oligosaccharides, notamment de maltose.

- *Dans les organes de stockage*

Alors que la dégradation de l'amidon des feuilles peut être étudiée sur une période définie, courte, et contrôlable, le processus est beaucoup moins facile à étudier dans de nombreux autres organes (racines, tubercules, rhizome). La dégradation de l'amidon peut se

produire sur de longues périodes, pendant lesquelles il y a de profonds changements selon l'état de développement de l'organe concerné. Fréquemment, l'étendue et le taux de dégradation ne peut être mesurée avec précision, car il peut se produire en parallèle avec la synthèse de l'amidon et à des vitesses différentes dans différentes parties de l'organe (Smith *et al.*, 2005).

### IV-2-2 Remobilisation des molécules azotées

Pour assurer leur croissance, les végétaux absorbent et métabolisent l'azote nécessaire à la synthèse de leur structure cellulaire et à l'élaboration de leur équipement enzymatique. Cet azote est assimilé essentiellement sous forme d'acides aminés et de protéines dans les racines, les tiges, les feuilles, les graines et les tubercules. Lorsque la croissance et le développement de nouveaux tissus nécessitent des besoins en azote importants, les plantes mobilisent leurs réserves azotées accumulées depuis ces différents organes (Morot Gaudry *et al.*, 2001). Le stockage et la remobilisation de l'azote sont importants aussi bien pour les plantes annuelles que pour les plantes pérennes. Pour les plantes annuelles, la remobilisation est importante pour la production de graines et pour le contenu de ces graines en azote. Ce contenu déterminera la capacité de germination et la survie des nouvelles générations. La remobilisation est aussi très importante pour les plantes pérennes. Les arbres présentent deux phases de remobilisation de l'azote. L'azote est remobilisé des feuilles sénescentes en automne pour être stockées dans les rameaux, le tronc ou les racines durant l'hiver. Il est ensuite remobilisé une seconde fois pour le développement des organes au printemps avant que l'absorption d'azote par les racines ne devienne le principal moyen pour assurer la demande en azote de l'arbre. La remobilisation et l'azote absorbé par les racines contribuent à former un pool d'azote stocké et l'efficacité d'utilisation de cet azote est essentielle pour la survie de la plante durant plusieurs années (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Les plantes partagent les mêmes mécanismes de remobilisation qu'elles soient monocotylédones ou dicotylédones, à photosynthèse C3 ou C4. La sénescence foliaire peut être initiée par différents facteurs : un grand nombre de gènes sont surexprimés durant la sénescence ils sont appelés senescence-associated genes (SAGs) (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Certaines hormones comme l'acide gibbérellique, l'auxine et la cytokinine semblent retarder la sénescence, alors que d'autres comme l'éthylène semble l'induire. Différents éléments suggèrent des processus épigénétiques dans le contrôle de sénescence des feuilles

(inhibition de l'acétylation des histones). En plus de ces phénomènes, il est prouvé que le statut métabolisme C/N de la feuille sert de signal général qui peut induire la sénescence des feuilles tout comme les modifications de luminosité et les teneurs en sucres (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

La dégradation des protéines constitue la première étape de la remobilisation ; cela se traduit par une forte augmentation de l'activité protéolytique des enzymes présentes dans les feuilles (Hörtensteiner et Feller, 2002). C'est principalement dans les tissus photosynthétiquement actifs et en particulier dans les chloroplastes qu'est localisé le stock protéique remobilisable (Peoples et Dalling, 1988). Les protéines du stroma, et en particulier la rubisco, mais aussi les protéines des thylakoïdes représentent en effet jusqu'à 75% de l'azote remobilisable.

Les chloroplastes sont la principale source de nutriments utilisée lors de la sénescence. La rubisco représente 50% des protéines solubles totales contenu dans les feuilles des plantes en C3 contre 20% pour les C4. (Sage *et al.*, 1987). Les chloroplastes montrent les premiers symptômes de dégradation, les autres organites étant dégradés ultérieurement. Les mécanismes de dégradation de ces chloroplastes sont encore mal connus cependant il semble que leur dégradation soit contrôlée pour prévenir tout dommage engendré par leur produits de dégradation et pour maintenir la capacité d'export et de remobilisation. Les premières étapes de dégradations de la chlorophylle et des protéines du chloroplaste débutent en même temps que la dégradation du chloroplaste lui-même. La dégradation des protéines plastidiales s'opère au moins en partie dans les plastes encore intacts au départ de la sénescence (Hörtensteiner et Feller, 2002 ; Adam et Clarke, 2002). Elle est initiée par un ensemble de protéases présentes dans le chloroplaste lui-même qui sont surexprimées au moment de la sénescence. La protéolyse est peut être initiée par la surproduction de ROS (formes réactives de l'oxygène) à l'intérieur de l'organite au moment de la sénescence. Les effets de ROS sont habituellement inhibés par un ensemble de d'enzymes anti oxydative. Il semble que la fin de dégradation des protéines du chloroplaste soit réalisée par protéases synthétisées par la vacuole ainsi que par des autophagosomes ou des SAP (senescence associated-protein).

La dégradation des protéines du chloroplaste implique la protéolyse de la NiR, la GS2 et de la GOGAT. De ce fait le recyclage et la remobilisation de l'azote nécessitent d'être catalysés par d'autres enzymes. Certains gènes du métabolisme azoté codant pour des

enzymes telles que la GS1, la GDH et l'AS sont alors induits (Masclaux Daubresse *et al.*, 2008).

Suite à l'hydrolyse complète des protéines par des endopeptidases et des exopeptidases, une libération d'un pool d'acides aminés libres est observée (Brouquisse *et al.*, 2001). Utilisant ce pool d'acides aminés, une série de transaminations entrainerait une augmentation du pool de glutamate. Ce dernier servirait immédiatement comme substrat pour la GDH dont l'activité désaminante produirait de l' α-cétoglutarate et de l'ammonium. Cet ammonium serait ensuite réassimilé par la GS1 pour produire de la glutamine pour le transport. Cet ammonium ou cette glutamine pouvant également être assimilés par l'AS pour former de l'asparagine (acide aminé de transport et de réserve). Après le déchargement du phloème dans l'organe puits, les acides aminés subissent des modifications biochimiques permettant la synthèse des protéines (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet régional MISCAZOTE dont le but était d'étudier le fonctionnement de la culture de miscanthus. Ce projet a été réalisé en collaboration entre l'unité EDYSAN de l'UPJV, l'UMR SADV Estrées-Mons-Lille, l'US Agro-Impact de Laon-Estrées-Mons et l'UMR FARE de Reims.

Afin de comprendre comment cette plante était capable de produire aussi rapidement autant de biomasse sans apport d'azote, nous nous sommes intéressés au métabolisme carboné ainsi qu'au métabolisme azoté du *Miscanthus x giganteus* avec 3 objectifs principaux :

1- Identifier les flux, les formes de stockage et les formes de transport des glucides au cours d'un cycle de croissance de la plante.

2- Caractériser les flux, les formes de stockage et les formes de transport de l'azote dans la plante.

3- Identifier les enzymes responsables de l'assimilation et de la remobilisation de l'azote dans les différents organes de la plante.

Cette approche intégrative de la physiologie du miscanthus est d'autant plus intéressante que peu d'études ont été réalisées sur des espèces proches et ayant les mêmes caractéristiques que le miscanthus.

Afin de répondre à ces différents objectifs, nous avons dû mettre en œuvre des approches intégratives impliquant des déclinaisons techniques aussi bien agronomiques, physiologiques que biochimiques.

# MATERIELS ET METHODES

## I- Matériel végétal

L'ensemble des analyses a été réalisé sur l'hybride interspécifique *Miscanthus x giganteus*. Les analyses ont été réalisées sur des plantes cultivées sur 4 dispositifs expérimentaux différents, trois en champs et un en serre. Les dispositifs 1, 2 et 3 étaient situés sur le site d'expérimentations d'Estrées-Mons en Picardie. Le sol est de type argilo limoneux, constitué de 74% de limon, 7,6% d'argile et 5% de sable avec un pH de 7,6. La parcelle est située sous un climat est océanique, avec des précipitations moyennes de 625 mm par an et une température moyenne de 10,7° C pour les 10 dernières années.

### I-1 Dispositif 1

Le premier dispositif d'étude est une parcelle de 550 $m^2$ implantée depuis 5 ans. Les rhizomes ont été plantés à la main à une profondeur de 10 à 15 cm avec une densité initiale de 2 plantes par $m^2$ avec un espacement de 80 cm. Aucun amendement n'a été apporté avant ou après l'implantation et la récolte des parties aériennes a été effectuée chaque année en février.

Ce dispositif a été utilisé pour l'étude des glucides non structuraux. Pour cette étude, des prélèvements « partiels » ont été réalisés au printemps, en été, en automne et en hiver sur deux cycles complets de culture. Le prélèvement « partiel » correspond au prélèvement d'une tige, du rhizome et des racines attenants.

Lors des prélèvements partiels sur ce dispositif, une tige médiane (avec son rhizome et ses racines associés) a été prélevée par plante. La partie souterraine a été divisée en trois échantillons : le rhizome secondaire (RhII) qui est le prolongement de la tige, le rhizome primaire (RhI) correspondant au rhizome de l'année précédente (ayant donné naissance au rhizome secondaire) et les racines (Rac) provenant de ce rhizome secondaire. Etant peu développée au printemps, la partie aérienne n'a pas été divisée (bourgeon). En été, automne et hiver, les parties aériennes ont été divisées en 6. La division a été réalisée en fonction du nombre de nœuds de la tige. On obtient alors la tige basses (Tb), la tige moyenne (Tm), la tige hautes (Th), les feuilles basses (Fb), les feuilles moyennes (Fm) et les feuilles hautes (Fh). Entre 2 et 4 tiges ont été prélevées par prélèvement partiel chaque année.

Après les prélèvements, chaque échantillon a été placé rapidement dans un tube 25 mL référencé et plongé dans l'azote liquide. Les tubes ont ensuite été conservés à -80°C.

### I-2 Dispositif 2

Le deuxième dispositif était implanté depuis 3 ans en parcelles de 360 $m^2$ plantées à une densité de 15.6 plantes.$m^{-2}$. Ce dispositif comprend quatre traitements différents avec trois répétitions. Les traitements varient en fonction de l'apport d'engrais azotés : 0 kg d'azote.$ha^{-1}$ (N1) ou 120 kg d'azote.$ha^{-1}$ (N2), et des dates de récolte : récolte précoce (P) ou de la récolte tardive (T). Les parcelles entières de 360 $m^2$ ont été récoltées en octobre pour la récolte précoce (récolte en vert) et en février pour la récolte tardive (récolte en sec) les années précédant notre étude.

L'année de nos prélèvements, les 120 kg d'azote.$ha^{-1}$ ont été apportés juste après le prélèvement d'avril sous forme de nitrate (25%), d'ammonium (25%) et d'urée (50%). Les trois formes azotées étaient marquées de manière uniforme avec un excès isotopique de 0.417% (soit 500 g d'azote marqué $^{15}N$ par hectare).

Ce dispositif a été utilisé pour l'étude du métabolisme azoté de la plante : assimilation, mobilisation, remobilisation et stockage de l'azote dans la plante. Durant l'année, six prélèvements « destructifs » de 3 plantes de chaque condition ont été effectués. Les prélèvements ont été effectués en avril, juin, juillet, octobre, décembre et février.

Le prélèvement destructif correspond à l'arrachage de l'ensemble la plante. Ces prélèvements destructifs ont ensuite été divisés en quatre parties : les racines, les rhizomes, les tiges et les feuilles. Ces quatre parties ont été pesées puis placées en étuve afin de connaitre les biomasses fraiches et sèches de la plante et de chaque partie. En rapportant la biomasse chaque plante à la densité de plantes par hectare, nous avons pu estimer le poids de chaque échantillon par hectare. Afin d'estimer au mieux les biomasses à l'hectare, le prélèvement a été réalisé sur la plante médiane de la parcelle. Le choix de la plante médiane a été réalisé en tenant compte du nombre de tige de la plante et du nombre moyen de tiges par plantes de miscanthus sur une surface de 25 $m^2$ sur notre parcelle de prélèvement. Seules les conditions N1-T et N2-T sont présentées dans cette thèse même si les conditions N1-P et N2-P ont également été travaillées.

Sur chaque plante médiane, une tige médiane (avec son rhizome et ses racines associés) a été échantillonnée par plante. La partie souterraine a été divisée en deux parties : le rhizome secondaire et les racines provenant de ce rhizome secondaire. Les parties aériennes ont été échantillonnées en différentes parties en fonction du nombre de nœud de la tige et pesées.

Après les prélèvements et les pesées, chaque échantillon a été placé rapidement dans un tube 50 mL référencé et plongé dans l'azote liquide. Les tubes ont ensuite été conservés à -80°C.

**I-3 Dispositif 3**

Ce dispositif a été utilisé pour l'étude de la remobilisation de l'azote des parties souterraines vers les parties aériennes en début de cycle. Un marquage des parties souterraines a été réalisé l'année précédant nos prélèvements sur une surface de $36m^2$ de la parcelle du dispositif 1. Afin de rester le plus proche possible de la condition N1, une faible quantité d'azote a été apportée (5 unités d'azote sous forme liquide : $NO3^+$ + $NH4^+$) très fortement marqué $^{15}N$ (50% sur chaque forme). A la fin du cycle de l'année de marquage, l'ensemble de la biomasse aérienne a été retirée du champ afin d'éviter tout apport $^{15}N$ provenant de la minéralisation de la biomasse marquée tombée au sol. L'année suivante, deux prélèvements ont été effectués : en mai et juillet. Lors du premier prélèvement, 3 tiges ont été prélevées sur 2 plantes différentes. Lors du prélèvement de juillet (prélèvement destructif), 1 tige a été prélevée sur 6 plantes différentes. Lors de cet essai, nous ne différencierons pas les divisions des parties souterraines et aériennes.

Après les prélèvements, chaque échantillon a été pesé à l'aide d'une balance de précision (1/100$^e$ g) et placé à l'étuve.

**I-4 Dispositif 4**

Le quatrième dispositif a été réalisé avec des fragments de rhizomes récupérés en champ (dispositif 1) puis replantés en serre. Les plantes ont été cultivées durant 1 an et demi à une température de 20°C avec une photopériode de 12 h de lumière par jour. A la fin de leur premier cycle de croissance, les plantes ont été placées dans une pièce sans climatisation ni éclairage afin qu'elles subissent un hivernage. Après l'hivernage, les plantes ont été remises en serre dans les conditions décrites précédemment. Ce dispositif a été utilisé pour l'étude de la réduction et de l'assimilation du nitrate dans les feuilles de miscanthus sur un cycle court. Le suivi a été réalisé par RMN en utilisant du nitrate marqué $^{15}N$. Des feuilles jeunes ligulées des plantes cultivées en serre ont été décrochées de leur tige et plongées dans une solution de 3 mM de $NO_3^-$ marqués $^{15}N$ à 99%. Des prélèvements ont été réalisés à t = 3h. Après les

prélèvements, chaque échantillon placé rapidement dans un tube 15mL référencé et plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C.

## II- Méthodes d'analyse

Les échantillons congelés (dispositif 1, 2 et 4) ont été broyés finement à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch). Les billes et les godets ont été préalablement refroidis dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés dans un congélateur à -80°C. Une partie de ces poudres a été lyophilisée et conservée hermétiquement dans des tubes. Les poudres ont été pesées avant et après la lyophilisation afin de déterminer le pourcentage de matière sèche de chaque échantillon. Les échantillons secs (dispositif 3) ensuite ont également été broyés au broyeur à billes. Le pourcentage de matière sèche a été calculé par la différence de poids de l'échantillon avant et après le passage à l'étuve.

Pour les analyses élémentaires, des échantillons de poudre ont été pesés à l'aide d'une une balance de précision (Genius Sartorius), au $^{1}/_{100}$$^{ème}$ de mg. Pour les autres analyses, les poudres ont été pesées à l'aide d'une balance de précision SARTORIUS précise au mg.

### II-1 Analyses élémentaires

- ✓ **Détermination des teneurs en carbone et azote total et du rapport isotopique $^{15}N/^{14}N$**

Les mesures de l'azote total et de l'enrichissement isotopique en $^{15}N$ ont été réalisées par GC/C/IRMS (spectrométrie de masse des rapports isotopiques après chromatographie en phase gazeuse en flux continu) à l'aide d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse.

L'analyseur élémentaire (FLASH EA 1112 series, Thermo Electron, Bremen, GERMANY) permet la production de gaz purs $N_2$ et $CO_2$ à partir d'échantillons solides ou liquides, après flash combustion.

Les échantillons végétaux lyophilisés sont placés dans des nacelles d'étain (nacelle 0,75 ml, 10x10 mm, Courtage Analyse Service, Mont Saint Aignan, FRANCE) à raison d'environ 3 à 6 mg en fonction de l'organe de la plante. L'azote total étant en quantité moindre par rapport au carbone, la pesée de l'échantillon est basée sur la quantité d'azote qui doit être au moins de 100 µg dans l'échantillon.

Les nacelles sont introduites dans l'analyseur élémentaire grâce à un carrousel de 31 places et injectées dans le four d'oxydation sous flux d'hélium en surpression afin d'éviter

toute contamination par l'azote et le $CO_2$ de l'air. Dans le four d'oxydation (constitué d'oxyde de cuivre et d'oxyde de cobalt argenté), les échantillons subissent une flash combustion en présence d'oxygène à 920°C. Les produits de la combustion sont du $N_2$, $CO_2$, oxydes d'azote et de carbone, et $H_2O$ sous forme de traces. Les oxydes sont ensuite réduits par passage dans le four de réduction (constitué de cuivre réduit) à 650°C qui permet d'obtenir du $N_2$, $CO_2$ et toujours de l'eau sous forme de traces. L'eau sera ensuite piégée par du perchlorate de magnésium et les gaz $N_2$ et $CO_2$ seront séparés par chromatographie en phase gazeuse à 50°C puis envoyés au spectromètre de masse par l'intermédiaire du CONFLOIII (Thermo, Finnigan).

Dans le spectromètre de masse (DELTA V Advantage, Thermo Electron, BREMEN, GERMANY), les molécules de gaz sont tout d'abord ionisées. Les ions moléculaires positifs obtenus sont ensuite accélérés dans une chambre électrique puis déviés dans un champ électromagnétique. L'angle de déviation des ions moléculaires dépend de leur rapport m/z. Les molécules de $N_2$ (ou de $CO_2$) étant de même charge, cet angle de déviation est donc seulement déterminé par leur masse. Le faisceau ionique est donc séparé en trois combinaisons isotopiques possibles soit pour le $N_2$ de masse 28, 29 et 30 et pour le $CO_2$ de masse 44, 45 et 46. Trois collecteurs en métal collectent ces ions qui leur transmettent leur charge. Le courant qui est amplifié puis mesuré correspond au courant de décharge des collecteurs qui est proportionnel au nombre d'ions ayant frappé le collecteur.

La quantification de l'azote est calculée par la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 et 29 (la masse 30 n'a pas été utilisée en raison du marquage $^{15}N$ faible) et par l'utilisation d'un standard de référence (l'atropine sulfate commerciale) qui possède des pourcentages d'azote et de carbone connus.

L'enrichissement isotopique en $^{15}N$ est calculé par l'intermédiaire du rapport de masses isotopiques 29/28 (pour les échantillons enrichis) et est comparé à celui du gaz de référence étalonné par rapport à un notre standard (la leucine) dont les excès isotopiques sont connus et calibrés par rapport à l'étalon international.

- ✓ **Calcul des quantités d'azote total et de $^{15}N$**

Les teneurs en azote ($CN_{org}$) et l'excès isotopique $^{15}N$ ($E_{org}$) de chaque échantillon nous sont donnés directement par le logiciel. Ces données et les différentes pesées nous ont

permis de déterminer les quantités d'azote par organe, les quantités d'azote par plante, les quantités d'azote par hectare ainsi que les quantités d'azote marqué $^{15}N$.

Les quantités d'azote ($QN_{org}$) par organe ont été calculées en multipliant le poids sec de l'organe ($PS_{org}$) par la teneur en azote de l'organe ($CN_{org}$) :

$$\mathbf{QN_{org} = PS_{org} \times CN_{org}}.$$

Les quantités d'azote par organe par hectare ont été calculées en multipliant la quantité d'azote par organe par le poids de l'organe par hectare $PS_{org(ha)}$ :

$$\mathbf{QN_{org(ha)} = QN_{org} \times PS_{org(ha)}}.$$

Les quantités d'azote par hectare $QN_{(ha)}$ ont été calculées en additionnant l'ensemble des quantités d'azote par hectare des différents organes :

$$\mathbf{QN_{(ha)} = \sum QN_{org(ha)}}.$$

Les concentrations en azote $^{15}N$ ($C^{15}Norg$ en mg/g MS) dans les organes ont été calculées en multipliant la teneur en azote de l'organe (CNorg) par l'excès isotopique $^{15}N$ de l'organe :

$$\mathbf{C^{15}N_{org} = CN_{org} \times E_{org}}.$$

Les quantités d'azote marqué dans chaque organe ont été calculées en multipliant les excès isotopique $^{15}N$ des parties aériennes par les quantités d'azote par organe ($Q^{15}Norg$) :

$$\mathbf{Q^{15}Norg = : QN_{org} \times E_{org}}.$$

Les quantités d'azote marqué par hectare ($Q^{15}N_{(ha)}$) ont été calculées en additionnant l'ensemble des quantités d'azote marqué dans chaque organe ($Q^{15}Norg_{(ha)}$) :

$$\mathbf{Q^{15}N_{(ha)} = \sum Q^{15}Norg_{(ha)}}.$$

- ✓ **Méthode de calcul du flux de mobilisation des parties souterraines**

Pour mesurer la quantité d'azote remobilisé depuis les organes sources (parties souterraines) vers les organes puits (parties aériennes), nous avons utilisé le rapport d'allocation spécifique (RSA) comme défini par Cliquet *et al.* (1990).

$$RSA = \frac{E_{PA} - E_{PA0}}{E_{PS} - E_{PS0}}$$

$E_{PA}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties aériennes (atom%)

$E_{PS}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties souterraines (atom%)

$E_{PA0}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties aériennes des plantes témoins (atom%)

$E_{PS0}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties souterraines des plantes témoins (atom%)

## II-2 Analyse des métabolites

### II-2-1 Analyse des ions

- ✓ **Extraction des ions**

L'extraction se déroule à partir de 150 mg d'échantillons végétaux frais. A chaque échantillon est ajouté 1,5 mL d'eau. Les tubes sont ensuite placés sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être centrifugé 5 minutes à 15000 rpm à température ambiante également.

Les surnageants sont récupérés, passés sur filtres certifiés chromatographie ionique de marque PALL avec membrane PES (polyéthersulfone) de 0,45 µm. Le filtrat est placé dans un vial de 5 mL fermé par un bouchon muni d'un filtre de 20 µm afin d'être analysés par chromatographie ionique.

- ✓ **Dosage des ions**

Les ions ont été dosés à l'aide de deux chromatographies ioniques Dionex ICS 900 montées en série précédées d'un passeur AS-DV. La première chromatographie est composée d'une colonne IonPac Anionique AS22 et la deuxième d'une colonne IonPac Cationique CS12A.

Le système de chromatographie ionique Dionex ICS-900 effectue des analyses d'ions isocratiques utilisant la détection de conductivité supprimée. Le système comprend une pompe à haute pression, un injecteur d'échantillon, une colonne de séparation, un suppresseur de produits chimiques, et une cellule de conductivité ainsi qu'un éluant liquide.

Chaque colonne possède son propre éluant permettant d'entrainer l'échantillon dans le système de chromatographie ionique et de séparer les ions de l'échantillon. La composition et la concentration de l'éluant restent constantes tout au long de l'analyse. Pour le module de chromatographie anionique, l'éluant utilisé est une solution composée de carbonate de sodium ($Na_2CO_3$) à 4,5 mM et de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) à 1,4 mM. Pour le module de

chromatographie cationique une solution de 20 mM d'acide méthanesulfonique ($CH_3SO_2OH$) est utilisée.

II-2-2 Analyse des acides aminés libres

- ✓ **Extraction hydro-alcoolique acides aminés**

Un aliquot de 20 mg de poudre végétale lyophilisée est mélangé dans 1 mL d'éthanol à 80% (v/v). Le mélange est agité pendant 2 h à 4°C puis l'extrait est centrifugé pendant 5 min à 12000 g. Le surnageant est conservé et le culot subit une seconde extraction à l'éthanol 60% (v/v). Après une nouvelle agitation pendant 2 h à 4°C et une centrifugation de l'extrait, le surnageant est à nouveau récupéré et l'opération est réitérée avec de l'eau. Les trois surnageants sont ainsi rassemblés. Cet extrait a été utilisé pour le dosage des sucres solubles. Le culot servira au dosage de l'amidon. Le surnageant et le culot de centrifugation sont conservés à -20°C. Les dosages ont été réalisés en triplicat pour chaque extraction, chaque échantillon ayant été analysé 2 fois par répétition biologique.

- ✓ **Dosage des acides aminés totaux**

La teneur en acides aminés totaux est déterminée selon la méthode colorimétrique de Rosen (1957), en utilisant la glutamine comme acide aminé de référence. La technique est basée sur la réaction des groupements α-aminés avec la ninhydrine, réduite à pH 5,0 par une solution de KCN 2% dans un tampon acétate. Un volume de 10 µL d'extrait complété à 100 µL avec de l'eau sont mélangés à 50 µL d'une solution de KCN à 10 mM dilué à 2% (v/v) dans un tampon acétate 2,6 M pH 5,3 et à 50 µL d'une solution de ninhydrine à 3% dans de l'éthylène glycol monométhyl éther. Après agitation et incubation de 15 min à 100°C, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout immédiat de 500 µL d'un mélange d'isopropanol-eau (1:1, v:v). L'absorbance est mesurée à 570 nm. La comparaison de l'absorbance de l'extrait face à celle d'une gamme de glutamine permet de déduire la quantité d'acides aminés présents dans l'extrait. A cette quantité d'acides aminés totaux il faut soustraire la quantité d'ammonium calculée par chromatographie ionique.

- ✓ **Dosage des acides aminés individuels**

La détermination des acides aminés individuels a été réalisée à partir du même extrait hydroalcoolique que pour le dosage des acides aminés totaux. Celle-ci a été réalisée par HPLC sur une colonne Kromasil C18 -100 Å-5µm 4,6 x 250 mm après dérivation une pré-colonne à l'o-phtalaldéhyde (OPA). L'OPA réagit à froid, en présence de ß mercaptoéthanol et en milieu alcalin avec les acides aminés pour donner des dérivés isoindoliques fluorescents (λex = 340 nm , λem = 455 nm ).

Pour la dérivation de la pré-colonne, 50ul de l'échantillon ont été ajoutés à 50ul de tampon borate contenant 0,25% (w: v) d'OPA et 5% de β-mercaptoéthanol (v: v) et 5 µl de cette solution ont été injectés.

La phase mobile est constituée de l'éluant A: 50 mM $CH_3COONa$ (pH 7,4): 50 mM NaHPO4 (pH 7,4): MeOH: THF (48:48:2:2; v: v: v: v) et Éluant B: MeOH: de l'eau (65:35; v: v) et les gradients suivant ont été appliqués: 80% de A durant les 3 premières minutes, 80% - 70% A durant 12 min, 70% - 50% A durant 15 min, de 50% - 45% A durant 10 min, de 45% - 20% A durant 10 min, de 20% - 15% A durant 5 minutes, 15% - 10% A durant 3 min, de 10% - 0% A durant 2 min et 0% A durant 15 min à un débit constant de 1,2 ml / min.

La détection a été faite par mesure spectrofluorimétrique à 330 nm (λex) et à 430 nm (λem).

## II-2-3 Dosage des glucides non structuraux

Les dosages de glucose, fructose et de saccharose ont été réalisés à l'aide d'un kit enzymatique commercial (R-Biopharm). Ils ont été dosés à partir de la même extraction hydro-alcoolique nous ayant permis de doser les acides aminés libres. La première étape consiste à faire évaporer 1 mL de l'extrait hydroalcoolique sous vide à l'aide d'un appareil de type Speed Vac et à le reprendre dans 250 µL d'eau distillée.

- ✓ **Dosage du glucose**

A pH 7,6, l'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du D-glucose par l'ATP pour former du glucose-6-phosphate. Le glucose-6-phosphate est lui-même oxydé par le NADP en gluconate-6-phosphate en présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) en libérant du NADPH. Le NADPH, produit en quantité stœchiométrique par rapport à la

quantité de D-glucose initialement présent dans l'extrait, est mesuré au spectrophotomètre à 340 nm.

Le dosage est effectué en microplaque avec 10 à 50 µL d'extrait hydroalcoolique, selon les organes. Sont ensuite ajoutés 60 µL d'une solution de NADP-ATP fournie dans le kit. L'ensemble est complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 200 µL. Après 10 min d'incubation sous agitation à 30°C, une première lecture est effectuée à 340 nm (DO1). On ajoute ensuite 10 µL de la solution d'enzymes HK + G6PDH (diluée au 1/10$^{e}$) fournie dans le kit. Après une deuxième incubation sous agitation de 10 min à 30°C, une lecture à 340 nm (DO2) est à nouveau effectuée.

La DO correspondant à la teneur en glucose de l'échantillon (DOglu) est obtenue en soustrayant la DO2 à la DO1. La quantité de glucose est calculée en comparant cette DOglu à une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution à 0,5 g/L de glucose fournie par le kit.

- ✓ **Dosage du fructose**

Le principe du dosage repose sur la catalyse à pH 7,6 par l'hexokinase de la phosphorylation du D-fructose par l'ATP formant du fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate est converti par la phospho-glucose isomérase (PGI) en glucose-6-phosphate. Le D-glucose-6-phosphate formé est lui-même oxydé par le NADP en gluconate-6- phosphate en présence de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) en libérant du NADPH.

Le NADPH est produit en quantité stœchiométrique par rapport à la quantité de D-fructose initialement présent dans l'extrait et mesuré au spectrophotomètre à 340 nm. Le dosage est effectué à partir de la même plaque utilisée précédemment lors du dosage du glucose. On rajoute dans l'extrait uniquement 10 µL de PGI (fournie dans le kit et diluée au 1/10$^{e}$), les autres enzymes et cofacteurs étant présents dans les puits. Après une agitation de 10 min, une troisième lecture est effectuée à 340 nm (DO3). En soustrayant la DO3 à la DO2 on obtient la DO du fructose de l'échantillon (DOfru). La quantité de fructose est calculée en comparant cette DOfru à la gamme d'étalonnage de glucose. Les dosages sont réalisés en triplicat pour chaque extraction, chaque échantillon ayant été analysé 2 fois par répétition biologique.

- ✓ **Dosage du saccharose**

Le principe du dosage repose sur l'hydrolyse du saccharose par la β-fructosidase à pH 4,6 en D-glucose et D-fructose.

La teneur en saccharose correspond à la quantité de glucose formé par la β-fructosidase auquel on retranche le glucose initialement présent dans l'extrait (DO2 mesurée précédemment).

Le dosage est également effectué en microplaque à partir de 30 à 100 µL d'extrait hydroalcoolique. 10 µL d'une solution de β-fructosidase fournie dans le kit sont ensuite ajoutés. L'ensemble est complété avec de l'eau distillée pour un volume final de 190 µL. Après 30 min d'incubation sous agitation, une première lecture est effectuée à 340 nm (DO1'). Dans le puits, 10 µL de la solution d'enzyme HK + G6PDH (diluée au 1/10$^{e}$) sont ensuite ajoutés. Après une deuxième incubation sous agitation de 10 min à 30°C, une deuxième lecture est effectuée à 340 nm (DO2'). L'absorbance mesurée correspond à la teneur en glucose total, c'est-à-dire le glucose issu de l'hydrolyse du saccharose par la β-fructosidase et le glucose initialement présent dans l'extrait. La quantité de saccharose est calculée en comparant cette DOsacch à une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution à 0,5 g/L de saccharose fournie par le kit.

Par conséquent, la quantité de saccharose est calculée à partir de la différence entre la DO2' et la DO1' (DOsacc), à laquelle on retranche la quantité de glucose mesurée précédemment (DOglu).

- ✓ **Dosage de l'amidon**

Le dosage de l'amidon est réalisé selon le protocole décrit par Smith et Zeeman (2006). Les culots conservés après extraction hydroalcoolique sont séchés dans une étuve à 50°C pendant 1 heure, puis re-suspendus dans 350 µL d'eau. Une incubation au bain sec pendant 10 min à 100°C est ensuite réalisée afin d'éclater les grains d'amidon. Ensuite, 700 µL de solution enzymatique sont ajoutés. La solution enzymatique est constituée d'un mélange de 3 unités d'α-amylase (Sigma) et de 6 unités d'amyloglucosidase (starch amyloglucosidase, Roche) dans du tampon acétate de sodium 0,2 M à pH 4,8. L'ensemble est incubé pendant 4 heures à 37°C et homogénéisé toutes les heures. Après l'hydrolyse, la solution est de nouveau vortexée puis centrifugée 5 min à 12000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et va servir au dosage du glucose obtenu après l'hydrolyse de l'amidon.

Le glucose issu de la dégradation de l'amidon est dosé comme au paragraphe (cf § II-2-3 pp 69-70)

- ✓ **Dosage des fructanes**

Les extractions et les dosages de fructanes ont été réalisés en adaptant les recommandations de kits commerciaux (MEGAZYME Fructans assay procedures). Un échantillon de 20 mg de poudre végétale lyophilisée est incubé dans 5 mL d'eau distillée à 80°C pendant 15 min sous agitation.

La première étape de cette réaction consiste à hydrolyser les glucides non structuraux (autres que les fructanes) grâce à une incubation de 30 min à 40°c de 20 µL de l'extrait végétal dans 20 µL d'une solution enzymatique (sucrase + β-amylase + maltase) fournie dans le kit.

La deuxième étape consiste tout d'abord à réduire les sucres réducteurs de l'extrait en ajoutant 20µL de borohydride alkaline ($NaBH_4$). Après une incubation 30 min à 40°C, 50 µL d'acide acétique (0,2 M) sont ajoutés pour neutraliser le $NaBH_4$ en excès. L'extrait est ensuite vortexé, on obtient alors la solution S.

La troisième étape consiste à hydrolyser les fructanes puis à les doser en microplaque. On prélève 20 µL de solution S dans un tube auquel on ajoute 20 µL de solution enzymatique fournie dans le kit (fructanase + inulinase) et 70 µL d'eau distillée. Les tubes sont vortexés puis incubés 20 min à 40°C. Après un ajout de 500 µL de Para-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide (PAHBAH), les tubes sont incubés 6 min à 100°C. Après refroidissement, 200 µL de solution finale sont placés dans une microplaque et les absorbances sont mesurées à 410 nm (DOfructanes).

La quantité de fructanes est calculée en comparant cette DOfructane à une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution à 1,5 mg/mL de fructose fournie par le kit. L'efficacité des étapes 2 et 3 sont contrôlées grâce à des solutions de fructanes et de saccharose fournies dans le kit.

- ✓ **Dosage des glucomannanes**

Les extractions et les dosages de glucomannanes ont été réalisés en adaptant les recommandations de kits commerciaux (MEGAZYME glucomannan assay procedures).

La première étape consiste à éliminer les sucres solubles de l'échantillon. Un échantillon de 20 mg de poudre végétale lyophilisée est incubé dans 1 mL d'éthanol à 80% (v/v) à 90°C pendant 5 min. Après l'incubation, 1 mL d'éthanol à 80% (v/v) est ajouté. La solution est passée au vortex puis centrifugée à 1500 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et la même opération est réalisée sur le culot.

La deuxième étape consiste à dépolymériser les glucomannanes. Le culot est alors suspendu dans 1,5 mL de tampon acétate de sodium (1 M, pH 4,5) puis subi quatre incubations suivies de passage au vortex. Les deux premières incubations durent 1 min à 100°C, la troisième 5 min à 100°C et la quatrième incubation dure de 5 min à 40°C. Après la dernière incubation, 20 µL de β-mannase (450 U/mL) sont ajoutés et suivis d'un passage au vortex et d'une nouvelle incubation de 60 min à 40°C. On prélève 15 µl de cette solution auxquels on ajoute 785 µL d'eau distillée. La solution est alcalinisée à un pH de 12,5 avec un ajout de 30 µL de solution de NaOH (1 M) afin de désacétyler les oligosaccharides. Après 10 min d'incubation à température ambiante, 200 µL de tampon sodium phosphate (200 mM, pH 6,5) sont ajoutés et la solution (solution I) est complétée à 1 mL et le pH amenée à 6,5 par ajout de HCl (1 M).

La troisième étape se déroule en microplaque et consiste à hydrolyser les glucomanno-oligosaccharides synthétisés lors de la deuxième étape. Une fraction de 50 µL de la solution I est prélevée dans laquelle on ajoute 20 µL d'une solution enzymatique de β-glucosidase et β-mannosidase (diluée au 1/30$^{e}$) et 10 µL d'une solution de $NADP^{+}$ + ATP (solutions fournies dans le kit). Après une incubation de 20 min à 35°C les glucomanno-oligosaccharides sont hydrolysés en D-glucose et le D-mannose. Une première lecture est effectuée au lecteur de microplaques à 340 nm (DO1).

La quatrième étape consiste à phosphoryler le D-glucose et le D-mannose en glucose-6-phosphate (G-6-P). Cette phosphorylation est réalisée en ajoutant 20 µL de solution enzymatique d'hexokinase et de G-6-P déshydrogénase (solution fournie dans le kit et diluée au 1/5$^{e}$). Après 5 min d'incubation, 10 µL de solution enzymatique contenant de la phosphomannose isomérase (PMI) et de la phosphoglucose isomérase (PGI) est ajoutée (solution fournie par le kit et diluée au 1/5$^{e}$). Après 20 min d'incubation à 30°C sous agitation, une deuxième lecture est effectuée au lecteur de microplaque à 340nm (DO2).

La quantité de glucomannanes est calculée en comparant cette DO2-DO1 à une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de D-Glucose et D-mannose (0,2 mg/mL chacun) fournie dans le kit.

## II-3 Analyse des protéines

### II-3-1 Dosage des protéines solubles

L'extraction des protéines a été effectuée selon la méthode décrite par Fontaine *et al.* (2006). A 100 mg de poudre végétale conservée à -80°C sont ajoutés 200 µL de tampon d'extraction (Tricine 100 mM, $CaCl_2$ 40 mM, PVPP 0,5% (p/v), Triton X100 0,05% (v/v), EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, PMSF 1 mM ; pH 8,0). Le mélange est homogénéisé et centrifugé à 15000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait brut de protéines solubles.

La concentration en protéines de l'extrait est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode a pour principe la formation de complexes entre le bleu de Coomassie et les résidus basiques et aromatiques des protéines. Pratiquement, 1 à 5 µL d'extrait protéique sont ajoutés à 200 µL de réactif de Bradford dilué au 1/5$^{e}$ (Bio-Rad). Après quelques minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 595 nm et comparée à celle d'une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA).

### II-3-2 Dosage des activités enzymatiques

- ✓ **Dosage de l'activité enzymatique Nitrate réductase maximale (NR)**

Le dosage de l'activité nitrate réductase a été réalisé selon la méthode décrite par Ferrario-Méry *et al.* (1998). La nitrate réductase (NR) réduit le nitrate en nitrite qui développe une coloration rose par réaction avec le N-(1-naphtyl)éthylènediamine (NNED) en milieu acide. L'activité NR est dosée ici uniquement en présence d'EDTA afin de mesurer l'activité maximale potentielle *in vitro*.

Dans un tube de 1,5 mL contenant 50 mg de matière fraiche sont ajoutés 2,5 mg de PVP (Polyvinylpyrrolidone insoluble) et 250 µL de tampon d'extraction (tableau 1). L'extrait est passé au vortex 1 min puis centrifugé à 4°C pendant 5 min à 15000 rpm. Le surnageant est prélevé et constitue l'extrait protéique brut.

**Tableau 1 : Composition du tampon d'extraction pour le dosage de l'activité NR**

| Tampon d'extraction | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| Tampon MOPS/KOH (pH 7,6) | 50 mM |
| NaF | 5 mM |
| $Na_2MoO4$ | 1 µM |
| FAD | 10 µM |
| EDTA de Na | 5 mM |
| β-mercaptoethanol | 2 mM |
| Acide okadaïque | 3 nM |
| Chymostatine (Parties Souterraines) | 10 µM |
| Leupeptine (Parties Aériennes) | 4 µM |

Dans une microplaque, on place 20 µL d'extrait protéique brut puis 80 µL de tampon de réaction (tableau 2) dans 3 puits « essais ». Parallèlement à ces 3 puits « échantillons mesurés », trois autres puits « témoins » sont réalisés en ajoutant plaçant 100 µL de solution stop aux 20 µL d'extrait protéiques bruts avant d'ajouter les 80 µL de tampon de réaction.

**Tableau 2 : Composition du tampon de réaction EDTA**

| Tampon de réaction EDTA | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| Tampon MOPS/KOH (pH 7,5) | 50 mM |
| $KNO_3$ | 10 mM |
| NADH | 155 µM |
| EDTA de Na | 5 mM |
| Acide okadaïque | 3 nM |
| NaF | 5 mM |

Après une incubation de 40 min à 30°C sous agitation, 100 µL de solution d'arrêt (sulfanilamide 58 mM ; HCl 3N) sont ajoutés aux puits « essais » pour arrêter la réaction. Puis, 100 µL de solution de coloration (NNED, 58 mM) sont ajoutés. Après une attente de 20 min à l'obscurité, la plaque est centrifugée 5 min à 10000 g et 200 µL de solution finale sont placés dans une nouvelle microplaque et une lecture est effectuée au lecteur de microplaque à 540 nm. La différence entre l'absorbance de l'essai et celle du contrôle est comparée à l'absorbance d'une gamme de nitrite allant de 0 à 10 nmol réalisée à partir d'une solution à 1mM.

L'activité NR (déterminée en nmol de nitrite formé par min et par mL d'extrait brut) est finalement rapportée soit à la quantité de protéines solubles présentes dans l'extrait soit à la quantité de matière fraîche initiale ou encore de à la quantité de matière sèche obtenue avec le pourcentage de MS de notre extrait.

- ✓ **Dosage de l'activité enzymatique Glutamine synthétase (GS)**

La réaction utilisée pour le dosage de l'activité GS utilise un analogue structural d'un des deux substrats de l'enzyme, l'hydroxylamine, qui remplace l'ammonium. En présence d'ATP et de $MgCl_2$, la GS forme du γ-glutamyl-hydroxamate à partir des substrats, le glutamate et l'hydroxylamine. Le dosage de l'activité GS s'effectue en microplaque. Le protocole utilisé dérive de celui de O'Neal et Joy (1973).

Environ 100 mg de poudre fraiche, sont solubilisés dans un tampon d'extraction (tableau 3) auxquels sont ajoutés 2,5 mg de PVP et quelques milligrammes de sable afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction.

**Tableau 3 : Composition du tampon d'extraction pour le dosage des activités GS/GDH**

| **Réactifs** | **Concentrations** |
|---|---|
| Tris-HCl pH 7,6 | 25 mM |
| $MgCl_2$ | 1 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Leupeptine | 4 µM |
| β-mercaptoéthanol | 13,4 µM |

L'extrait est homogénéisé pendant 1 min puis centrifugé pendant 15 min à 15000 g à 4°C. Le surnageant est prélevé et constitue l'extrait protéique brut. Pour chaque réaction, 20 µL d'extrait brut sont mélangés à 130 µL de milieu réactionnel composé de 20 µL d'Amix + 20 µL d'ATP + 70 µL de tampon de réaction (tableau 4).

**Tableau 4 : Composition du milieu réactionnel pour le dosage des activités GS**

| **Tampon de réaction pour les activités** | |
|---|---|
| **Réactif** | **Concentration** |
| Tris-HCl pH 7,6 | 50mM |

| **Amix** pH 7,6 | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| Tris-HCl pH 7,6 | 50 mM |
| MgSO4 | 150 mM |
| Glutamate mono K | 600 mM |
| Hydroxylamine | 45 mM |
| EDTA | 30 mM |

| **ATP** pH 7,6 | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| Tris-HCl pH 7,6 | 50 mM |
| ATP | 60 mM |

| **Solution STOP** | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| $FeCl_3$ | 370 mM |
| TCA | 200 mM |
| HCl | 670 mM |

En parallèle à cet essai, un contrôle est réalisé en remplaçant l'ATP par du tampon de réaction. La réaction se déroule à 30°C pendant 30 min sous agitation et est arrêtée par l'addition de 150 µL de solution STOP. Il se forme alors un complexe entre le fer et l' γ-glutamyl-hydroxamate coloré en jaune-brun. Les échantillons sont centrifugés à 10000 g pendant 5 min pour éliminer les protéines précipitées et 200 µL de surnageant sont utilisés pour mesurer au spectrophotomètre à 540 nm l'absorbance due au complexe formé entre l'γ-glutamyl-hydroxamate et l'ion ferrique. La différence entre l'absorbance de l'essai et celle du contrôle est comparée à l'absorbance d'une gamme de γ-glutamyl-hydroxamate allant de 0 à 160 nmol réalisée à partir d'une solution à 10 mM.

Comme pour l'activité NR, l'activité GS (déterminée en nanomoles de γ-glutamyl-hydroxamate formé par min et par µL d'extrait brut) est finalement rapportée soit à la quantité de protéines solubles, la quantité de matière fraiche ou de matière sèche.

✓ **Dosage de l'activité aminante de la Glutamate déshydrogénase (GDH)**

La GDH est extraite en utilisant le même protocole que celui employé pour extraire la GS. Le dosage de l'activité aminante de la GDH est basé sur la cinétique d'oxydation du NADH, qui est suivie à 340 nm. Le protocole utilisé dérive de celui de Turano *et al.* (1996).

La réaction enzymatique est mesurée en microplaques où 20 µL d'extrait brut sont mélangés à 280 µL milieu réactionnel (tableau 5).

**Tableau 5 : Composition du milieu réactionnel pour le dosage des activités GDH**

| **Tampon de réaction pour les activités GDH** | |
|---|---|
| **Réactif** | **Concentration** |
| Tris-HCl pH 8 | 100mM |

| **Réactifs préparés individuellement dans le Tampon Tris-HCl pH 8 (100 mM)** | |
|---|---|
| **Réactifs** | **Concentrations** |
| $CaCl_2$ | 15 mM |
| | |
| α-cétoglutarate | 195 mM |
| | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 750 mM |
| | |
| NADH | 3,75 mM |

Le contrôle de la réaction est effectué en parallèle, en l'absence de sulfate d'ammonium dans le milieu réactionnel, remplacé par du tampon de réaction. Dès l'ajout du NADH, la cinétique d'oxydation est suivie pendant 30 min à 340 nm. La pente de la droite obtenue est soustraite à la pente de la droite du contrôle et permet de déduire l'activité enzymatique qui est exprimée par min et par mL d'extrait brut. Cette pente est ensuite comparée avec une gamme de NADH allant de 0 à 75 nmol réalisée à partir d'une solution à 3,75 mM. L'activité GDH, comme les activités GS et GDH peut être exprimée en nmol/min/µg de protéines ou en nmol/min/mg de MF ou en nmol/min/mg de MS.

### III-3-3 Western-blots

- ✓ **Extraction de protéines en condition dénaturante**

A 100 mg de poudre végétale conservée à -80°C sont ajoutés 200 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 0,1% (v/v) ; pH 8,8). Le mélange est homogénéisé et centrifugé à 15000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant sert au dosage des protéines et est ensuite dénaturé par l'ajout de 0,1% de SDS et un passage à 100°C pendant 5 min. La solution obtenue contient les protéines solubles dénaturées.

- ✓ **Electrophorèse dénaturante**

L'électrophorèse, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), est réalisée selon un protocole adapté de celui de Laemmli (1970). Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration de 4% et d'un gel de séparation de 10% en acrylamide/bisacrylamide et contenant 0,1% de SDS. Les gels de concentration et de séparation sont préparés puis coulés et polymérisés dans un système Mini-Protean (Biorad). Les échantillons sont préparés en mélangeant une quantité de protéines connue issue de l'extrait protéique dénaturé à 10% (v/v) et de tampon de charge (Tris-HCl 1 M, glycérol 25% (v/v), β-mercaptoéthanol 20% (v/v), bleu de bromophénol 0,01% (p/v) ; pH 6,8). Des protéines de référence de masse moléculaire connue sont déposées dans un des puits du mini-gel (Preestained SDS-PAGE Broad range, Biorad). L'électrophorèse se déroule dans un tampon Tris-Glycine-SDS pH 8,3 (Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1%, Glycine 192 mM) sous une tension de 100 V pendant environ 2 h.

- ✓ **Transfert sur membrane**

Lors du transfert sur membrane, les protéines séparées au cours de l'électrophorèse native ou dénaturante passent du mini-gel à une membrane de nitrocellulose (Pall, Life Science) grâce à un système de transfert liquide (Biorad). Le « sandwich » de transfert se compose de papiers Wattman, du gel et de la membrane. Pour la composition du « sandwich » (figure 1), il faut mettre, de la cathode vers l'anode, 3 papiers Wattman (buvards) imbibés de la solution de tampon de transfert (Tris-amino 25 mM, Glycine 150 mM, méthanol 20% (v/v) ; pH 8,3), le gel, la membrane et enfin 3 papiers Wattman imbibés de solution de tampon de transfert. L'ensemble est recouvert de part et d'autre part du scotch britt préalablement

imbibés dans du tampon de transfert. Le « sandwich » ainsi réalisé est introduit dans le système de transfert avec un bac de glace et un barreau aimanté. Le transfert a lieu à 24 volts sous agitation pendant toute la nuit à 4°C.

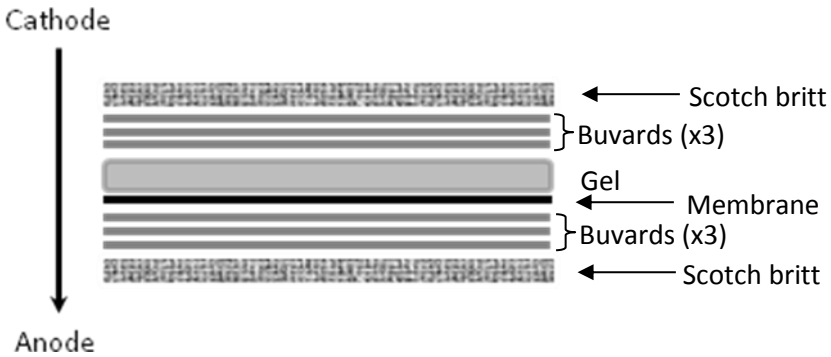



**Figure 1: Représentation schématique du « sandwich » de transfert**

- ✓ **Révélation des protéines par immuno-détection**

La révélation d'une protéine donnée sur la membrane se fait à l'aide d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre cette protéine. Les anticorps primaires ont été produits chez le lapin à partir d'une immunisation à l'aide de peptides de synthèses spécifiques par la société Eurogentec (Eurogentec, Angers).

La membrane est dans un premier temps immergée pendant deux heures dans une solution de TBS (Tris-amino 10 mM, NaCl 150 mM ; pH 7,4) contenant 3% de BSA afin de saturer tous les sites de la membrane. Elle est ensuite rincée dans du TBS additionné de Tween 10% puis incubée pendant 2 heures avec une solution d'anticorps primaire sous agitation lente et constante à température ambiante.

L'anticorps primaire est issu d'un sérum de lapin dilué au 1:1000 (v/v) dans le tampon TBS additionné de 1% de BSA. Après un double rinçage de 10 min de la membrane dans du TBS additionné de Tween 10% et une fois dans du TBS seul, celle-ci subit une seconde incubation de 2 heures dans une solution d'anticorps secondaires dirigées contre les anticorps de lapin et couplées à la peroxydase (Goat anti-rabbit IgG, AP conjugate, Sigma, diluées au 1:800 (v/v) dans du TBS). Après incubation dans la solution d'anticorps secondaires, la membrane est rincée à nouveau comme précédemment. La détection des protéines est basée sur la détection de l'activité peroxydase.

La solution de révélation est constituée d'un mélange de deux solutions ajoutées simultanément au moment de la révélation. Une première solution de 30 mg de chloronaphtol dilué dans 10 mL de méthanol et une deuxième solution de 50 mL de TBS contenant 30 µL d'$H_20_2$. La révélation des immunoprécipités s'effectue à température ambiante ou à l'étuve à 37°C. Lorsque la coloration est suffisante, la révélation est arrêtée par incubation de la membrane dans l'eau distillée, puis cette dernière est finalement séchée et enfin scannée.

## II-4 Analyse RMN

Des feuilles jeunes et ligulées ont été prélevées avec leur gaine sur des tiges de *Miscanthus x giganteus* au stade 10 feuilles ligulées. Les gaines de ces feuilles ont ensuite été plongées dans une solution contenant 4 mM de $NO_3^-$ marqué $^{15}N$ 99%. Des témoins ont été réalisés à $t_0$ sur des feuilles après arrachage et ensuite sur des feuilles dont les gaines ont été plongées dans une solution contenant 4 mM de $NO_3^-$ non marqué. Au bout de trois heures, les feuilles ont été plongées dans l'azote liquide, broyées à froid au broyeur à billes puis lyophilisées.

L'extraction a été réalisée pendant 24 heures à température ambiante à partir de 100 mg de matière sèche dans 30 mL d'éthanol 70% suivie d'une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes à 6000 g. Le surnagent est filtré et séché au speedvac. Le culot est repris dans 2 mL de tampon phosphate à 0,1 M deutéré (H2O:D2O (90:10), 1mM de TMSP, 5 mM $NaN_3$) à pH6. Cet extrait est ensuite analysé par RMN.

Le principe de la RMN est le suivant : un échantillon est placé dans un champ magnétique statique intense appelé $B_0$. Les molécules de cet échantillon sont soumises à un champ magnétique appliqué $B_1$ qui provoque une perturbation des atomes considérés. L'application de ce champ de radiofréquence (RF) choisie (que l'on appelle impulsion ou "pulse") est de quelques microsecondes. Les noyaux génèrent à leur tour un micro-champ magnétique qui est capté par une bobine réceptrice, c'est le signal RMN ou « signale de précession libre » ou encore FID pour (Free Induction Decay). Ces données sont envoyées à un ordinateur où elles sont analysées.

L'abondance naturelle du proton ($^1H$) de 100% et son rapport gyromagnétique élevé (42,58 MHz/Tesla) font que la résonance magnétique du proton est la plus utilisée. De ce fait, l'acquisition des spectres est réalisée directement après l'impulsion. Du fait de son abondance naturelle très faible (0,37%), et d'un rapport gyromagnétique très petit, la sensibilité RMN de l'azote $^5N$ est très Faible. De ce fait, l'acquisition des spectres est réalisée par des techniques

de détection « inverse » qui permettent d'observer le noyau $^{15}N$ via les protons. Pour ce faire, des séquences d'acquisition HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sont utilisées.

La séquence HSQC permet d'observer le noyau $^{15}N$ par l'intermédiaire des couplages $^{1}J$ des protons non labiles directement liés à l'azote. La séquence HMBC permet d'observer le noyau $^{15}N$ par le couplage des protons liés à un carbone voisin de cet azote par l'intermédiaire des couplages $^{2}J$ ou $^{3}J$. Cette séquence HMBC est particulièrement intéressante dans le cas de proton échangeable portés par les azotes, dans le cas ou aucune information n'est obtenue par la séquence HSQC.

Tous les spectres sont enregistrés à 600,17 MHz et à 60, 84 MHz respectivement pour le proton et pour l'azote 15. La température de l'échantillon est maintenue à 25°C. L'acquisition des spectres $^{1}H$ est réalisée en utilisant une séquence noesypr (1D NOESY), avec une largeur spectrale de 14 ppm (8417 Hz), 128 scans sur 131072 points (128K) et un temps de relaxation de 5s. Les spectres RMN $^{15}N$ sont des spectres à deux dimensions $^{1}H$ et $^{15}N$. Pour chaque expériences (HSQC ou HMBC), la largeur de la fenêtre spectrale utilisé pour le proton est de 14 ppm (8417 Hz) et pour l'azote de 200 ppm (12164 Hz) avec une acquisition de 32 scan par 256 lignes sur 16384 points (16K) et un temps de relaxation de 1,5s. Les échantillons sont placés dans des tubes de 5 mm et introduits dans le spectromètre lui-même relié à un ordinateur qui permet l'exploitation des données spectrales grâce au logiciel Topspin 3 (BRUKER).

Le signal FID obtenu est converti en un spectre par une transformée de Fourier à une dimension dans le cas de l'acquisition de simples spectres protons et à deux dimensions dans le cas des HSQC et HMBC. Les spectres sont ensuite phasés manuellement. Pour les spectres RMN protons la référence choisit est le TMSP-d4 (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-$d_4$ acid sodium salt) avec comme déplacements chimiques 0 ppm et pour les études réaliser en RMN du $^{15}N$, la référence choisit pour les déplacements chimiques est l'urée à -298,8 ppm. L'ensemble du traitement du signal est effectué grâce au logiciel Topspin 3 (BRUKER). Les pics et les taches ont été attribués grâce à la comparaison avec des produits commerciaux (non marqués, à pH identique à celui des extraits).

## II-5 Analyses cytologiques

### ✓ Fixation et inclusion des échantillons

Les échantillons sont initialement fixés 30 min sous un vide modéré dans une solution de paraformaldéhyde 1,5% dans un tampon phosphate ($NaH_2PO_4$ 200 mM, $Na_2HPO_4$ 200 mM ; pH 7,4). Après une nuit à 4°C dans la même solution de fixation, la déshydratation des échantillons est réalisée par passage des explants dans des bains successifs d'alcool : 15° (10 min), 30° (10 min), 50° (10 min), 70° (10 min), 90° (10 min) puis 100° (30 min). Ensuite, les échantillons sont placés dans trois nouveaux bains contenant la résine d'inclusion : la LR White (Polysciences). Les échantillons sont plongés une heure dans un mélange alcool 100°: LR white (1:1) puis une nuit dans un bain de résine pure. Enfin, les explants sont placés durant une journée dans un bain neuf de résine pure. L'inclusion est effectuée dans des gélules de gélatine (Agar Scientific) fermées hermétiquement. La polymérisation de la résine est réalisée durant une nuit à 55°C.

### ✓ Les coupes

Des coupes semi-fines de 1 µm ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT). Elles sont déposées sur lames et traitées à la poly-L-lysine.

### ✓ Coloration des coupes semi-fines

Pour les études structurales, les coupes semi-fines sont traitées pendant 5 min à l'acide périodique 1% dans l'eau, puis rincées à l'eau courante. Après séchage, les lames sont plongées 20 min dans le réactif de Schiff (0,5% de fuschine basique dans l'eau). La révélation de la coloration s'effectue par un bain d'eau courante. Les lames sont rincées à l'eau distillée puis séchées. Elles sont ensuite colorées 7 min en présence de Naphtol Blue-Black (Agar Scientific) à 1% dans de l'acide acétique à 7%. Après un rinçage à l'eau courante, les coupes sont contrastées dans l'acide acétique à 7%. Lorsque le contraste est suffisant, les lames sont rincées à l'eau distillée puis séchées.

- ✓ **Immunolocalisation des enzymes**

Pour les études d'immunolocalisation en microscopie, les coupes fines (1µm) ont été montées sur des lames silanées (Silane-prep slides, Sigma). Les lames sont ensuite plongées dans un tampon T1 (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4) durant 10 min puis dans un tampon T1' (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 2,3%, BSA 0,1%, Tween-20 0,025%, pH 7,4) pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les lames sont incubées pendant 1 heure avec le sérum pré-immun de chèvre puis avec le sérum spécifique dilué au 1:400 durant quatre heures. Suite à trois lavages au T1', les lames sont plongées dans un bain d'anticorps secondaires (1 :100ème dans T1') (Sigma) couplés à des billes d'or de 10 nanomètres durant 2 heures. Enfin, une succession de lavages termine l'immunomarquage. Après le dernier lavage réalisé dans l'eau distillée les lames subissent une amplification à l'argent (silver kit enhancing, Biocell) et une coloration de fond est effectuée avec une solution de fuscine à 1%. L'observation est effectuée avec un microscope Nikon eclipse E800 en fond clair et lumière épipolarisée.

## II-6 Analyses statistiques

Les résultats des dosages ont été exposés sous forme d'histogrammes ou de courbes représentent les moyennes ± l'erreur standard (ES). L'erreur standard est donnée par le rapport de l'écart-type divisé par la racine carré du nombre de mesures mois une (n-1).

En fonction du nombre d'échantillons, deux types de tests statistiques ont été réalisés afin de comparer les moyennes et d'en ressortir les valeurs significativement différentes. Le premier test, utilisé lorsque le nombre de valeurs disponibles n'était pas constant, est un test de Kruskal-Wallis suivis de tests de Mann-Whitney (au risque $\alpha = 5\%$). Le second test, utilisé lorsque le nombre de valeurs était constant, est une analyse de variance suivie un test de Newman-Keuls réalisé avec le logiciel Statbox 6.

Des analyses de régressions multiples centrées réduites et des tests de Student (au risque $\alpha = 5\%$) ont été également réalisés avec le logiciel Statbox 6.

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

## I- Stockage et dynamique saisonnière des glucides non structuraux dans les rhizomes et pousses de *Miscanthus x giganteus*.

**(Storage and seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in rhizomes and shoots of *Miscanthus x giganteus.*)**

### I-1 Introduction

Le miscanthus est une plante vivace originaire d'Asie de la famille des Poacées (Hastings *et al.*, 2008). La pérennité de la plante est assurée grâce à un organe de réserve souterrain, le rhizome. Le *Miscanthus x giganteus* est l'espèce la plus cultivée, c'est un hybride naturel issu d'un croisement de deux espèces : *Miscanthus sinensis*, et *Miscanthus sacchariflorus* (Greef et Deuter, 1993). Le rendement maximal de la culture de *Miscanthus x giganteus* est obtenu 2 à 6 années après son implantation (Clifton-Brown et Lewandowsky, 2002). Une fois la culture bien implantée, son rendement en biomasse en Europe (sans irrigation) varie de 15 à 25 t de matière sèche par hectare pour la récolte d'automne et de 7 à 19 t de matière sèche par hectare pour la récolte d'hiver (Clifton-Brown *et al.*, 2004). Ce fort rendement en biomasse en fait une bonne plante candidate pour la production de biocarburants (Hastings *et al*., 2008).

La forte productivité du *Miscanthus x giganteus* peut s'expliquer par son métabolisme photosynthétique particulier, dit en C4, que partagent également d'autres plantes d'origine tropicale à intérêt agronomique: maïs, canne à sucre, sorgho (Drincovich *et al.*, 2001). Grâce à ce métabolisme, la plante est plus efficace dans la captation du gaz carbonique et dans la transformation de ce gaz carbonique en matière organique qui pourra permettre la production de biomasse. Le miscanthus possède également un fort LAI (Leaf Area Index) ainsi qu'un fort coefficient d'extinction lumineuse (Clifton-Brown *et al.*, 2000).

Une diminution de la biomasse souterraine est observée chez Miscanthus x giganteus lors de l'émergence des bourgeons au printemps (Heaton *et al*,. 2010). Les auteurs supposent que celle-ci seraient probablement due à une remobilisation de nutriments (dont les glucides) vers les tissus en croissance. Bien que de plusieurs études de cette culture aient été réalisées sur la fluctuation de l'azote et d'autres éléments, comme le potassium ou phosphate, aucune

étude sur la synthèse et la remobilisation des glucides n'a été réalisée sur l'ensemble de la plante lors d'un cycle complet de miscanthus (Cadoux *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, notre étude porte sur l'identification et la quantification des glucides de réserve du *Miscanthus x giganteus* sur un cycle annuel complet. La culture, âgée de 4 et 5 ans pendant notre étude correspond à une culture d'âge « mature » ayant atteint son plateau de production selon la littérature. Nous faisons l'hypothèse que *Miscanthus x giganteus* peut mobiliser les réserves carbonées de son rhizome vers les autres parties de la plante en début de croissance.

## I-2 Matériel et méthodes

### I-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental

Le site expérimental de culture est situé dans la région Picardie dans le nord de la France (49°52'N, 3°00'E). Le sol est de type argilo-limoneux (Ortic luvisol), constitué de 74% de limon, 7,6% d'argile et 5% de sable avec un pH de 7,6. La parcelle est située sous un climat est océanique, avec des précipitations moyennes de 625 mm par an et une température moyenne de 10,7° C pour les 10 dernières années. L'étude a été réalisée sur un clone britannique (ADAS, GB) implanté sur une parcelle de 550 $m^2$ implantée depuis 5 ans. Les rhizomes ont été plantés à la main à une profondeur de 10 à 15 cm avec une densité initiale de 2 plantes par $m^2$ avec un espacement de 80 cm. Aucun amendement n'a été apporté avant ou après l'implantation et la récolte des parties aériennes a été effectuée chaque année en février.

Les différents prélèvements ont été réalisés à 4 stades de développement de la plante :

- L'émergence des parties aériennes : cette phase se situe au printemps durant les périodes d'avril à début mai.
- La phase de croissance maximale des parties aériennes : cette phase correspond au stade 10 feuilles ligulées et se situe au début de l'été au mois de juillet.
- La phase de maturité : cette phase correspond au stade 18-20 feuilles ligulés et se situe en automne (octobre-novembre). Elle correspond aussi à la fin de croissance des parties aériennes et à la période de récolte précoce ou en « vert », les feuilles hautes étant encore vertes.
- La phase de sur-maturité : cette phase se situe en hiver (février), elle correspond à la période de récolte tardive ou en « sec ». Le miscanthus a perdu beaucoup de feuilles, il ne reste que les feuilles les plus hautes entièrement senescées.

Pour chaque stade, nous avons prélevé les différents organes du système souterrain et ceux de l'appareil aérien.

Pour la partie souterraine, 3 échantillonnages différents ont été réalisés (figure 1) :

- le rhizome secondaire (RhII) : rhizome sur lequel pousse la tige de l'année.
- les racines (Rac) reliées à ce rhizome secondaire.

- le rhizome primaire (RhI) : rhizome de l'année précédente.

Les rhizomes secondaires de l'hiver en année n deviennent les rhizomes primaires en année n+1.

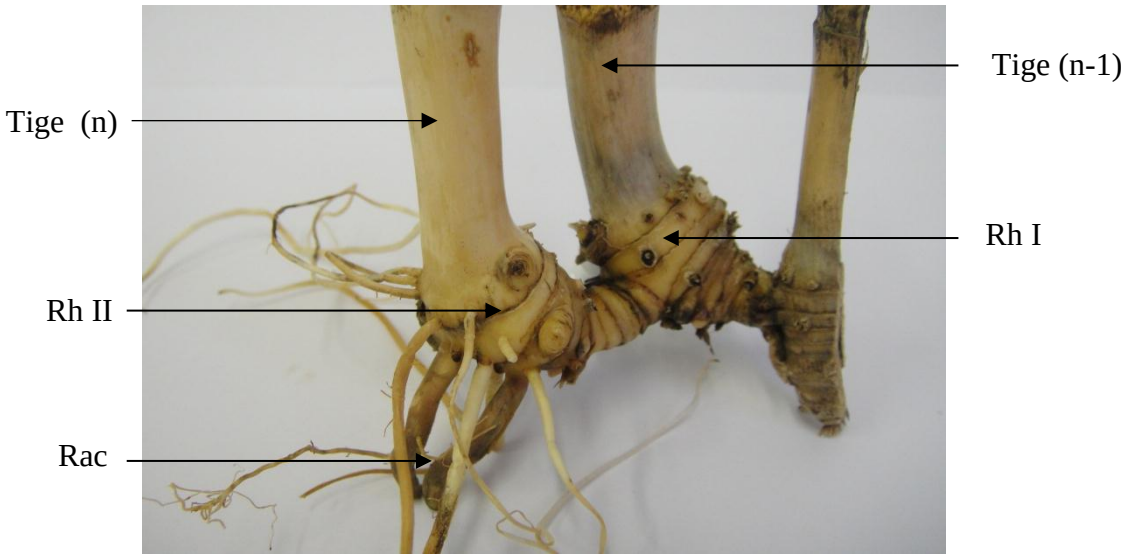



**Figure 1 : Anatomie des parties basses de *M x giganteus***
Rac : Racines ; RhII : Rhizome secondaire : rhizome de l'année ; Tige (n) : tige de l'année ; RhI : Rhizome primaire (rhizome de l'année précédente) ; Tige (n-1) : tige de l'année précédente

Pour la partie aérienne, nous avons divisé la plante en différentes parties en fonction du nombre de nœuds et de feuilles. Six parties ont donc été déterminées (figure 2) :

- les tiges basses (Tb)
- les tiges moyennes (Tm)
- les tiges hautes (Th)
- les feuilles basses (Fb)
- les feuilles moyennes (Fm)
- les feuilles hautes (Fh)

Pour le premier prélèvement (émergence des parties aériennes), les parties aériennes étant peu développées, il était impossible de différencier les feuilles des tiges. Lors du second prélèvement (croissance maximale des parties aériennes), les trois étages foliaires étaient encore verts. Pour le prélèvement automnal (maturité), les feuilles basses récoltées étaient sénescées et les feuilles moyennes en cours de sénescence. Lors du dernier prélèvement (sur-maturité), les feuilles étaient toutes sénescées, une grande partie des feuilles basses et feuilles moyennes étaient tombées.

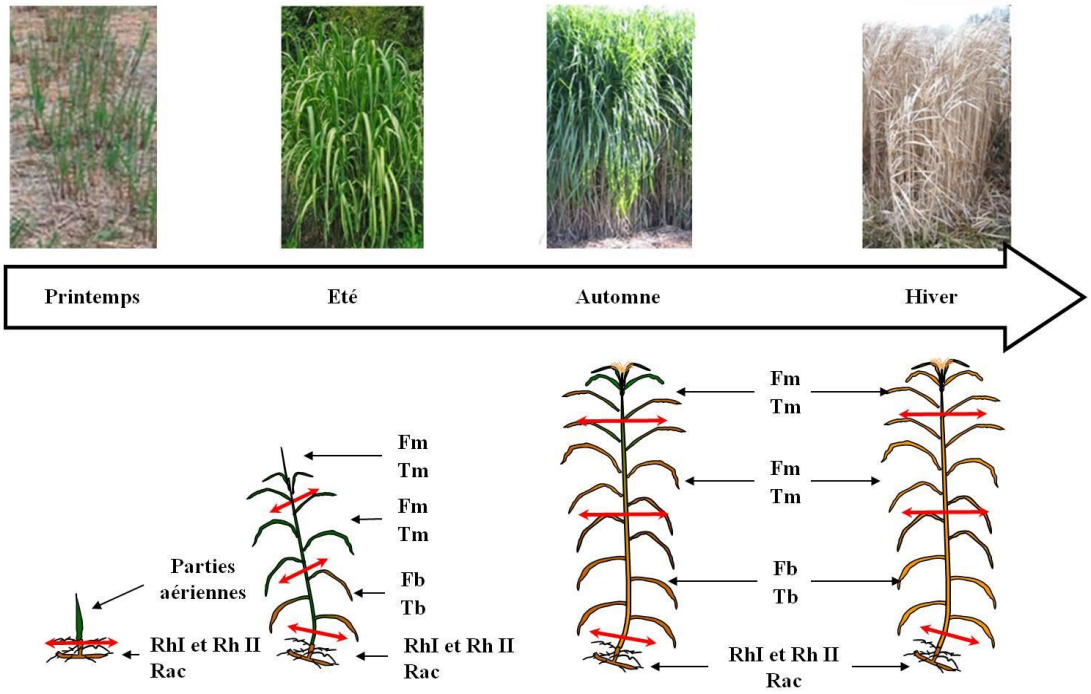



**Figure 2 : Cycle de croissance annuel de *Miscanthus x giganteus***
Rac : racines ; Rh I : rhizome primaire ; Rh II : rhizome secondaire ; Tb : tiges basses ; Tm : tiges moyennes ; Th : tiges hautes ; Fb : feuilles basses ; Fm : feuilles moyennes ; Fh : feuilles hautes

## 1-2-2 Extraction et dosage des glucides non structuraux

### *1-2-2-1 Extraction et dosage des sucres libres*

Les échantillons prélevés ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide, broyés puis lyophilisés. Un échantillon de 20 mg de cette poudre lyophilisée a été placé dans des tubes à centrifuger de 1,5 mL avec 1 mL d'éthanol à 80%. Après 2 heures d'incubation à température ambiante sous agitation (140 rpm), les tubes ont été centrifugés à 12000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les surnageants ont été récupérés puis placés dans des tubes de 5 mL. Deux nouvelles extractions ont été répétées sur le culot avec de l'alcool à 60% puis avec de l'eau distillée. Les trois surnageants contenant les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) ont ensuite été réunis en un seul extrait. Celui-ci a ensuite été évaporé à l'aide d'un évaporateur concentrateur puis suspendu dans de l'eau distillée. Les sucres libres (glucose, fructose et saccharose) ont été dosés enzymatiquement en utilisant un kit de dosage

commercial (BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM) à l'aide d'un lecteur de microplaques 96 puits (BIOTEK).

#### *I-2-2-2 Extraction et dosage de l'amidon*

Après l'extraction des sucres libres, les culots résiduels contenant l'amidon ont subi une nouvelle extraction en suivant le protocole décrit par Smith et Zeeman (2006) utilisant de l'α-amylase (SIGMA) et de l'α-amyloglucosidase haute qualité d'*Aspergillus niger* (ROCHE). Les dosages de glucose libérés ont ensuite été dosés au lecteur de microplaque 96 puits à l'aide du même kit de dosage (BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM) et d'un lecteur de microplaques 96 puits.

#### *I-2-2-3 Extraction et dosage des fructanes et des glucommananes*

Les extractions et les dosages de fructanes et de glucommananes ont été réalisés en suivant les recommandations de kits commerciaux (MEGAZYME Fructans and Glucomannans assay procedures)

### I-2-3 Analyses cytologiques

Après une fixation dans une solution de paraformaldéhyde 1,5% dans un tampon phosphate, les échantillons subissent une déshydratation par passage dans des bains d'alcool successifs de 15° à 100°. Ensuite, les échantillons sont placés dans trois nouveaux bains contenant la résine d'inclusion : la LR White (Polysciences). L'inclusion est effectuée dans des gélules de gélatine (Agar Scientific).

Des coupes semi-fines de 1 µm ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT). Pour la microscopie photonique, les coupes sont déposées sur lames et traitées à la poly-L-lysine. Ces coupes sont traitées pendant 5 min à l'acide périodique 1% dans l'eau, rincées puis séchées, avant d'être plongées dans le réactif de Schiff (0,5% de fuschine basique dans l'eau). La révélation de la coloration s'effectue par un bain d'eau courante. Les lames sont rincées, séchées et colorées 7 min en présence de Naphtol Blue-Black (Agar Scientific) à 1% dans de l'acide acétique à 7%. Après rinçage, les coupes sont contrastées dans l'acide acétique à 7%, rincées puis séchées.

### I-2-4 Analyses statistiques

Les résultats ont été exposés sous forme d'histogrammes représentant les moyennes des valeurs mesurées ainsi que leur erreur standard. Le nombre d'échantillons de feuilles n'étant pas constant, nous avons utilisé des tests statistiques non paramétriques pour l'ensemble des analyses. Des tests de Kruskal-Wallis au risque ($\alpha$ = 5%) suivis de tests de Mann-Whitney ont donc été réalisées à l'aide du logiciel StatEL afin de afin de comparer les moyennes et d'en ressortir les valeurs significativement différentes

## I-3 Résultats

Des dosages enzymatiques des différents glucides ont été réalisés durant deux cycles annuels de croissance sur l'ensemble des organes de la plante (racines, rhizomes tiges et feuilles). Ces études nous nous ont fourni des informations précieuses sur la répartition des glucides à l'intérieur des différents organes de la plante, mais aucune information n'a été obtenue pour leur localisation tissulaire et cellulaire. Afin de surmonter ce manque, une étude histochimique sur les différents organes de miscanthus a été entreprise.

### I-3-1 Dosages enzymatiques des sucres

#### *I-3-1-1 Etude des sucres de réserves des organes souterrains durant l'hiver*

Afin de comprendre le fonctionnement du métabolisme carboné du miscanthus, des dosages de glucides de réserve fréquemment rencontrés chez les plantes géophytes ont été réalisés sur les organes pérennes la plante (figure 3). Les principaux glucides de réserve des géophytes étant l'amidon, les fructanes, les glucomannanes ou le saccharose, des dosages enzymatiques de ces quatre sucres ont été réalisés sur les racines, rhizomes secondaires et rhizomes primaires de miscanthus prélevés en hiver.

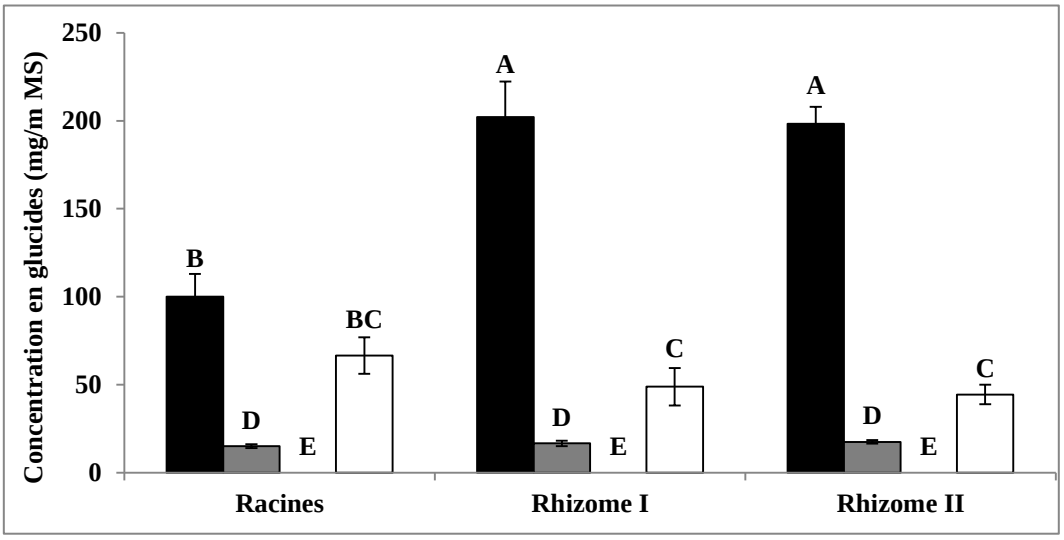



**Figure 3 : Dosages des glucides de réserves dans les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* durant l'hiver**
Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. Des tests de Kruskal-Wallis au risque ($\alpha$ = 5%) suivis de tests de Mann-Whitney ont été réalisés sur toues les données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées statistiquement différentes.

Il apparait clairement (figure 3) que les organes souterrains sont des organes de stockage de glucides non structuraux avec plus de 250 mg/g de glucides par g de matière sèche dans les rhizomes primaires et secondaires. Les racines contiennent également de grandes quantités de glucides de réserves mais moins que les rhizomes (environ 180 mg/g de glucides par g de matière sèche).

Les résultats (figure 3) montrent que la principale forme de stockage glucidique est l'amidon. Dans les rhizomes primaires et secondaires, les quantités d'amidon sont quasiment identiques (200 mg/g MS) soient environ 20% de la matière sèche. Ces quantités sont deux fois plus importantes que celles observées dans les racines (100 mg/g MS).

On sait que le saccharose est également une forme de réserve glucidique dans les organes souterrains. Contrairement à l'amidon, les plus fortes teneurs ne se trouvent pas dans les rhizomes. En effet, dans les racines, les teneurs en saccharose sont de l'ordre de 65 mg/g MS et de plus faibles teneurs sont observées dans les rhizomes primaires (50 mg/g MS) et les Rhizomes secondaires (45 mg/g MS).

La concentration en fructanes semble être constante entre les différents organes (environ 10 à 20 mg/g MS). Celle-ci est environ dix fois plus faible que les quantités mesurées d'amidon. Les fructanes ne pourraient donc qu'être une forme de stockage mineur des glucides dans les parties souterraines. Enfin, aucune présence de glucomannane n'a été détectée ni dans les racines ni dans les rhizomes primaires ou secondaires de miscanthus.

Suite à ces premiers résultats obtenus lors de la période de dormance de la plante, il semble intéressant de réaliser des dosages de ces principaux sucres de réserve (amidon et saccharose) sur ces mêmes organes mais pour d'autres points de prélèvement. Cela permettrait d'envisager les éventuelles fluctuations de la concentration de ces sucres au cours d'un cycle annuel complet.

#### *I-3-1-2 Etude des sucres dans les organes souterrains au cours de la croissance sur un cycle annuel*

En plus de ces glucides de réserve, le glucose et le fructose, ont été dosés pour une meilleure compréhension du métabolisme glucidique du miscanthus (figure 4). En effet, le glucose est le premier produit issu de l'hydrolyse de l'amidon et ces deux monosaccharides (glucose et fructose) sont à l'origine du saccharose.

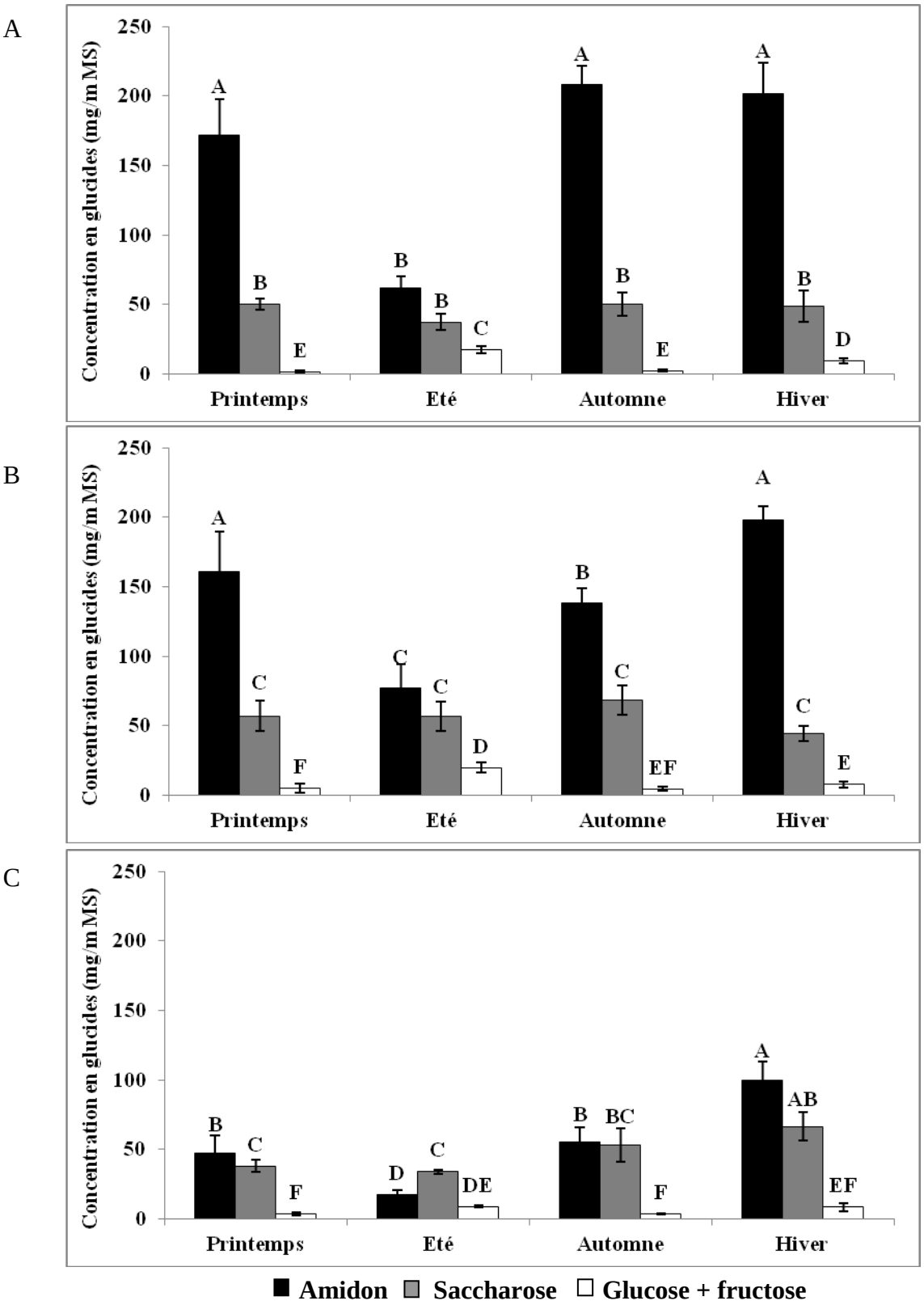



**Figure 4 : Dosages des glucides dans les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle.**

A- rhizome primaire, B- rhizome secondait, C- racines

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. Des tests de Kruskal-Wallis au risque ($\alpha$ = 5%) suivis de tests de Mann-Whitney ont été réalisés sur l'ensemble des sucres pour chaque organe. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas statistiquement différentes.

D'importantes chutes de la teneur en amidon sont observées dans les trois organes souterrains entre les prélèvements de printemps et d'été. Au sein des rhizomes primaires, la concentration moyenne en amidon chute de 60% entre le printemps et l'été (172 mg/g MS au printemps, 62 mg/g MS en été). Elles chutent de 52% dans les rhizomes secondaires et de 63% dans les racines entre ces deux dates de prélèvements.

Ces fortes diminutions de teneurs en amidon sont suivies de fortes hausses après l'été. Dans le rhizome primaire, les teneurs observées en automne (208 mg/g MS) sont 3 fois plus fortes que celles mesurées en été (62 mg/g MS) et très proches de celles observées en hiver.

Dans le rhizome secondaire, comme pour le rhizome primaire, on observe une forte chute de la concentration en amidon en été (52%). Celle-ci est suivie d'une hausse de cette teneur à 138 mg/g MS en automne. Cependant, contrairement au rhizome primaire, la remontée de la concentration d'amidon en automne ne suffit pas à équilibrer la perte de l'été. Il faut attendre l'hiver pour que la concentration en amidon atteigne sa valeur maximale de 198 mg/g MS, valeur très proche de celle observée à la même période dans les rhizomes primaires.

Dans les racines, les concentrations moyennes en amidon sont inférieures à celles observées dans les rhizomes mais suivent les mêmes tendances que celles constatées dans les rhizomes secondaires. Au printemps la concentration est de 47 mg/g MS puis elle chute de 63% en été. Cette chute est suivie d'une augmentation forte et progressive en automne pour atteindre 100 mg/g MS en hiver.

Les concentrations moyennes en saccharose sont assez stables tout au long de l'année dans les rhizomes secondaires et les rhizomes primaires avec des valeurs moyennes de l'ordre de 50 à 60 mg/g MS. Dans les racines, la concentration en saccharose varie davantage que dans les rhizomes secondaires et les rhizomes primaires. On observe une légère diminution des teneurs entre le printemps et l'été puis une augmentation constante jusqu'en hiver pour atteindre une valeur maximale de 66 mg/g MS. Dans les racines, le saccharose représente jusqu'à 56% de l'ensemble des réserves glucidiques en été et 38% en hiver ce qui est deux fois plus que pour les rhizomes secondaires et les rhizomes primaires.

Les concentrations moyennes en monosaccharides (glucose et fructose) dans les trois organes sont faibles par rapport aux concentrations des autres sucres. Pour chaque organe, on observe une hausse d'environ 300 à 400% entre le printemps et l'été puis une chute en automne suivie par une légère augmentation en hiver. Les fortes hausses des teneurs en monosaccharides observées en été correspondent aux périodes ou les teneurs en amidon chutent.

### *I-3-1-3 Etude des sucres dans les tiges au cours de l'année*

Les parties aériennes étant très petites au printemps, la distinction tiges/feuilles n'a pas été réalisée. Des dosages d'amidon, de saccharose et de glucose et de fructose dans les différentes parties de la tige ont été réalisés en été, en automne et en hiver. Le rhizome secondaire étant le prolongement de la tige basse, les valeurs de ce dernier ont été indiquées pour comparaison (figure 5).

- ✓ Etude de l'amidon dans les tiges au cours d'un cycle annuel de croissance

Dans les tiges, les concentrations moyennes en amidon sont inférieures à celles observées dans les rhizomes secondaires. Pour les tiges basses, les teneurs augmentent de manière significative entre l'été (26 mg/g MS) et l'automne où elles atteignent des valeurs similaires à celles des rhizomes secondaires (121 mg/g MS) puis diminuent de moitié en hiver jusqu'à des valeurs de 63 mg/g MS.

En été et en automne, les tiges moyennes contiennent des concentrations moyennes en amidon environ trois fois inférieures à celles des tiges basses. Celles-ci vont légèrement augmenter entre l'été (13 mg/g MS) et l'automne (40 mg/g MS), puis elles vont chuter fortement en hiver (moins de 8 mg/g MS). Dans les tiges hautes les teneurs en amidon mesurées tout au long de l'année sont très similaires de celles observées dans les tiges moyennes.

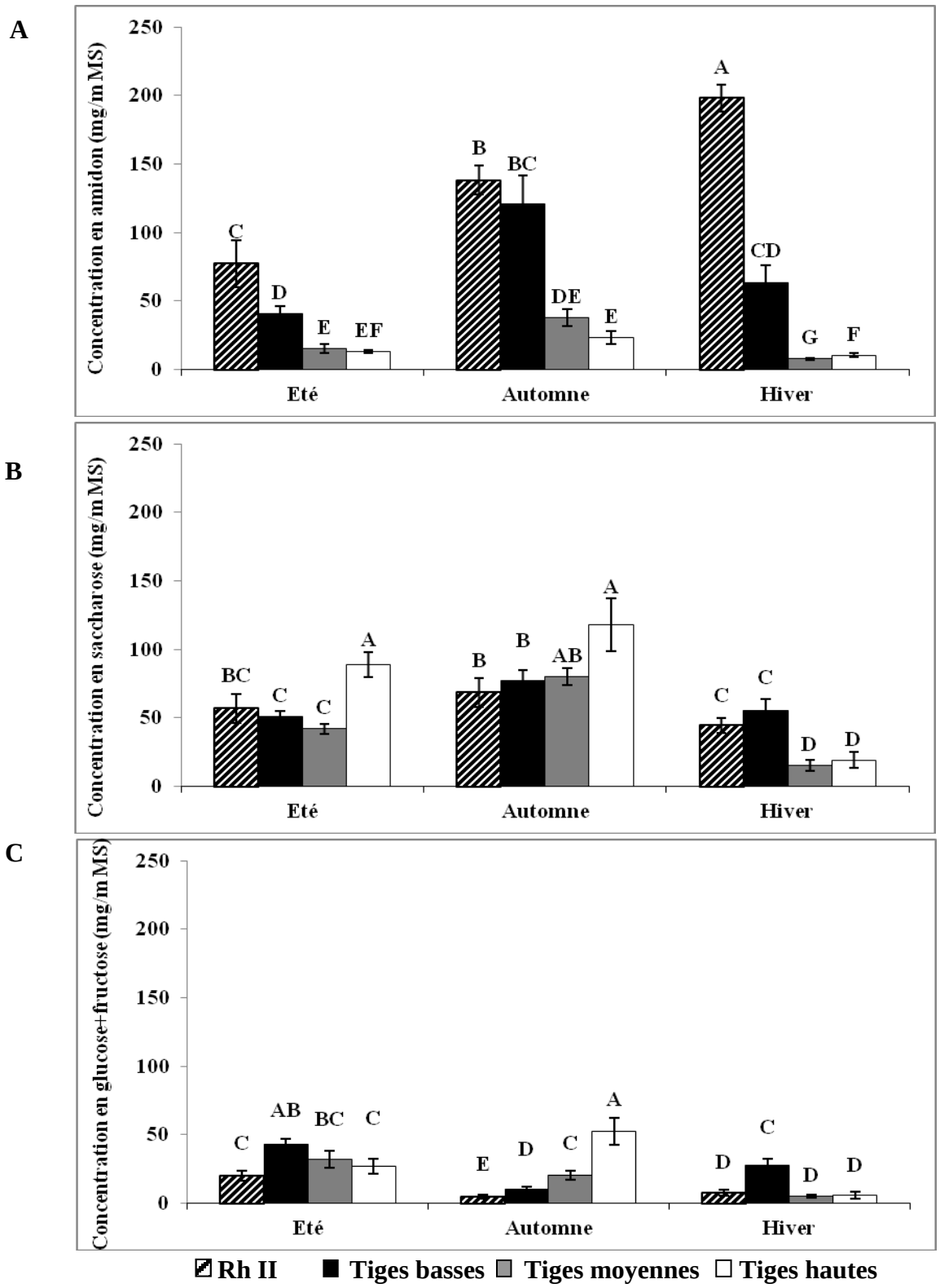



**Figure 5 : Dosages des glucides dans les rhizomes secondaires et les tiges de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle**

A- dosage de l'amidon, B- dosage du saccharose, C- dosage du glucose et du fructose

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. Des tests de Kruskal-Wallis au risque ($\alpha$ = 5%) suivis de tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour chaque sucre sur l'ensemble

des données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

- ✓ Etude du saccharose dans les tiges au cours d'un cycle annuel de croissance

Contrairement à l'amidon, les plus fortes teneurs en saccharose ne sont pas observées dans les rhizomes. En effet, les plus fortes teneurs sont observées dans les tiges hautes en été (88 mg/g MS) et en automne (118 mg/g MS). Entre l'automne et l'hiver, les teneurs en saccharose dans les tiges hautes chutent de manière très significative en hiver (19 mg/g MS). Dans les Tiges basses tout comme dans les rhizomes secondaires, les teneurs en saccharose augmentent légèrement entre l'été et l'automne puis diminuent en hiver pour atteindre des valeurs proches de celles observées en été. Les teneurs en saccharose dans les tiges moyennes en été et en automne sont proches de celles des tiges basses mais elles chutent très fortement en hiver comme les tiges hautes.

- ✓ Etude des monosaccharides dans les tiges au cours du cycle de croissance

Les concentrations en monosaccharides dans les tiges basses en été (43 mg/g MS) sont deux fois supérieures à celles observées dans les rhizomes secondaires. Malgré tout, elles suivent les mêmes tendances : elles diminuent de 4,5 fois entre l'été et l'automne puis augmentent en hiver (3 fois). Les concentrations en monosaccharides mesurées en été dans les tiges moyennes sont légèrement inférieures à celle des tiges basses. Celles-ci diminuent ensuite de manière constante jusqu'en hiver (5 mg/g MS).

Les concentrations en monosaccharides des tiges hautes sont différentes de celles observées dans les autres parties de la tige. Alors que l'on note une diminution des quantités de ces sucres dans les autres parties de la tige après l'été, leurs concentrations doublent ici entre l'été et l'automne. Cette concentration en glucose et fructose est la plus forte mesurée dans les tiges au cours du cycle, elle dépasse les 50 mg/g MS. Celles-ci chutent ensuite fortement d'un facteur dix en hiver.

### *I-3-1-4 Etude des sucres dans les feuilles au cours de l'année*

Des dosages d'amidon, de saccharose et de glucose et de fructose dans les feuilles basses, moyennes et hautes ont été réalisés en été, automne et hiver (figure 6).

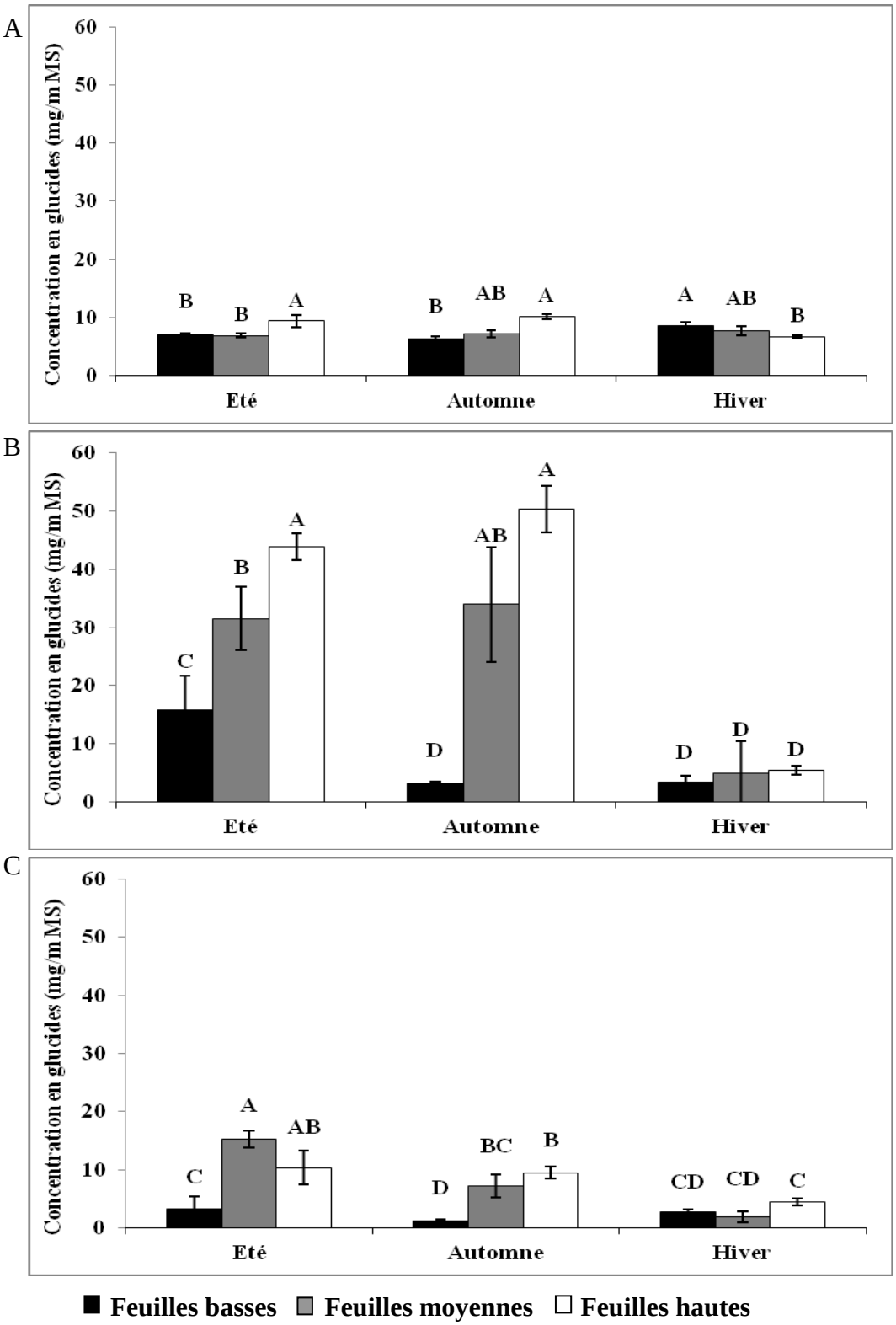



**Figure 6 : Dosages des glucides dans les feuilles de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle**

A: Dosage de l'amidon, B: Dosage du saccharose, C: Dosage du glucose et du fructose

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. Des tests de Kruskal-Wallis au risque ($\alpha$ = 5%) suivis de tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour chaque sucre sur l'ensemble des données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes

- ✓ Etude de l'amidon dans les feuilles au cours d'un cycle annuel de croissance

Les feuilles sont les organes qui contiennent le moins d'amidon. Les teneurs sont faibles et assez constantes tout au long du cycle dans chaque étage foliaire avec des valeurs maximales de l'ordre de 10 mg/g MS. Ces valeurs sont 6 à 20 fois plus faibles que dans les tiges ou les rhizomes.

- ✓ Etude du saccharose dans les feuilles au cours du cycle de croissance

Les feuilles basses contiennent des concentrations en saccharose plus faibles que les feuilles moyennes et hautes. En été, les valeurs sont deux à trois fois plus faibles (15 mg/g MS) que celles des feuilles moyennes et hautes à la même période. La concentration en saccharose chute ensuite fortement dès l'automne et reste inférieure à 4 mg/g MS jusqu'en hiver. La concentration en saccharose dans les feuilles moyennes (30 mg/g MS) est deux fois supérieure à celle des feuilles basses en été. Elle augmente légèrement en automne puis chute fortement en hiver ou elle est inférieure à 10 mg/g MS. Les feuilles hautes contiennent des concentrations en saccharose supérieures à celles des feuilles basses et moyennes en été (44 mg/g MS) et en automne (50 mg/g MS). En effet, elles sont 30 à 40% plus fortes que celles observées dans les feuilles moyennes pour les mêmes périodes. La teneur chute fortement en hiver pour atteindre une valeur semblable à celle mesurée dans les feuilles basses et moyennes (5 mg/g MS).

- ✓ Etude des monosaccharides dans les feuilles au cours d'un cycle annuel de croissance

Les teneurs en glucose et fructose dans les feuilles sont inférieures à celles observées dans les autres organes de la plante (inférieures à 20 mg/g MS). Les valeurs les plus fortes sont mesurées dans les feuilles moyennes et hautes durant l'été puis elles diminuent de manière constante jusqu'en hiver.

### I-3-2 Etude cytologique

Nos études précédentes basées sur les dosages enzymatiques ont fourni des informations précieuses sur la répartition des glucides à l'intérieur des différents organes de la plante, mais aucune information n'a été obtenue pour leur localisation tissulaire et cellulaire. Afin de surmonter ce manque, une étude histochimique sur les différents organes de miscanthus a été entreprise.

En utilisant la technique de coloration PAS-NBB (acide périodique Schiff-Naphtol Blue Black), les polymères polysaccharidiques (comme l'amidon) apparaissent sous forme de taches rouges et les protéines sous forme de taches bleu foncées. Le cytoplasme, les organites cytoplasmiques et les noyaux, qui contiennent des protéines, apparaissent légèrement bleutés et les cellules de la paroi cellulosique légèrement rosées. Les parois lignifiées ou sclérifiées apparaissent incolores ou légèrement teintées bleu clair.

Comme on le voit dans les Figures 7-A à 7-E, les rhizomes en décembre semblent très chargés en amidon. Les grains d'amidon sont répartis uniformément dans le parenchyme du rhizome et seuls les nombreux faisceaux vasculaires (vb) contiennent peu de grains d'amidon de petite taille (Figure 7-C). Au niveau cellulaire, l'amidon se situe à l'intérieur de grands amyloplastes régulièrement répartis dans le cytoplasme des cellules du parenchyme (Figure 7-D) et les cellules du phloème (Ph) apparaissent particulièrement pauvres en amidon (Figure 7-E).

Dans les racines en décembre, Figures 7-F à 7-H, l'amidon apparait principalement dans le cylindre central (cc), quelques grains d'amidon ont également été observés dans les cellules les plus périphériques du cortex (c). Les cellules allongées et de très grande taille observables dans le cortex sont totalement dépourvues de grains d'amidon. Les figures 7-G et 7-H (détail du cylindre central) montrent que les grains d'amidon sont plus grands et plus nombreux dans les cellules du parenchyme central que dans les cellules vasculaires et le parenchyme périphérique. Il apparaît également que l'endoderme (e) est dépourvu d'amidon tandis que les cellules du péricycle (P) contiennent de nombreux grains d'amidon de grande taille. Ces observations démontrent de façon très précise la structuration de la localisation de l'amidon à l'intérieur des tissus racinaires et confirment que les racines peuvent également être des organes de stockage non négligeables.

Dans la tige, la quantité et la localisation de l'amidon apparaît très variable en fonction de la zone de la tige. Dans le bas de la tige (Figure 7-I), la distribution est très proche de celle observée dans les rhizomes (Figure 7-C). Dans la tige moyenne (Figure 7-J), l'amidon est

observé uniquement à la périphérie du faisceau vasculaire et dans la tige supérieure (Figure 7-K) très peu voire aucun grain d'amidon n'a été observé.

Dans les feuilles (Figures 7-L et 7-M), l'amidon semble principalement localisé dans les grands amylochlroroplastes observables dans les cellules vasculaires de la gaine périvasculaire (BS). Cette localisation est typique de l'anatomie des plantes C4.

Dans les rhizomes de juin (Figures 7-N à 7-P), la distribution de l'amidon est comparable à celle observée en décembre, mais les grains d'amidon sont plus petits et moins nombreux. Cette différence est évidente lorsque l'on compare les figures 7-N et 7-A, les figures 7-O et 7-C et les figures 7-P et 7-D.

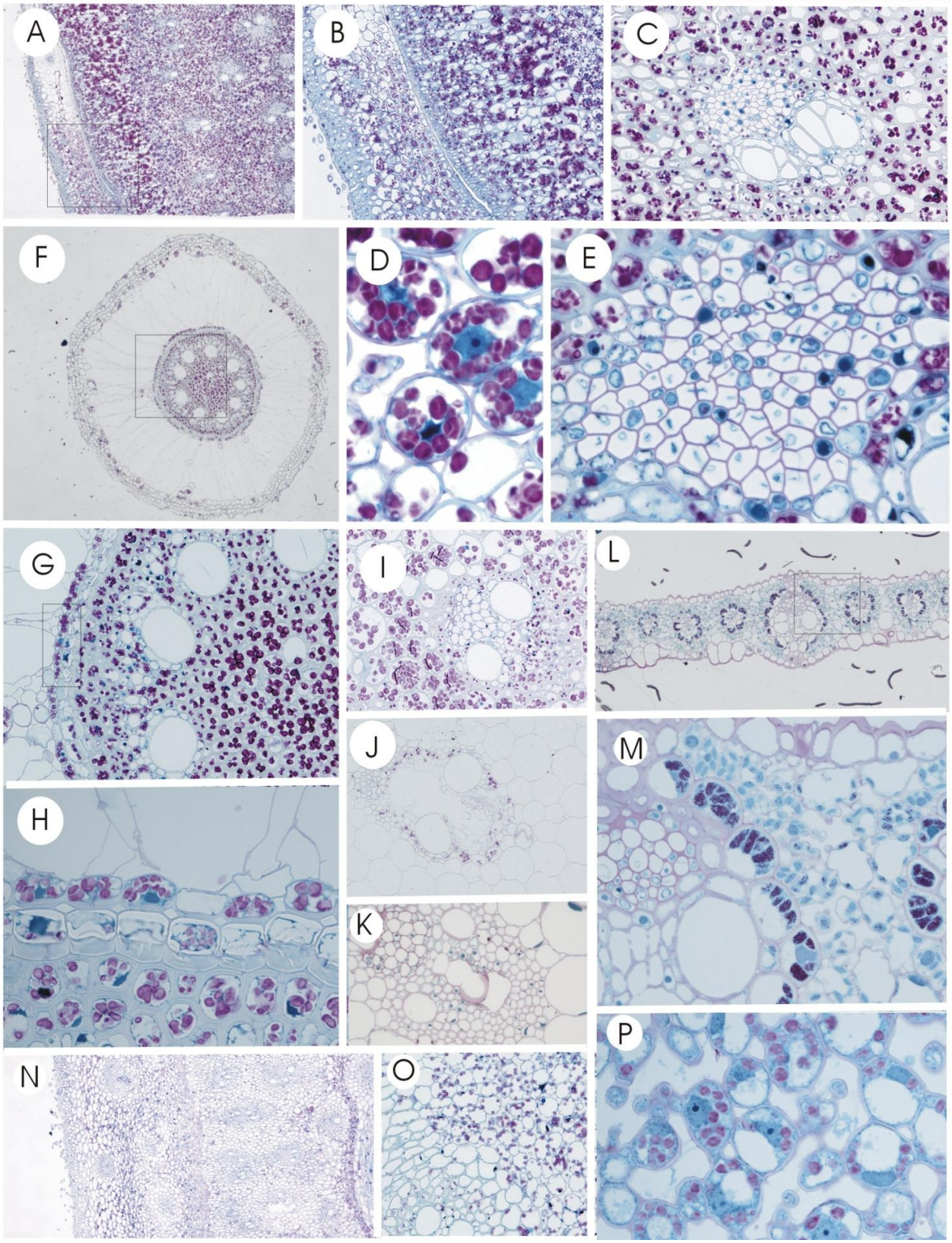



**Figure 7 : Localisation histologique des glucides**
Localisation des glucides dans les rhizomes de décembre (A à E) et de juin (N à P), dans les racines (F à H), les tiges basses (F), moyennes (G) et hautes (H) de décembre, et les feuilles de juin (L et M)

## I-4 Discussion

### I-4-1 Stockage de glucides de réserve dans les parties souterraines de miscanthus en hiver

Les plantes ne peuvent généralement pas utiliser tous les squelettes carbonés résultant de la photosynthèse. Par conséquent, elles stockent ces derniers comme glucides de réserve à court ou à long terme (Valluru et Van den Ende, 2008). Chez *Miscanthus x giganteus*, de grandes quantités de glucides non structuraux sont présents dans son rhizome et ses racines durant l'hiver. Chez *Miscanthus x giganteus*, la principale forme de stockage de glucides est l'amidon. Les concentrations en amidon sont de l'ordre de 200 mg/g MS dans les rhizomes primaires et les rhizomes secondaires, et elles avoisinent 100 mg/g MS dans les racines. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus sur des rhizomes de *Canna edulis* (Puncha-Arnon *et al.*, 2007). Des quantités similaires (17,6% de MS) ont trouvées dans les rhizomes de roseau (*Phragmites australis*) récoltés en mars (Klimeš *et al.*, 1999). Ils correspondent également à ceux obtenus sur d'autres espèces comestibles (patate douce, manioc) où des quantités d'amidon avoisinant 16 à 24 % de MS ont été trouvées dans les racines et les tubercules (Hoover, 2001).

Des concentrations non négligeables de fructanes mais surtout de saccharose (entre 45 à 65 mg/g MS) ont également été mesurées dans ces organes pérennes. Le saccharose, en plus de son rôle de réserve, peut aussi jouer un rôle de protection contre les stress abiotiques tels que le froid ou la sècheresse. L'adaptation des plantes à des basses températures (non gélives) implique souvent l'accumulation de sucres solubles osmotiquement neutres, le plus fréquent et le plus abondant de ces derniers étant le saccharose (Guy *et al.*, 1992). Selon Steponkus (1984) un doublement de la concentration interne en soluté diminue la déshydratation cellulaire de 50%.

Chez le *Miscanthus x giganteus*, on retrouve également de faibles concentrations de fructanes (entre 10 et 20 mg/g MS). Le miscanthus, comme d'autre géophytes, peut au sein d'un même organe de stockage, contenir simultanément des fructanes et de l'amidon, avec un stockage préférentiel de l'amidon (Orthen, 2001 ; Ranwala et Miller, 2008). Il a été démontré que chez les graminées, l'exposition à de basses températures peut également induire la synthèse des fructanes survenant en réponse à l'accumulation de saccharose (Pollock et Cairns, 1991). En plus de leur rôle de glucides de réserve, les fructanes présentent de

nombreuses autres fonctions comme l'osmorégulation, la cryoprotection, l'adaptation au froid ou la sécheresse (Pollock, 1986; Hendry, 1987).

Le *Miscanthus x giganteus*, comme de nombreux géophytes, stocke donc de grandes quantités de glucides de réserves dans son rhizome durant l'hiver. Ces glucides représentent environ 25% de la matière sèche du rhizome et les principales formes sont l'amidon et le saccharose.

### I-4-2 Remobilisation printanière des réserves carbonées des parties souterraines

Une importante chute des teneurs en amidon de l'ordre de 50 à 60% a été observée entre le printemps et l'hiver dans les racines et les rhizomes de *Miscanthus x giganteus*. Cette chute correspond à la période où la vitesse de croissance des parties aériennes est maximale. Cette croissance peut représenter jusqu'à 0,4 cm/degré-jour (Zub *et al.*, 2012). En effet une étude réalisée sur *Miscanthus x giganteus* durant deux cycles de croissance par Strullu *et al.* (2011), montre une vitesse de croissance maximale et linéaire entre les mois de mai et les mois de juillet-aout. Elle tendrait à faire l'hypothèse que malgré le développement déjà important de la plante, les photoassimilats ne seraient pas suffisant pour soutenir la forte production de biomasse aérienne à cette période. Ceci impliquerait donc la remobilisation printanière des réserves glucidiques afin d'approvisionner les parties aériennes en squelettes carbonés. Un résultat similaire a été observé pour les bulbes de *Galanthus nivalis* (Orthen et Wehrmeyer, 2004).

Parallèlement à cette chute d'amidon et de saccharose, de fortes hausses des teneurs en glucose et fructose sont observées dans ces mêmes organes en été. Les concentrations en ces deux monosaccharides sont multipliées par 2,5 dans les racines, par 4 dans les rhizomes secondaires et par 8,5 dans les rhizomes primaires à cette période. Cette augmentation peu facilement être expliquée par le fait le glucose est connu comme étant le premier produit issu de la dégradation de l'amidon. Celui-ci va ensuite être converti en hexoses phosphate (glucose phosphate et fructose phosphate) qui permettront la synthèse de saccharose (Smith *et al.*, 2005).

Plusieurs études démontrent qu'en cas de forte demande d'un organe puits, l'amidon peut être hydrolysé puis converti en saccharose pour ensuite être chargé dans le phloème pour le transport à longue distance vers les organes en croissance (Smith *et al.*, 2005 ; Plaxton et

McManus, 2006). On aurait donc pu s'attendre à une hausse des teneurs en saccharose (provenant de l'hydrolyse de l'amidon) dans les organes souterrains durant l'été. Or, comme cela a été observé pour l'amidon, les teneurs en saccharose dans les racines et rhizomes sont plus faibles durant l'été qu'au printemps et en automne. Une étude menée sur le tubercule de pomme de terre par Hajirezaei *et al.* (2003) avance l'hypothèse que ce serait l'appauvrissement en saccharose qui servirait de premier signal métabolique. Il déclencherait ensuite une hydrolyse de l'amidon. La demande en squelettes carbonés pour la croissance des parties aériennes du miscanthus engendrerait une chute des teneurs en saccharose. Celle-ci servirait alors de signal et déclencherait une hydrolyse des réserves amylacées des racines et rhizomes glucides de réserve vers les organes en croissance. On peut donc imaginer que si la demande (puits) est forte le saccharose (glucide de transport) produit est immédiatement exporté vers les parties aériennes maintenant des concentrations faibles et entretenant ainsi les conditions d'une remobilisation des réserves.

Il est donc possible de résumer l'ensemble de variations des teneurs en différents glucides dans les parties aériennes ainsi : la demande en squelettes carbonés pour la croissance des parties aériennes engendrerait une chute des teneurs en saccharose. Celle-ci servirait de signal et déclencherait une hydrolyse des réserves amylacées. Cette hydrolyse génèrerait une hausse de la teneur en monosaccharides qui aboutirait à une synthèse de saccharose afin de répondre à la demande des organes aériens en croissance.

### I-4-3 Synthèse des glucides dans les feuilles en été et automne

De fortes quantités de saccharose ont été mesurées dans les feuilles basses durant l'été, suivi d'une baisse en automne et en hiver. Dans les feuilles moyennes et hautes, les teneurs sont importantes durant l'été et l'automne tandis qu'elles sont faibles en hiver. Les mêmes tendances sont observées au niveau des concentrations en glucose et fructose. Les feuilles sont le siège de la photosynthèse chez les plantes, mécanisme permettant la synthèse de fructose et de glucose. Ces glucoses et fructoses vont être utilisés par la plante ou s'associer pour former du saccharose qui est la principale forme de transport des glucides (cf § II-2-1 pp 54-55). Les chutes des teneurs en mono- et disaccharides survenues dès l'automne pour les feuilles basses et en hiver pour les feuilles moyennes correspondent aux périodes où la sénescence des feuilles apparaît.

Tous les produits de la photosynthèse ne sont pas destinés à la formation de saccharose. En effet, une fraction du carbone assimilée lors de la photosynthèse est conservée dans les chloroplastes sous forme d'amidon (Zeeman *et al.*, 2010).

Les teneurs en amidon sont faibles dans les feuilles. Ces valeurs peuvent être expliquées par l'anatomie de la feuille. En effet, dans les feuilles de miscanthus, comme chez un grand nombre de plante en C4 ou ayant une anatomie dite de Kranz, cet amidon ne se trouve que dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire. Notre étude cytologique confirme cette hypothèse puisque nous pouvons observer que le peu d'amidon présent dans les feuilles est localisé sous forme de petits grana dans les chloroplastes de la gaine périvasculaire. Ceci ne constitue au final qu'une possibilité de stockage de l'amidon limitée et finalement très temporaire. Les teneurs en amidon varient peu au cours du temps, ceci peut s'expliquer par le fait que les prélèvements aient été effectués au cours de la journée et non tôt le matin ou durant la nuit. En effet, on sait que la taille des grains d'amidon est maximale en fin de journée. Une partie de cet amidon est ensuite dégradée durant la nuit pour fournir des substrats pour la respiration des feuilles et pour poursuivre la synthèse de saccharose, permettant l'exportation de glucides vers le reste de la plante (Zeeman *et al.*, 2010).

Les feuilles, grâce à la photosynthèse, vont synthétiser de grandes quantités de glucides, durant l'été et l'automne. Le principal glucide retrouvé dans ces organes est le saccharose.

### I-4-4 Etude du saccharose

Les concentrations les plus fortes en saccharose ont été observées dans les tiges hautes durant l'été et l'automne. Ces teneurs sont supérieures à celles des feuilles et des parties souterraines pour les mêmes périodes. Les tiges n'étant pas des organes ayant une forte activité photosynthétique comparée aux feuilles, la quantité de saccharose observée dans les tiges hautes pourrait donc refléter la forte activité photosynthétique des feuilles sous-jacentes exportant le saccharose nécessaire à assurer la croissance de la zone apicale. Néanmoins ce n'est pas la seule provenance possible du saccharose. Comme nous l'avons vu précédemment, (cf § II-2-2 pp 30) ce saccharose pourrait provenir également de l'hydrolyse des réserves amylacées des organes souterrains.

Au cours de l'automne, lorsque la croissance des parties aériennes est quasiment achevée, on observe une forte diminution des concentrations en monosaccharides dans les parties basses de la tige. Cette diminution peut être une conséquence du début du chargement en amidon de cette zone d'où une utilisation d'une grande quantité de glucose. Malgré les faibles teneurs en mono- et disaccharides des feuilles basses en cette périodes, une forte teneur en saccharose a été mesurée dans les tiges basses. Ce saccharose doit correspondre au transport des glucides synthétisés dans les parties moyennes et hautes de la plante vers les organes souterrains.

Pour la partie haute des tiges, les teneurs en glucose, fructose et saccharose sont plus élevées en automne. Ceci peut être expliqué par l'apport de ces glucides par les feuilles hautes encore photosynthétiquement actives et le faible besoin en squelette carboné de la plante pour terminer sa croissance. Le besoin en glucide de la plante étant plus faible en fin de cycle de croissance qu'en été, les monosaccharides ne sont pas assimilés aussi rapidement. La totalité des sucres synthétisés par les feuilles ne sont pas utilisés pour la croissance de la biomasse aérienne et une partie va donc se retrouver au niveau des tiges en vue d'être exportée. Des comportements similaires ont été observés au niveau des tiges moyennes durant l'automne.

Ainsi, la diminution générale des besoins en squelettes carbonés est confirmée par la reconstitution des réserves en amidon dans les organes souterrains ainsi que par la légère augmentation d'amidon observée dans les tiges moyennes et hautes en cette période. Le saccharose mesuré dans les tiges basses durant l'automne proviendrait donc de la remobilisation automnale des glucides synthétisés dans les feuilles vers les organes souterrains.

### I-4-5 Reconstitution des réserves glucidiques

Les réserves d'amidon se reconstituent dans les organes souterrains dès l'automne *via* le transport phloémien du saccharose, celui-ci provenant de glucides produits dans les feuilles lors de la photosynthèse.

Le remplissage en amidon ne se fait pas de manière uniforme dans les différentes structures des parties souterraines. En automne, les réserves en amidon se sont entièrement reconstituées dans les rhizomes primaires (200 mg/g MS). Par contre, il faut attendre l'hiver pour voir les réserves d'amidon atteindre les mêmes concentrations dans les rhizomes secondaires. Les racines suivent les mêmes tendances que les rhizomes secondaires et

n'atteignent leur teneur maximale qu'en hiver. On peut alors penser que la plante commence par accumuler de l'amidon dans son rhizome primaire et que lorsque ce dernier a atteint sa capacité maximale (environ 200 mg/g MS), la plante accumule l'amidon dans les rhizomes secondaires et les racines. Ce processus peut s'expliquer par l'organisation même des parties souterraines. D'énormes quantités de saccharose descendent de la tige et transitent dans le rhizome secondaire avant de s'accumuler dans les parties plus anciennes du rhizome (comme le rhizome primaire). Il semblerait plus avantageux énergétiquement pour la plante de remplir ces parties les plus anciennes avant le rhizome de l'année. Au début de la phase de remobilisation des glucides des parties aériennes, le rhizome secondaire dépenserait uniquement de l'énergie pour le transfert du saccharose vers le rhizome primaire et non pour la synthèse d'amidon. Une fois ce dernier rempli, le rhizome secondaire pourrait alors accélérer la synthèse d'amidon tout comme les racines qui lui sont associées.

Un autre phénomène est observé durant la phase intense de la remobilisation automnale des sucres : l'accumulation d'amidon dans les tiges basses. Durant cette période, une grande proportion des glucides néosynthétisés sont mobilisés vers les parties souterraines pour reconstituer les réserves amylacées de la plante. Cette mobilisation entraine de fortes concentrations en saccharose dans les parties souterraines et également dans les tiges basses. Les parties souterraines ne pouvant assimiler tout ce saccharose, une partie de celui-ci semble être stocké temporairement sous forme d'amidon dans les parties basses de la tige.

Une fois que les apports de saccharose formé dans les parties aériennes diminuent, l'amidon des tiges basses serait hydrolysé puis mobilisé à son tour pour permettre la fin du remplissage en amidon des rhizomes secondaires et des racines durant l'hiver. Cette hypothèse est soutenue également par la hausse de monosaccharides et de disaccharides dans les tiges basses durant l'hiver.

La reconstitution des réserves amylacées dans les parties souterraines de Miscanthus x giganteus débute en automne mais n'atteint son maximum qu'en hiver.

### I-4-6 Bilan des flux glucidiques

Notre étude nous a permis de déterminer un mode de fonctionnement des flux de glucides dans la plante au cours de son cycle de croissance (figure 8).

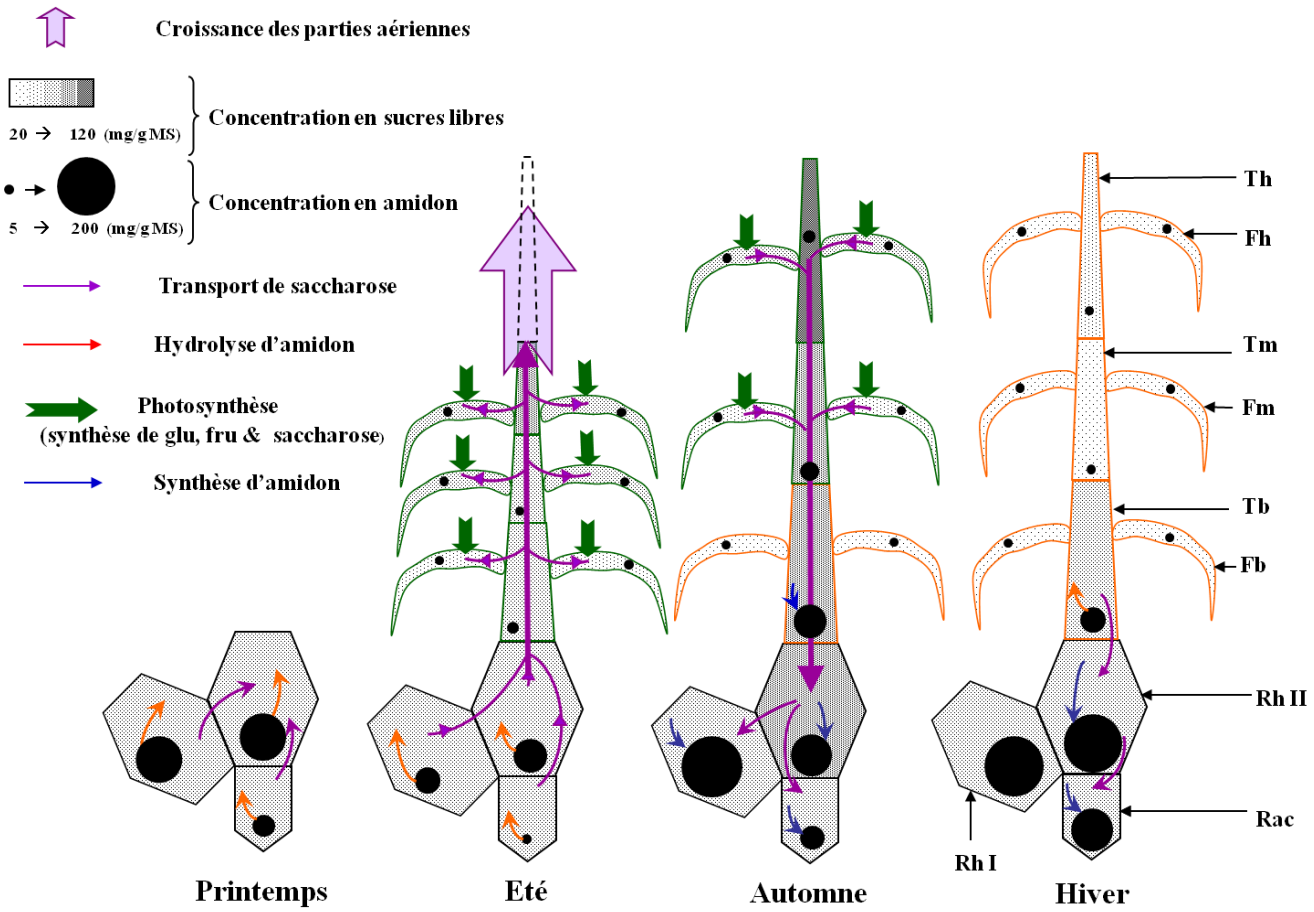



**Figure 8 : Schématisation des flux de glucides au sein de *Miscanthus x giganteus* au cours d'un cycle de croissance**
Th : tiges hautes ; Fh : feuilles hautes ; Tm : tiges moyenne ; Fm : feuilles moyennes ; Tb : tige basse ; Fb : feuilles basses ; RhII : rhizome secondaire ; Rac : racines

✓ Printemps

Début de croissance des parties aériennes et première remobilisation des réserves glucidiques des parties souterraines vers les parties aériennes.

✓ Eté

Phase de croissance maximale des parties aériennes. Cette croissance est alimentée par les glucides produits dans les feuilles *via* la photosynthèse ainsi que par une forte remobilisation printanière des réserves amylacées des parties souterraines.

- ✓ Automne

Phase de croissance ralentie des parties aériennes. Forte remobilisation des glucides néosynthétisés dans les feuilles (sous forme de saccharose) vers les parties basses. La synthèse d'amidon dans les parties souterraines a lieu prioritairement dans les rhizomes primaires. Une accumulation de réserves amylacées à également lieu dans les rhizomes secondaires et les racines. Enfin, une accumulation transitoire d'amidon est observée dans les tiges basses.

- ✓ Hiver

Sénescence des parties aériennes. Remobilisation de l'amidon accumulé transitoirement dans les tiges basses permettant un remplissage optimal des rhizomes secondaires et des racines en amidon.

## I-5 Conclusion

De grandes variations des teneurs en amidon, glucose, fructose et saccharose sont observées dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* tout au long d'un cycle de croissance. La plante accumule de grandes quantités de glucides (majoritairement de l'amidon) dans ces organes souterrains en fin de cycle. Ces réserves seront remobilisées en début de cycle pour pallier à la demande engendrée par la croissance rapide et importante de la biomasse aérienne. La demande est d'autant plus importante que les teneurs en saccharose (provenant de la photosynthèse) mesurées dans les tiges de la plante en automne sont supérieures à celles observées en été (provenant de la photosynthèse et de la remobilisation printanière).

L'étude de Christian *et al.* (2008) démontre qu'aucune perte de rendement n'est observée au bout de 14 années de récoltes tardives successives. L'étude de Clifton-Brown et Lewandowski (2002) montre que l'augmentation moyenne de rendement de la biomasse entre la deuxième et la troisième année de culture (avec apport d'engrais) ont été semblables lors des récoltes effectuées en automne et en hiver pour quatre clones de *Miscanthus x giganteus*. Des résultats similaires ont été observés par Strullu *et al.* (2011) : aucune perte de rendement pour le *Miscanthus x giganteus* âgé de 3 à 4 ans cultivé avec azote (120 unités d'azote) et récolté précocement. Cependant, dans cette même étude, une baisse de rendement pour les plantes récoltées en automne sans apport d'azote a été observée. D'après ces résultats on peut se demander si cette baisse de rendement pourrait être expliquée par l'impossibilité pour la plante de remobiliser l'ensemble de ses réserves glucidiques dans ses parties souterraines après l'automne. Des coupes précoces régulières, avant que les parties souterraines ne soient rechargées en glucides de réserve, pourraient donc s'accompagner d'une chute de rendement.

Sur un plan plus appliqué, l'amidon contenu dans les tiges basses en automne peut aussi constituer un atout dans le cadre de la fabrication de bioéthanol. En effet, la fabrication de biocarburant de deuxième génération est réalisée à partir de la lignocellulose (polymère de glucides complexes de cellulose, hémicellulose et lignine). Cette lignocellulose est traitée afin de libérer des monomères tels que le glucose, le xylose, l'arabinose, le galactose, le mannose qui serviront à produire du bioéthanol par fermentation. La présence d'amidon dans les tiges en automne augmenterait donc la quantité de sucres fermentescibles et donc le rendement en bioéthanol.

## II- L'asparagine et l'arginine jouent un rôle central dans le stockage et la remobilisation de l'azote chez *Miscanthus x giganteus.*

**(A seasonal study of nitrogen status in *Miscanthus x giganteus* highlight a central role for Asparagine and Arginine)**

### II-1 Introduction

L'azote est l'un des éléments nutritifs majeurs utilisés par les plantes. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques, la chlorophylle, les coenzymes, les phytohormones et les métabolites secondaires (Marschner, 1995).

L'utilisation de l'azote par les plantes se déroule en plusieurs étapes : l'absorption, l'assimilation, la translocation et la remobilisation (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). La capacité qu'ont les plantes à stocker et à recycler leur azote est un élément fondamental à la survie des plantes vivaces. Alors que les espèces végétales à la fois annuelles et vivaces ont la capacité de stocker, remobiliser et recycler l'azote au cours de la saison de croissance, le recyclage saisonnier de l'azote représente une composante nécessaire de la vie pérenne (Staswick, 1994; Stepien *et al.*, 1994). L'exportation d'acides aminés, l'une des formes les plus abondantes d'azote pour le transport à longue distance, est un processus essentiel pour la bonne répartition de l'azote dans la plante (Okumoto et Pilot, 2011). Chez la plupart des plantes non légumineuses, les composés majeurs de transport sont l'asparagine et la glutamine (Ireland et Lea, 1999).

On sait que les glucides sont les composés de stockage prédominant en termes de masse dans les organes souterrains de stockage. Néanmoins, plusieurs résultats ont montré que les composés de réserve azotés (nitrates, les acides aminés, protéines) étaient plus importantes que les réserves de glucides pour la croissance des plantes herbacées (Meuriot *et al.*, 2003). Les protéines représentent la majeure partie de l'azote stocké chez de nombreuses espèces d'arbres. Elles sont définies comme des protéines de stockage quand elles sont présentes en grandes quantités pendant l'hiver et absentes pendant l'été. Des protéines de stockage spécifiques ont été identifiées dans l'écorce de nombreux arbres comme chez le peuplier mais également dans les organes de multiplication végétative des plantes, tels que les tubercules de patate douce et de pommes de terre (Müntz, 1998). Chez d'autres espèces comme le pêcher, l'azote semble plutôt être stocké sous forme d'acides aminés libres (Gomez

et Faurobert, 2002). Lors du stockage d'azote sous formes d'acides aminés dans les plantes rhizomateuses, un ou deux acides aminés avec un haut rapport N:C dominent généralement au sein d'une espèce, les plus répandus étant l'asparagine (2:4), la glutamine (2:5) et l'arginine (4:6) (Sagisaka 1987; Nordin et Näsholm 1997).

Contrairement à ce qui est observé chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique, la fertilisation azotée ne semble avoir aucune influence sur la production de biomasse chez le miscanthus (Christian *et al.*, 2008; Strullu *et al.*, 2011). Nous formulons donc l'hypothèse que cette plante semble avoir de fortes capacités de remobilisation et de stockage de l'azote. Pour y répondre, notre objectif est de déterminer les formes d'absorption et de réserve ainsi que les flux d'azote tout au long du cycle de croissance la plante. Notre étude porte sur la quatrième année d'une culture de *Miscanthus x giganteus* implantée depuis 2006.

## II-2 Matériel et méthodes

### II-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental

Le site expérimental de culture est situé dans la région Picardie, dans le nord de la France (49°52'N, 3°00'E). Le sol est de type argilo-limoneux (Ortic luvisol) constitué de 74% de limon, 7,6% d'argile et 5% de sable avec un pH de 7,6. La parcelle est située sous un climat océanique, avec des précipitations moyennes de 625 mm par an et une température moyenne de 10,7° C pour les 10 dernières années. Un clone de *Miscanthus x giganteus* (clone britannique en provenance de l'ADAS, GB) a été implanté à une densité de 15,6 plantes.$m^{-2}$ dans un dispositif en blocs aléatoires. La culture précédente l'implantation était du blé. La densité après la première saison de croissance a été de 14,9 plantes.$m^{-2}$. Au cours de la deuxième année, quatre traitements différents ont été établis avec trois blocs. Les traitements ont fait varier l'apport d'engrais azotés (N) : 0 kg d'azote.$ha^{-1}$ (N1) ou 120 kg d'azote.$ha^{-1}$ (N2), et les dates de récolte : récolte précoce (P) ou récolte tardive (T). Les parcelles entières ont été récoltées en octobre pour la récolte précoce (récolte en vert) et en février pour la récolte tardive (récolte en sec), seules les coupes tardives ont été étudiées pour ces travaux.

Les parcelles mesuraient 360 $m^2$ (12 m x 30 m), avec au final 540 plantes par parcelle. A partir de la deuxième année, pour les plantes cultivées en condition N2, de l'azote a été appliqué chaque année sous forme de nitrate d'ammonium à la fin du mois d'avril. L'année des prélèvements, les 120 unités d'azote ont été apportées juste après le prélèvement d'avril sous forme de nitrate (25%), d'ammonium (25%) et d'urée (50%). Les trois formes azotées étaient marquées de manière uniforme avec un excès isotopique de 0,417% (soit 500 g d'azote marqué $^{15}N$ par hectare).

Les différents prélèvements ont été réalisés lors de la quatrième année de culture à 6 stades de développement de la plante correspondant à :

- avril : émergence des parties aériennes
- juin : phase de croissance active des parties aériennes. Le miscanthus est au stade 8 feuilles ligulées.
- juillet : phase de croissance active des parties aériennes. Le miscanthus est au stade 10-12 feuilles ligulées.

- octobre : phase de début de maturité. Le miscanthus est au stade 18-20 feuilles ligulées. Cette phase correspond aussi à la fin de croissance des parties aériennes et à la période de récolte précoce ou en « vert », les feuilles hautes étant encore vertes.
- décembre : phase de maturité avancée. Les feuilles hautes sont sénescentes.
- février : phase de sur-maturité. Cette phase correspond à la période de récolte tardive ou en « sec ». Le miscanthus a perdu beaucoup de feuilles, il ne reste que les feuilles les plus hautes entièrement senescées.

A chaque stade, nous avons prélevé les différents organes du système souterrain et ceux de l'appareil aérien.

Pour la partie souterraine, 2 échantillons différents ont été choisis :

- le rhizome (Rh)
- les racines (Rac)

Pour la partie aérienne, nous avons divisé la plante en différentes parties en fonction du nombre de nœuds et de feuilles. Quatre à six parties ont donc été déterminées :

- les tiges basses (Tb)
- les tiges moyennes (Tm)
- les tiges hautes (Th)
- les feuilles basses (Fb)
- les feuilles moyennes (Fm)
- les feuilles hautes (Fh)

Pour le prélèvement d'avril, les parties aériennes étant peu développées, il était impossible de différencier les feuilles des tiges. Lors du des prélèvements de juin et juillet, la partie aérienne a été divisée en quatre (Tb, Th, Fb, Fh), les deux étages foliaires étaient encore verts. Pour les prélèvements d'octobre à février, la partie aérienne a été divisée en six (Tb, Tm, Th, Fb, Fm et Fh). En octobre, les feuilles basses récoltées étaient sénescées et les feuilles moyennes en cours de sénescence. En décembre, les feuilles basses étaient tombées, les feuilles moyennes étaient sénescées et les feuilles hautes sénescentes. En février, Il ne restait que les feuilles hautes sénescées, les Fb et Fm étaient tombées.

Les échantillons prélevés ont été immédiatement pesés, découpés et plongés dans l'azote liquide. Ils ont ensuite été broyés à froid au broyeur à billes puis stockés à -80°C.

## II-2-2 Extraction et dosages

### *II-2-2-1 Dosages C/N et excès isotopiques ($^{15}N$)*

Les échantillons broyés et stockés à -80°C ont été lyophilisés. Puis les concentrations totales d'azote et de carbone ont été déterminées par la méthode Dumas en utilisant un analyseur élémentaire (EA 1112 FLASH série, Thermo Electron, Allemagne). Les enrichissements $^{15}N$ ont été déterminés à l'aide de l'analyseur élémentaire lié à un spectromètre de masse (DELTA V Avantage, Thermo Electron, Brême, Allemagne).

### *II-2-2-2 Extraction des acides aminés*

Un échantillon de 20 mg de poudre lyophilisée a été placé dans des tubes à centrifuger de 1,5 mL avec 1 mL d'éthanol à 80%. Après 2 heures d'incubation à température ambiante sous agitation (140 rpm), les tubes ont été centrifugés à 12000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les surnageants ont été récupérés puis placés dans des tubes de 5 mL. Deux nouvelles extractions ont été répétées avec de l'alcool à 60% puis avec de l'eau distillée et les trois surnageants contenant les acides aminés ont ensuite été réunis en un seul extrait.

### *II-2-2-3 Dosage des acides aminés totaux*

La teneur en acides aminés totaux est déterminée selon la méthode colorimétrique de Rosen (1957), en utilisant la glutamine comme acide aminé de référence. La technique est basée sur la réaction des groupements α-aminés avec la ninhydrine, réduite à pH 5 par une solution de KCN 2% dans un tampon acétate. Un volume de 10 µL d'extrait complété à 100 µL avec de l'eau est mélangé à 50 µL d'une solution de KCN à 10 mM dilué à 2% (v/v) dans un tampon acétate 2,6 M pH 5,3 et à 50 µL d'une solution de ninhydrine à 3% dans de l'éthylèneglycol monométhyl éther. Après agitation et incubation de 15 min à 100°C, la réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout immédiat de 500 µL d'un mélange d'isopropanol-eau (1:1, v:v). L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm.

### *II-2-2-4 Dosage des acides aminés individuels*

Les mêmes extraits que ceux utilisés pour les dosages d'acides aminés totaux ont été utilisés. La détermination des acides aminés a été réalisée par HPLC sur une colonne Kromasil C18 -100 Å-5µm 4,6 x 250mm après dérivation à l'o-phtalaldéhyde (OPA). Pour la dérivation, 50 µL de l'échantillon ont été ajoutés à 50 µL de tampon borate contenant 0,25% (w:v) d'OPA et 5% de β-mercaptoéthanol (v:v). Une injection de 5 µl de cette solution a été réalisée.

La phase mobile est constituée de l'éluant A : 50 mM $CH_3COONa$ (pH 7,4) : 50 mM $NaHPO_4$ (pH 7,4) : MeOH : THF (48:48:2:2; v:v:v:v) et de l'éluant B : MeOH : eau (65:35; v: v). Les gradients suivants ont été appliqués : 80% de A durant les 3 premières minutes, 80% - 70% A durant 12 min, 70% - 50% A durant 15 min, de 50% - 45% A durant 10 min, de 45% - 20% A durant 10 min, de 20% - 15% A durant 5 minutes, 15% - 10% A durant 3 min, de 10% - 0% A durant 2 min et 0% A durant 15 min à un débit de 1,2 ml / min.
La détection a été faite par mesure spectrofluorimétrique à 330 nm (λex) et à 430 nm (λem).

### *II-2-2-5 Extraction et dosage des protéines*

Un échantillon de 100 mg de poudre végétale conservé à -80°C a été placé dans un tube à centrifuger de 1,5 mL avec 200 µL de tampon d'extraction (Tricine 100 mM, $CaCl_2$ 40 mM, PVP 0,5% (p/v), Triton 100X 0,05% (v/v), EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, PMSF 1 mM ; pH 8). Le mélange est homogénéisé et centrifugé à 15000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait brut de protéines solubles.

La concentration en protéines de l'extrait est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). L'extrait protéique (1 à 5 µL) est ajouté à 200 µL de réactif de Bradford dilué au 1/5$^{ème}$ (Bio-Rad). Après quelques minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 595 nm et comparée à celle d'une gamme d'albumine sérique bovine (BSA).

### *II-2-2-6 Extraction et dosages des ions*

Un échantillon de 150mg de poudre conservées à -80°C a été placée dans des tubes à centrifuger de 2mL. Un volume de 1,5 mL d'eau UHQ est ajouté puis les tubes sont placés

sous agitation à température ambiante pendant 30 min avant d'être centrifugés 5 min à 15000 rpm à température ambiante.

Les dosages ont été réalisés à l'aide d'une chromatographie ionique. La chromatographie ionique utilisée est une DIONEX ICS 900 composées d'une colonne IonPac Anionique AS22, d'une colonne IonPac Cationique CS12A et d'un passeur AS-DV. Les éluants utilisés sont une solution composée de carbonate de sodium ($Na_2CO_3$) à 4,5 mM et de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) à 1,4 mM pour la chromatographie anionique et une solution de 20 mM d'acide méthanesulfonique ($CH_3SO_2OH$) pour la chromatographie cationique.

### *II-2-2-7 Analyses statistiques*

Les résultats ont été exposés sous forme d'histogrammes ou de courbes représentant les moyennes des valeurs mesurées ainsi que leur erreur standard. Des analyses de variance et des tests de Newman-Keuls au risque ($\alpha$ = 5%) ont été réalisés à l'aide du logiciel Statbox 6 afin de comparer les moyennes et d'en ressortir les valeurs significativement différentes.

Afin de voir si les relations entre les teneurs en azote et en protéines ainsi que les relations entre les teneurs en azote et en acides aminés sont statistiquement significatives (avec une probabilité de 5%), les coefficients de corrélations ont été comparés avec la table des valeurs critiques du coefficient de corrélation de Pearson.

Suite à ces régressions simples, des régressions multiples ont été réalisées avec la teneur en azote en variable expliquée et la teneur en protéines et la teneur en acides aminés en régresseurs. Les valeurs de chaque variable ont été centrées réduites. Les régressions multiples standardisées permettent de déterminer le « poids » des variables acides aminés et protéines sur la variation de l'azote total. Le coefficient de détermination ($R^2$) indique la proportion de variance de l'azote expliquée par les variables acides aminés et protéines. Le coefficient Bêta associé à chaque variable indépendante (acides aminés et protéines) dans l'équation représente la variation de l'azote lorsque la variable indépendante varie d'une unité, alors que les autres variables dans l'équation demeurent constantes.

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statbox 6.

## II-3 Résultats

### II-3-1 Variation des quantités d'azote total chez *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance : mise en évidence de trois phases clés

La quantité d'azote total a été mesurée grâce à un analyseur élémentaire et à la méthode Dumas sur les organes des parties souterraines et aériennes de *Miscanthus x giganteus* tout au long du cycle de croissance (figure 1).

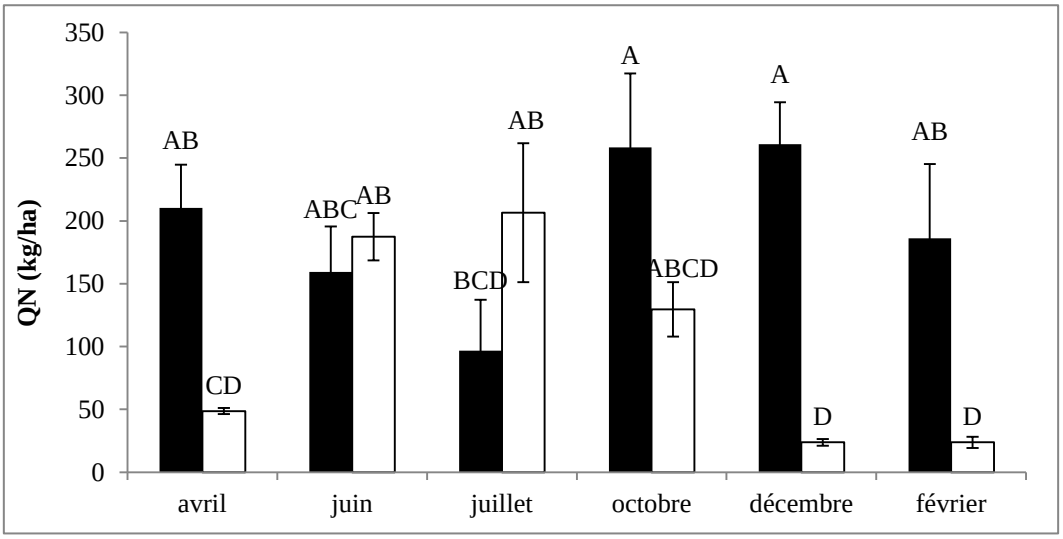



**Figure 1. Dosages de l'azote total dans les parties souterraines et aériennes de *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance**
Les histogrammes noirs représentent les parties souterraines et les blancs les parties aériennes. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une analyse de variance (anova) a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur l'ensemble des données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes

- Parties souterraines

De fortes variations de la teneur en azote total sont observées durant le cycle de croissance dans les parties souterraines de la plante. Celles-ci sont de l'ordre de 210 kg/ha au printemps, puis diminuent progressivement en juin et juillet (97 kg/ha). Une augmentation significative est ensuite observée en fin d'année pour atteindre 250 kg/ha dès le mois d'octobre. Enfin, de légères pertes d'azote sont observées entre le mois de décembre et le mois de février.

- Parties aériennes

Dans les parties aériennes de la plante, les quantités d'azote suivent une tendance inverse à celle observée dans les parties souterraines. En effet, les quantités d'azote augmentent de manière significative entre avril et juillet (de 50 kg/ha à 207 kg/ha) puis chutent fortement jusqu'en décembre (24 kg/ha). Par contre, celles-ci restent stables entre décembre et février.

Afin d'identifier les flux d'azote au sein de *Miscanthus x giganteus* et de s'affranchir de la biomasse de chaque plante, les ratios entre l'azote contenu dans la partie souterraine ou aérienne et l'azote total ont été mesurés. Ils ont été calculés pour chaque plante tout au long de l'année en divisant la quantité d'azote de la partie souterraine ou aérienne par la quantité d'azote total de la plante (figure 2). Ce calcul de ratio permet, grâce à l'affranchissement des biomasses, d'obtenir des résultats plus précis que ceux montrés précédemment.

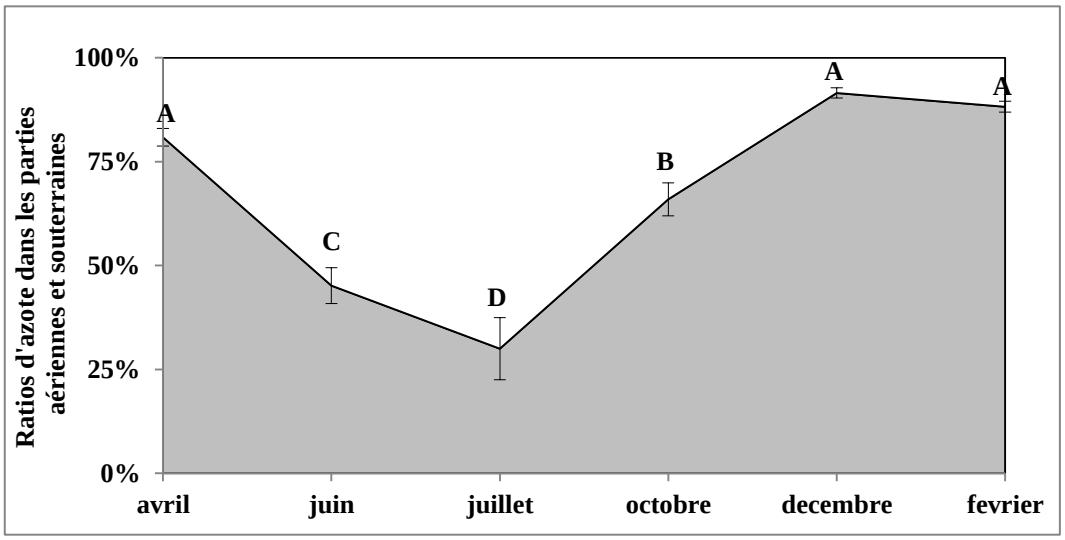



**Figure 2. Ratios d'azote contenu dans les parties souterraines et aériennes de *Miscanthus x giganteus* au cours du cycle de croissance**
L'aire grise représente les parties souterraines et l'aire blanche les parties aériennes. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur l'ensemble des données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes

Avec ce calcul, on constate tout d'abord que les tendances sont les mêmes que celles observées dans la figure 1. La proportion d'azote des parties souterraines diminue de manière significative d'avril à juillet (81% à 30%) puis augmente de manière significative de juillet à

décembre (30% à 92%). En parallèle, la quantité d'azote des parties aériennes suit la tendance inverse. En effet, elle augmente de manière significative d'avril à juillet (19% à 70%) puis diminue de manière significative de juillet à décembre (70% à 8%).

Cette représentation nous permet d'identifier clairement trois phases clés dans le métabolisme azoté de *Miscanthus x giganteus* :

- La phase avril-juillet ou la teneur en azote des parties aériennes est nettement inférieure à celle des parties souterraines. Le mois d'avril correspond à la période de croissance initiale des parties aériennes.
- La phase juillet-décembre ou la teneur en azote des parties aériennes est nettement supérieure à celle des parties souterraines. Le mois de juillet correspond au stade 10-12 feuilles ou période de croissance linéaire des parties aériennes.
- La phase décembre-avril ou la teneur en azote des parties aériennes est nettement inférieure à celle des parties souterraines. Le mois de décembre correspond à un stade de sénescence avancé des parties aériennes.

Ce sont sur ces trois phases clés que les analyses seront réalisées par la suite.

### II-3-2 Etude des teneurs et des quantités d'azote dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus*

Suite à la mise en évidence des trois phases clés du métabolisme azoté de *Miscanthus x giganteus*, des dosages d'azote dans chaque organe ont été effectués grâce à un analyseur élémentaire et à la méthode Dumas. Les résultats sont exprimés en teneurs d'azote (mg/g MS) ainsi qu'en proportions d'azote (% de l'azote total) (figure 3).

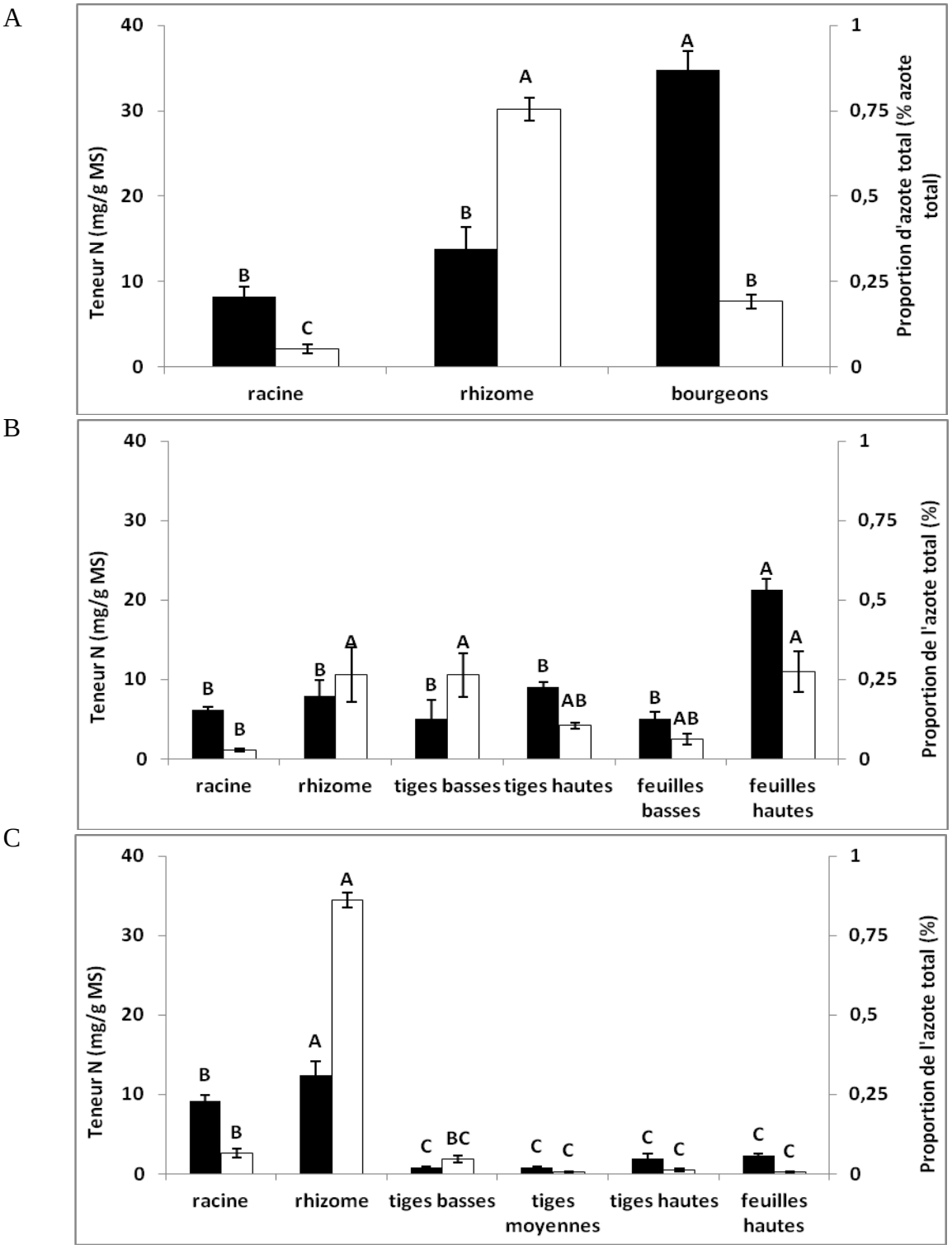



**Figure 3. Proportions d'azote (en % de l'azote total de la plante) et teneurs en azote (mg/g MS) contenues dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus***

A- avril, B- juillet, C- décembre

Les histogrammes noirs représentent les teneurs en azote de chaque organe et les histogrammes blancs les ratios d'azote par organe (par rapport à l'azote total de la plante). Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% pour les quantités et les teneurs en azote pour chaque date. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

- Avril

Pendant le mois d'avril, l'azote de la plante est contenu à 81% (± 2%) dans les organes souterrains, dont 76% dans les rhizomes (197 kg/ha). Les bourgeons, eux, contiennent environ 19% (± 2%) de l'azote de la plante (48 kg/ha) et les racines moins de 5% (13 kg/ha).

Alors que les bourgeons ne contiennent que 19% de l'azote total de la plante, leur teneur en azote par rapport à leur quantité de masse sèche est très importante (35 mg/g MS) et significativement supérieure à celles des rhizomes (14 mg/g MS) et des racines (8mg/g MS). Au final, il a été constaté que les bourgeons prélevés en avril sont les organes ayant la plus forte teneur en azote par quantité de masse sèche de tous les organes prélevés tout au long de l'année.

- Juillet

Les rhizomes, tiges basses et feuilles hautes sont les organes ayant la plus forte proportion d'azote (respectivement 26%, 26% et 28% de l'azote total de la plante) à cette période. Les organes contenant les plus petites proportions d'azote sont les racines (3%). Plus d'un quart de l'azote total de la plante se trouve dans les tiges basses malgré une teneur en azote totale relativement faible. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces organes représentent une forte biomasse.

En juillet, les organes ayant la plus forte teneur en azote sont les feuilles hautes (21 mg/g MS), leur teneur est deux fois plus élevée que celles des autres organes. Les feuilles basses (5 mg/g MS) présentent des teneurs en azote nettement inférieures à celles des feuilles hautes.

- Décembre

Les organes contenant les plus grandes quantités d'azote au mois de décembre sont les rhizomes avec 87% de l'azote total de la plante (243 kg/ha). Les racines, elles, contiennent 6,5% de l'azote de la plante soit deux fois plus qu'en juillet (18 kg/ha). En fin de cycle, il ne reste que peu d'azote dans les parties aériennes. En effet, les tiges basses, moyennes et hautes ainsi que les feuilles hautes ne représentent environ que 7,5% de l'azote total de la plante.

Les organes souterrains contiennent les plus fortes teneurs en azote à cette période. Les rhizomes et les racines présentent des teneurs respectives de 12,5 et 9 mg/g MS alors que les teneurs en azote des organes aériens sont inférieures à 2,5 mg/g MS. On constate que les rhizomes sont les principaux organes de stockage de l'azote de la plante durant l'hiver.

### II-3-3 Etude des teneurs en acides aminés et en protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus*

Après avoir défini les teneurs et les quantités d'azote présentes dans les différents organes, nous avons déterminé sous quelle forme se trouvait cet azote. Pour cela, des dosages d'acides aminés totaux et de protéines solubles ont été réalisés (Figure 4) aux trois dates clés de prélèvements.

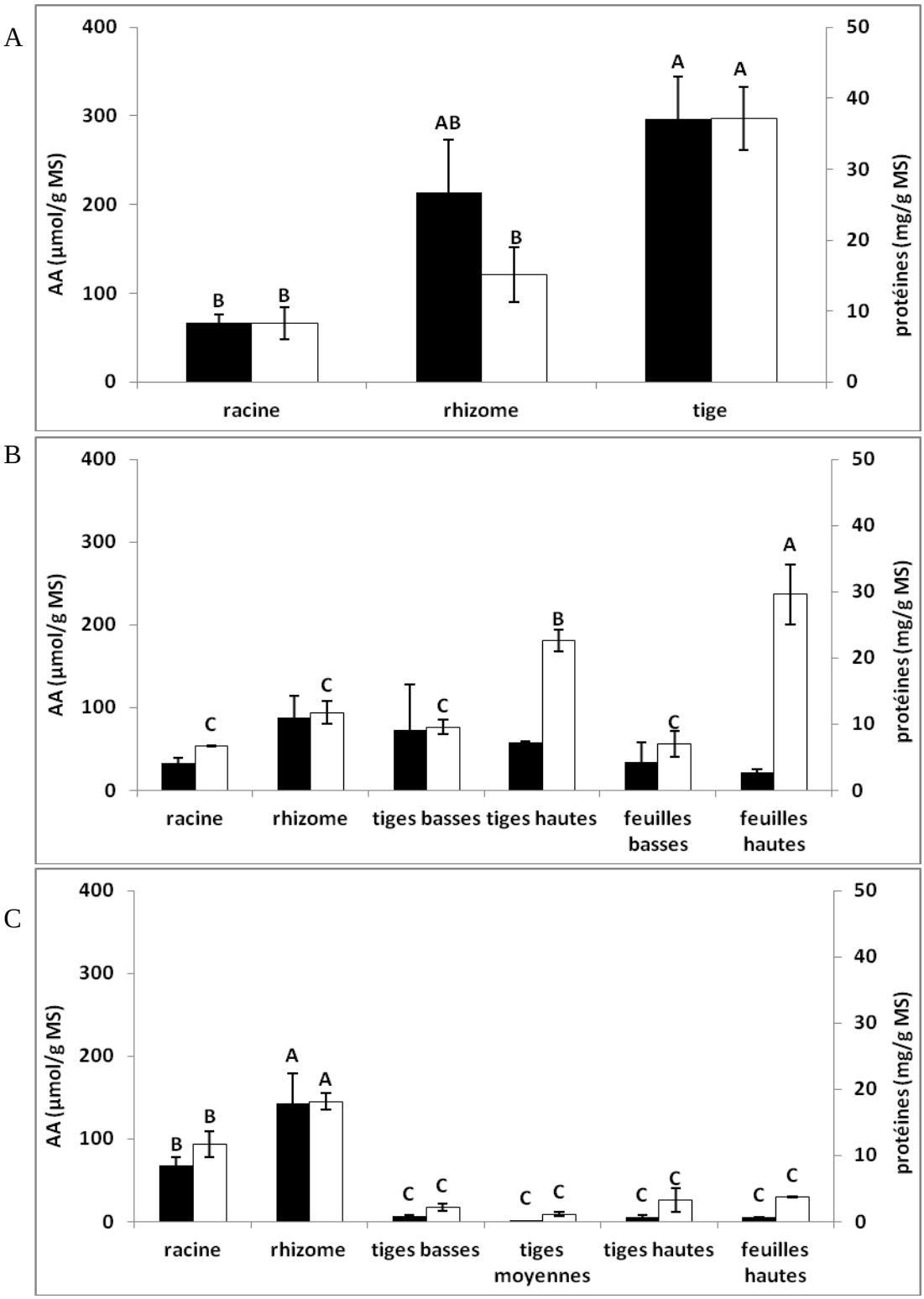



**Figure 4. Concentration en acides aminés et protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus***

A- avril, B- juillet, C- décembre

Les teneurs en acides aminés sont représentées en noir et les teneurs en protéines en blanc Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards..

Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur les teneurs en acides aminés ainsi que sur les teneurs en protéines pour chaque date. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

- Avril

A ce stade de développement, les rhizomes et les bourgeons sont très riches en acides aminés avec respectivement une teneur de 214 et de 296 µmol/g MS. Les racines, elles, ont une concentration plus faible, de l'ordre de 67 µmol/g MS.

Pour la teneur en protéines, les profils sont différents. Les bourgeons (37 mg/g MS) sont beaucoup plus riches en protéines solubles que les racines et les rhizomes (respectivement 8 et 15 mg/g MS).

Si on compare les deux résultats pour chaque type d'organe, on constate que par rapport aux racines et bourgeons, les rhizomes présentent un ratio acides aminés / protéines plus élevé.

- Juillet

En juillet, on ne constate pas de différences statistiquement significatives entre les teneurs en acides aminés des différents organes de la plante. Cependant, les rhizomes et les tiges semblent contenir des teneurs plus élevées en acides aminés que les racines et les feuilles.

Pour les protéines les organes contenant les plus fortes concentrations sont les feuilles hautes et basses avec respectivement 30 mg/g MS et 23 mg/g MS. Les teneurs en protéines dans les autres organes, sont nettement inférieures et comprises entre 7 et 12 mg/g MS.

- Décembre

En décembre, toutes les parties aériennes présentent des concentrations faibles en acides aminés (moins de 8 µmol/g MS). Pour cette date, les parties souterraines présentent les plus fortes concentrations. Le rhizome est l'organe statistiquement le plus riche en acides aminés avec 143 µmol/g MS, suivi par les racines (68 µmol/g MS).

Les organes aériens des plantes prélevées en décembre présentent des concentrations en protéines très inférieures de celles mesurées en juillet (moins de 4 mg/g MS. Comme pour les acides aminés, les organes avec les plus fortes teneurs en protéines sont les rhizomes (18 mg/g MS) suivis par les racines (12 mg/g MS).

Si l'on compare les trois stades, il apparaît que les teneurs en acides aminés sont maximales dans les parties souterraines en décembre et que les teneurs en protéines sont maximales dans les parties aériennes en juillet. En début et en fin de cycle, les teneurs en protéines solubles et acides aminés libres sont les plus importantes dans les racines et les rhizomes. En milieu de cycle, les parties aériennes de la plante (notamment les tiges hautes et feuilles hautes) contiennent des teneurs en azote et en protéines solubles importantes mais des teneurs en acides aminés solubles assez faibles. La majorité de l'azote des parties aériennes seraient donc sous forme de protéines solubles alors qu'assez peu d'acides aminés seraient présents.

### II-3-4 Relations entre les teneurs en azote et les acides aminés et entre les teneurs en azote et en protéines dans les organes de *Miscanthus x giganteus*

Par des droites de régression, nous avons étudié les relations entre les teneurs en azote et les acides aminés (figure 5-A) d'une part, et entre les teneurs en azote et les protéines (figure 5-B) d'autre part. Elles ont été réalisées sur les quatre organes principaux de *Miscanthus x giganteus* : les tiges, les feuilles les racines et les rhizomes sur l'ensemble des prélèvements réalisés en avril, juillet, octobre, décembre et février.

- Relations azote-protéines

Les relations teneurs en azote / teneurs en protéines pour chaque organe sont statistiquement significatives avec une probabilité de 5%. Les plus faibles relations entre teneur en azote et teneur en protéines sont observées pour les organes souterrains (racines : r = 0,61 ; rhizomes : r = 0,63). De même c'est au niveau de ces organes que l'on trouve les pentes les plus faibles (racines : 1,02 ; rhizomes : 0,72).

Si on s'intéresse aux tiges et aux feuilles, on constate que les coefficients de détermination sont respectivement de 0,95 et 0,98. Ceci indique qu'il y a au niveau de ces organes une relation très forte entre l'azote et les protéines solubles. Les pentes de régression associées à ces deux organes (1,32 et 1,60, respectivement) sont 1,5 à 3 fois plus importantes que celles observées pour les parties souterraines. Ceci signifie que lorsque les teneurs en azote augmentent, les teneurs en protéines vont augmenter davantage dans les tiges et les feuilles que dans les parties souterraines.

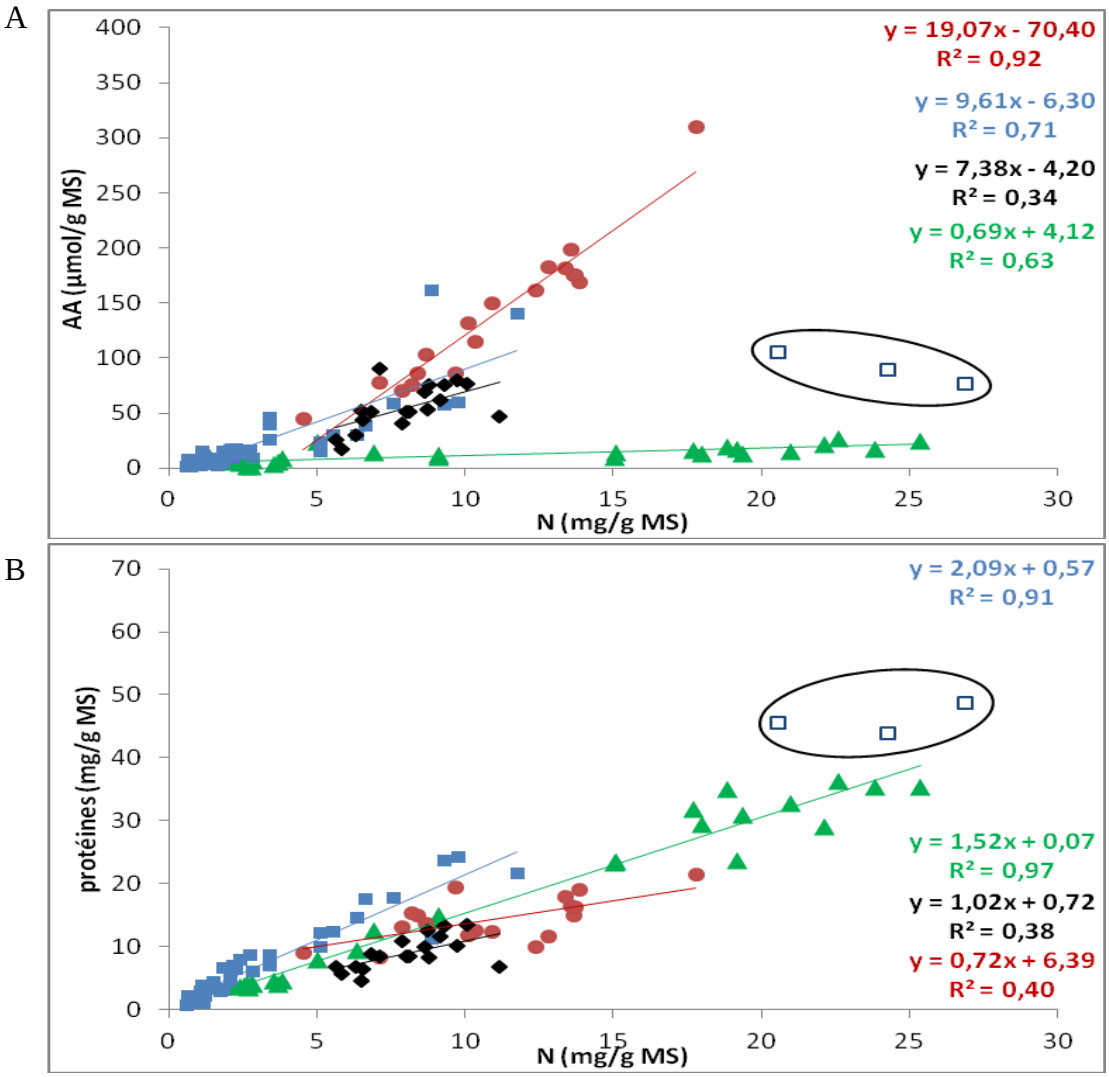



**Figure 5. Relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en acides aminés ou les teneurs en protéines dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus***

A- relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en acides aminés, B- relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en protéines

Différents organes de *Miscanthus x giganteus* sont étudiés pour les plantes cultivées en condition N1.

Les losanges noirs représentent les racines, les points rouges les rhizomes, les triangles verts les feuilles, les carrés blancs les tiges hautes de juin et les carrés bleu le reste des tiges. Chaque série (hormis les tiges hautes de juin) possède une droite de régression linéaire caractérisée par une équation de droite et un coefficient de détermination ($R^2$). Elles sont représentées de la même couleur que les marqueurs de la série.

- Relations azote-acides aminés

Comme pour les relations entre les teneurs en azote / teneurs en protéines, les relations teneurs en azote / teneurs en acides aminés pour chaque organe sont statistiquement significatives avec une probabilité de 5%.

Les rhizomes sont les organes qui présentent la plus forte relations entre les teneurs en azote et les teneurs en acides aminés (r = 0,96). Les coefficients de détermination pour les tiges et les feuilles sont plus faibles, 0,84 et 0,79 respectivement. Les racines sont les organes présentant la relation la plus faible entre ces teneurs (r = 0,58).

La pente de la droite de régression associée aux rhizomes (19,07) est beaucoup plus importante que celle des autres organes, tiges, racines et feuilles (9,61 ; 7,38 ; 0,69 respectivement). Cela signifie donc que lorsque les teneurs en azote dans les différentes parties augmentent, les teneurs en acides aminés vont augmenter davantage dans les rhizomes que dans les autres organes.

Si on observe la répartition des échantillons sur le graphique, on constate que les feuilles sont les organes qui peuvent contenir les teneurs en azote les plus fortes. Néanmoins dans ces organes, lorsque la teneur en azote augmente fortement, la teneur en acide aminé, elle, varie peu.

- Régressions multiples standardisées

Suite à l'étude de ces régressions, des régressions multiples sur les valeurs centrées réduites de chaque variable ont été réalisées (tableau 1) afin de déterminer le « poids » des variables acides aminés et protéines sur la variation de l'azote total.

**Tableau 1. Données des régressions multiples standardisées**

| Organes | R2 modèle | Coefficient β acides | Coefficient β protéines |
|---|---|---|---|
| Racine | 42,5% | 0,37 | 0,38 |
| Rhizome | 84% | 0,87 | 0,16 |
| Tiges | 97,4% | 0,36 | 0,73 |
| Feuilles | 97,3% | 0.02 | 0,96 |
| bourgeons | 87% | 0,93 | - |

La détermination du $R^2$ permet d'indiquer la proportion de la variance de l'azote expliquée par les variables teneurs en acides aminés et en protéines. Les $R^2$ sont très importants au niveau des feuilles (0,97), tiges (0,97), bourgeons (0,87), rhizomes (0,84) mais pas des racines (0,42).

Le coefficient β associé à chaque variable indépendante (acides aminés et protéines) représente la variation de l'azote lorsque la variable indépendante varie d'une unité, alors que les autres variables dans l'équation demeurent constantes. On conclut donc que dans les rhizomes, 84% de la variation de l'azote est expliquée par les acides aminés et les protéines. Le coefficient β montre que cette variation est davantage due à la variation en acides aminés (0,87) qu'à la variation en protéines (0,14).

Au niveau des bourgeons, ce sont les variations en acides aminés qui influencent les variations d'azote total. Dans les feuilles ce sont les variations des teneurs en protéines qui expliquent quasiment intégralement la variation de l'azote total.

Dans les tiges, on voit que le $R^2$ est très fort (97,4%). Dans ce cas, les variations des teneurs en azote sont deux fois plus influencées par les protéines (0,71) que par les acides aminés (0,36).

Enfin, pour les racines, les acides aminés et les protéines n'expliquent que 42,5% de la variation de l'azote dans les racines. De plus, aucune différence n'est observée entre les deux coefficients β de cette variable.

Les études de régressions et de régressions multiples standardisées nous indiquent que les variations des teneurs en azote dans les feuilles et les tiges sont majoritairement dues aux variations des protéines solubles alors que dans les rhizomes elles sont majoritairement dues aux variations des acides aminés solubles.

### II-3-5 Dosages des acides aminés individuels dans les rhizomes de *Miscanthus x giganteus*

Les précédents résultats ont montré que les rhizomes sont des organes pouvant contenir plus de 85% de l'azote total de la plante (figure 3-C) et les modifications des teneurs en azote de cet organe sont fortement corrélées aux teneurs en acides aminés (figure 5-A). Des dosages d'acides aminés individuels ont donc été réalisés par HPLC sur les rhizomes à différentes dates de prélèvement (figures 6 et 7) afin de déterminer les principaux acides aminés de stockage.

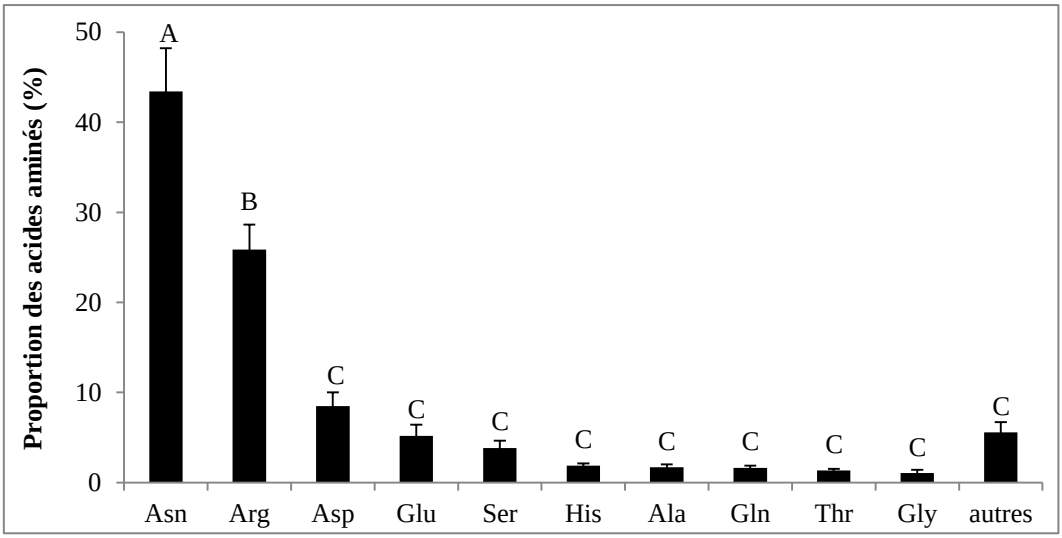



**Figure 6. Proportions des principaux acides aminés dans les rhizomes des plantes de *Miscanthus x giganteus* en fin de cycle.**
Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5%. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes

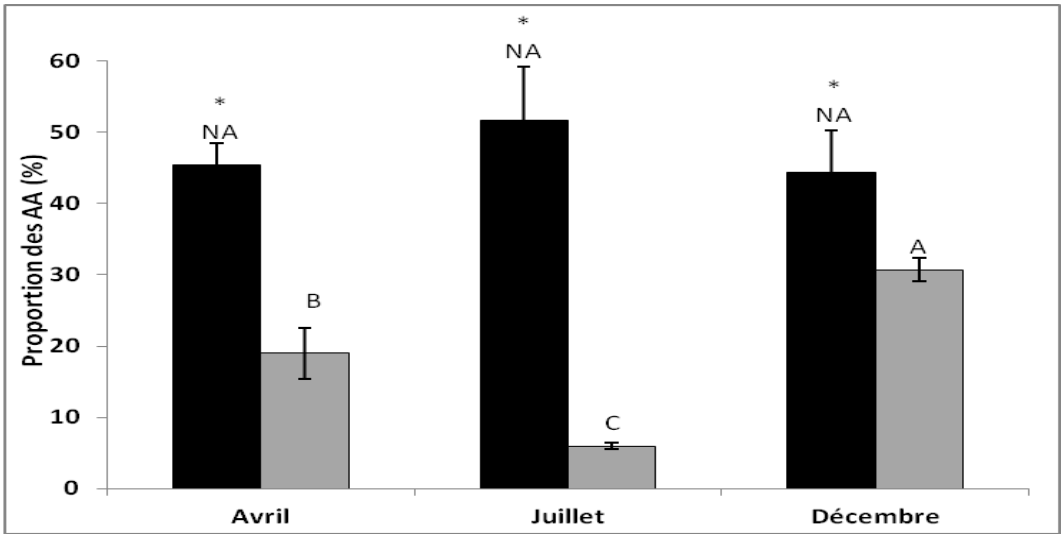



**Figure 7. Proportion de l'arginine et de l'asparagine par rapport à l'ensemble des acides aminés des rhizomes pour les mois d'avril, juillet et décembre.**
Les histogrammes noirs représentent les proportions de l'asparagine et les histogrammes gris les proportions de l'arginine. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée pour chaque acide aminé ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5%. Les moyennes avec une lettre commune (ou NA) ne sont pas considérées comme statistiquement différentes. Des tests de student ont été réalisés pour comparer les proportions d'asparagine et d'arginine pour chaque date avec une probabilité de 5% (*).

En fin de cycle (décembre et février), deux acides aminés représentent à eux seuls 70% des acides aminés des rhizomes (Figure 6). La plus grande proportion de l'azote des acides aminés des rhizomes est, de manière significative, l'asparagine (43%). Le deuxième acide aminé le plus important est l'arginine qui représente lui environ 26% des acides aminés. Ceci montre qu'avant sa phase de dormance, la plante accumule de l'asparagine et de l'arginine dans ses rhizomes.

Les rhizomes montrant de grandes variations des teneurs en azote entre le début, le milieu et la fin de cycle, nous nous sommes donc intéressés aux variations de ces deux acides aminés dans les rhizomes en avril, juillet et décembre (figure 7).

Proportionnellement, l'asparagine est toujours plus importante que l'arginine aux trois dates de prélèvement (figure 7). L'asparagine représente 44 à 52% des acides aminés et la proportion d'asparagine évolue peu entre avril, juillet et décembre. En revanche, les ratios arginine / asparagine varient de manière très importante et significative entre avril, juillet et décembre. Ces résultats indiquent que la mobilisation des acides aminés observée entre juin et juillet dans les rhizomes affecte prioritairement le pool d'arginine. De même, c'est ce pool d'arginine qui bénéficie de la remobilisation depuis les parties aériennes vers les rhizomes entre juillet et décembre. Cependant, avec cette représentation, on ne tient pas compte des variations des quantités d'acides aminés totaux dans les rhizomes entre ces 3 périodes. Même si la proportion d'asparagine ne varie pas au cours du cycle, cela ne veut pas dire qu'il n'est pas remobilisé. En effet, la proportion ne varie pas mais la concentration en acides aminés libres totaux diminue (figure 4), donc les concentrations d'asparagine diminuent également.

A partir des concentrations en acides aminés individuels et du nombre de molécules d'azote contenues par acide aminé, les concentrations en azote contenu sous forme d'acides aminés libres ont pu être calculées. Il y a une relation forte ($r = 0.98$) (et statistiquement significative avec une probabilité de 5%) entre les concentrations en azote total et les concentrations en azote contenu dans les acides aminés libres (figure 8). L'équation de droite de régression linéaire ($y = 0.61x – 2.55$) nous permet de déduire que pour les teneurs en azote les plus faibles (inférieures à 9 mg/g MS), les acides aminés contiennent moins de 2,94 mg d'azote/g MS soit environ 33% de l'azote du rhizome. Pour les concentrations en azote supérieures à 18 mg/g MS, 8.4 mg d'azote/mg de MS est contenu sous forme d'acides aminés soit plus de 47%.

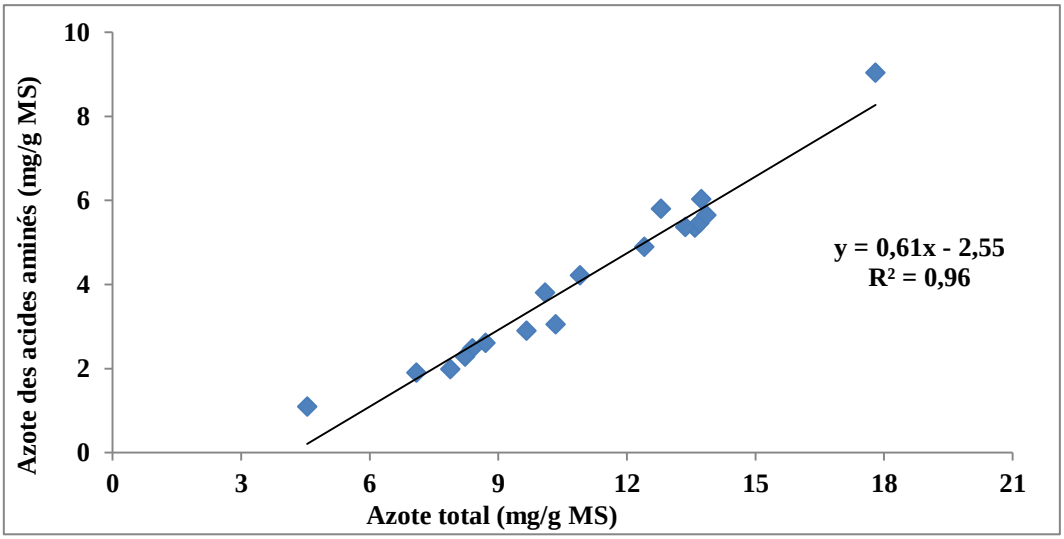



**Figure 8. Relations entre les teneurs en azote total et les teneurs en azote des acides aminés dans les différents rhizomes de *Miscanthus x giganteus*.**
La droite de régression linéaire caractérisée par une équation de droite et un coefficient de détermination ($R^2$)

II-3-6 Dosage des ions nitrate et ammonium chez *Miscanthus x giganteus*

En dehors des acides aminés et des protéines, l'azote dans les plantes peut également exister sous forme ionique (principalement nitrate et ammonium). Des dosages de ces ions ont été effectués tout au long du cycle de croissance sur la plante entière.

Pour les plantes cultivées en condition N1 (sans apport d'azote), les concentrations en nitrate et ammonium sont faibles et statistiquement identiques tout au long du cycle de développement de la plante avec un maximum de 8 kg/ha atteint en juin (figure 9). Dès juillet, les quantités d'ions diminuent légèrement et sont inférieures à 2 kg/ha en février. Ces résultats laissent supposer qu'en condition de culture standard, la plante accumule peu d'azote sous forme ionique.

Pour étudier l'effet d'un apport d'engrais azoté sur le métabolisme de l'azote de la plante, des dosages ont été réalisés sur des plantes cultivées avec un apport d'azote (N2 = 120 unités d'azote) réalisé après le prélèvement d'avril (figure 9).

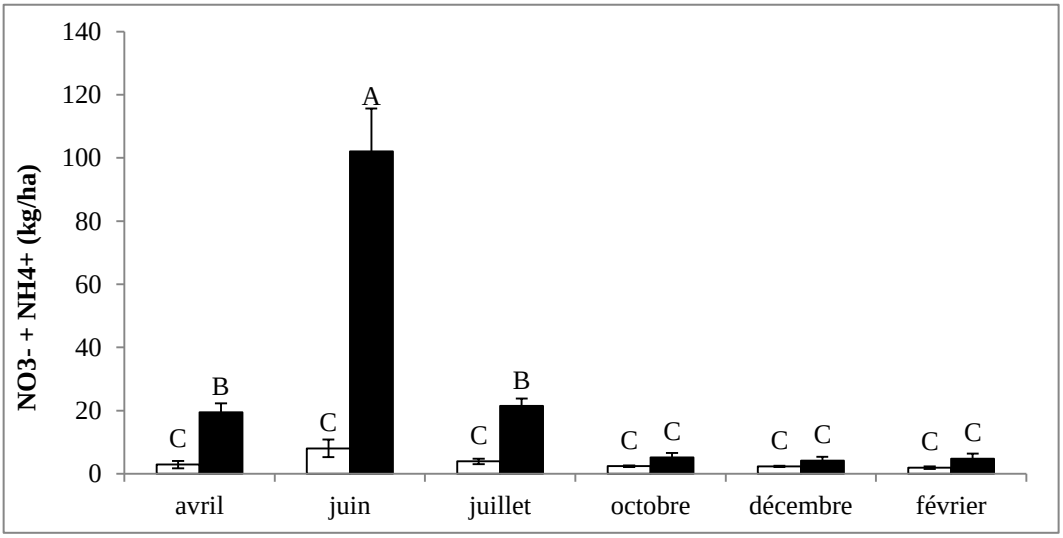



**Figure 9. Dosage des ions nitrates et ammonium (kg/ha) dans les plantes entières de *Miscanthus x giganteus* en conditions N1 et N2 au cours de l'année.**
Les quantités d'ions des plantes cultivées en condition N1 sont représentées en blanc et celles des plantes cultivées en condition N2 en noir. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur l'ensemble des données en conditions N1 et N2. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

L'apport d'engrais azoté semble modifier significativement l'accumulation des ions nitrate et ammonium dans la plante. En effet, de plus fortes quantités d'azote minéral sont retrouvées dans les plantes cultivées en condition N2 tout au long du cycle de développement de la plante. On constate notamment dès le début du cycle une accumulation d'environ 20 kg de nitrate et d'ammonium par hectare en avril. La quantité d'ions va ensuite augmenter fortement en juin avec un maximum observé d'environ 102 kg/ha. En juillet, malgré une baisse notable de la teneur en ions, celle-ci reste relativement élevée avec une quantité de 21,5 kg/ha. Après juillet, les concentrations en ions dans les plantes N2 sont assez basses, semblables à celles des plantes cultivées en N1 (inférieures à 6 kg/ha).

Les résultats précédents nous ont montré que la plante accumule le plus d'azote minéral au mois de juin suite à un apport d'engrais azoté (condition N2). Il semble donc intéressant d'observer dans quels organes sont accumulés majoritairement ces ions à cette période (figure 10). Les quantités de nitrates et d'ammonium les plus importantes sont observées dans les tiges basses (47 kg/ha) et les rhizomes (33 kg/ha). Les quantités de nitrate contenues dans les feuilles basses et hautes sont les plus faibles (inférieures à 900 g/ha) bien que non différentes significativement de celles des tiges hautes (12 kg/ha) et des racines (5,5

kg/ha). De manière générale, les quantités d'ammonium sont beaucoup plus faibles que les quantités de nitrate. Comme pour ces derniers, les plus fortes accumulations d'ammonium sont observées dans tiges basses et les rhizomes (environ 800 g/ha). Les autres organes présentent des quantités inférieures à 400 g/ha. La forte accumulation de ces ions au mois de juin serait donc principalement due à une forte concentration en nitrate dans les rhizomes et les tiges basses.

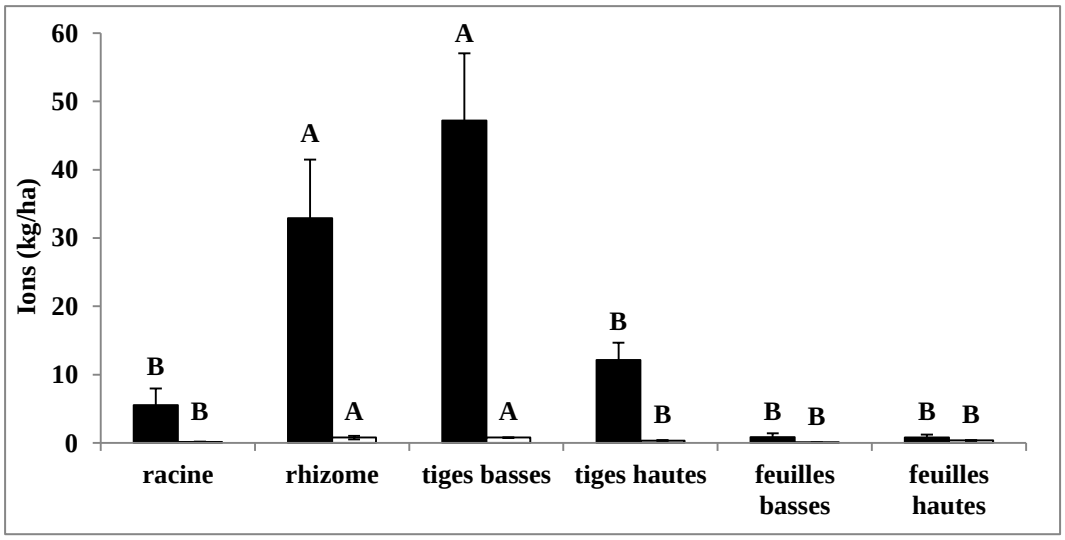



**Figure 10. Dosage des ions nitrate et ammonium dans les différents organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 au mois de juin.**
Les quantités de nitrate sont représentées en noir et les quantités d'ammonium en blanc. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Pour chaque ion (nitrate et ammonium), une anova ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% ont été réalisés pour le nitrate et pour l'ammonium. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

### II-3-7 Etude des teneurs et des flux d'azote $^{15}N$ dans les plantes de *Miscanthus x giganteus* cultivées en condition N2

Des variations de la teneur en azote $^{15}N$ sont observées entre le mois d'avril et la fin du cycle en condition N2. Tout d'abord, au mois d'avril, il n'y a pas de différence significative avec les plantes cultivées en conditions N1 et les plantes cultivées en condition N2. Ensuite, une forte hausse des quantités de $^{15}N$ dans les plantes est observée dès le mois de juin. Puis de juin à février, aucune différence significative n'est observée dans les plantes cultivées en condition N2, suggérant qu'il n'y a donc pas eu de perte d'azote marqué absorbé.

Suite à ces premiers résultats globaux, nous avons cherché à suivre les proportions d'azote marqué (en % de l'azote marqué total de la plante) contenues dans les différents organes de chaque plante prélevée après l'apport d'azote marqué (de juin à février) en condition N2 (figure 11-B).

Tout d'abord, on constate qu'en juin, les parties hautes contiennent environ 70% de l'azote marqué de la plante alors qu'en février leur teneur se limite à moins de 12,5%.

- Racines

Les quantités d'azote marqué contenues dans les racines sont assez faibles en début de cycle. On constate ensuite une diminution légère de juin à juillet puis une augmentation continue jusqu'en fin d'année. En fin de cycle (février), les quantités d'azote marqué dans les racines sont significativement supérieures à celles de juillet. De plus, en février, celles-ci contiennent pratiquement autant d'azote marqué que les tiges basses.

- Rhizomes

En juin, les rhizomes contiennent 29% de l'azote marqué de la plante. Une légère diminution du taux d'azote marqué est observée entre juin et juillet suivie d'une hausse significative jusqu'à la fin de l'année. A partir du mois d'octobre et jusqu'à février les rhizomes sont les organes contenant le plus d'azote marqué (55% et 81%, respectivement).

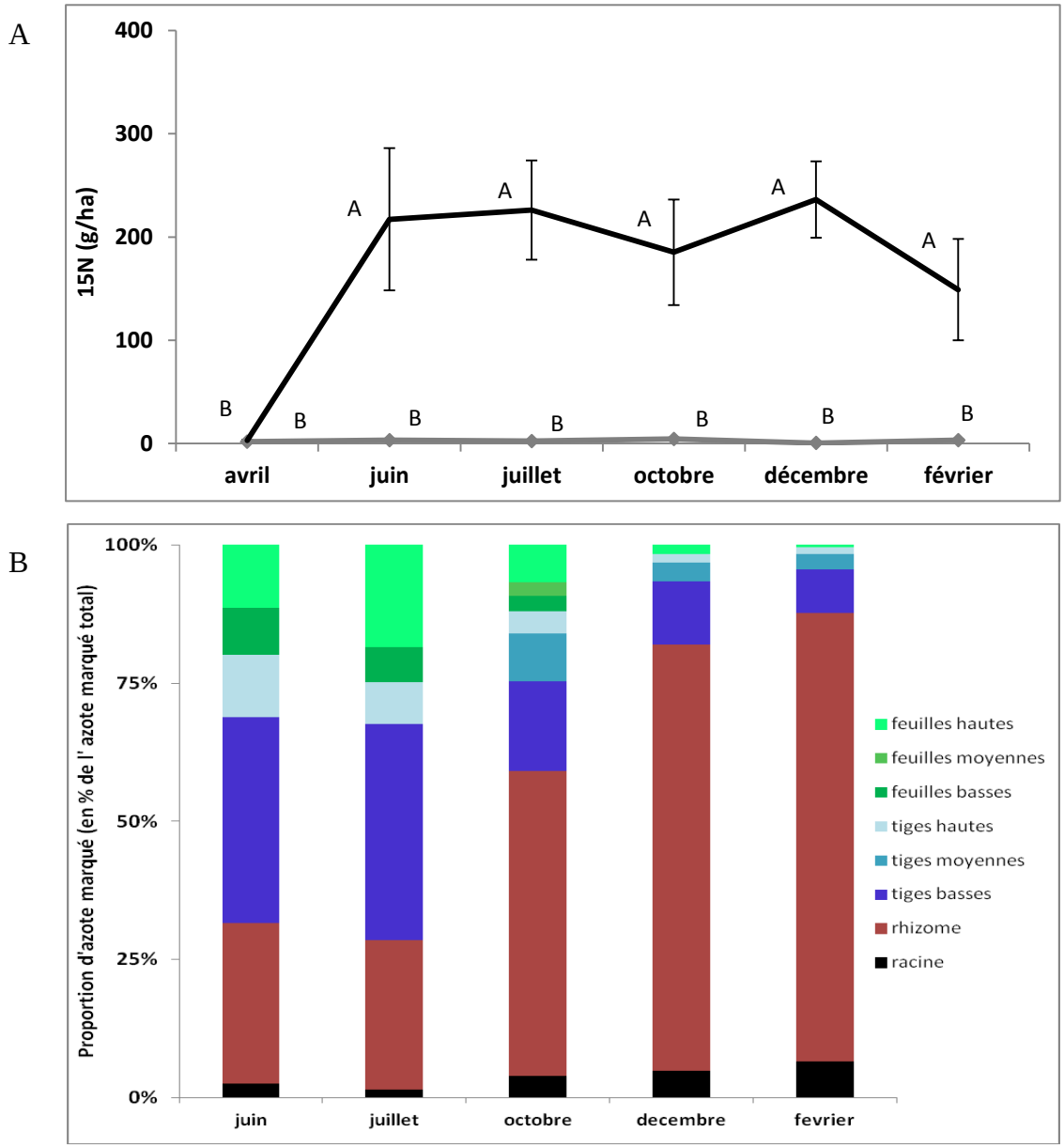



**Figure 11. Evolution des quantités d'azote marqué ($^{15}N$) dans les plantes de *Miscanthus x giganteus* ayant subi ou non un apport d'azote marqué $^{15}N$ en avril**

A- Evolution de la quantité d'azote marqué entre les plantes ayant reçu ou non un apport d'azote marqué

La courbe noire représente les plantes ayant reçu un apport marqué $^{15}N$ en avril, la courbe grise les plantes n'ayant pas reçu d'apport d'azote. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards. Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls sur l'ensemble des données avec une probabilité de 5%. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

B- Proportions d'azote marqué par organe.

Les histogrammes cumulés représentent les ratios des quantités d'azote marqué 15N par organe (par rapport à l'azote 15N total de la plante).

- Tiges basses

En juin, les tiges basses sont, avec les rhizomes, les organes qui contiennent les plus grandes quantités d'azote marqué (37%). Les quantités de $^{15}N$ augmentent légèrement en juillet faisant de celles-ci les organes les plus riches. De juillet à octobre, les quantités d'azote marqué diminuent de manière significative puis faiblement jusqu'en février.

- Tiges hautes

Environ 11% de l'azote marqué est contenu dans les tiges hautes en juin. La quantité d'azote marqué diminue de manière significative de juin à juillet et de juillet à octobre puis faiblement jusqu'en février ou elle est inférieure à 1,5%.

- Feuilles hautes

En juin, les feuilles hautes contiennent autant d'azote que les tiges hautes (11,5%). Cette proportion augmente en juillet (18,5%) faisant des feuilles hautes le troisième organe le plus riche après les tiges basses et les rhizomes puis diminue progressivement jusqu'en février (0,5%).

- Autres organes

Les autres organes (feuilles basses, feuilles moyennes et tiges moyennes) contiennent peu d'azote marqué (moins de 9%) et leurs proportions diminuent tout au long du cycle.

Plus de 70% de l'azote marqué absorbé entre avril et juin se retrouve dans les parties aériennes de la plante en juillet, principalement dans les tiges basses (39%) et les feuilles hautes (18,5%). Après le mois de juillet, l'azote marqué des parties aériennes est fortement remobilisé, majoritairement vers le rhizome et légèrement vers les racines.

## II-4 Discussion

Les différents résultats obtenus lors de cette étude nous ont permis d'identifier les mois d'avril, juillet et décembre comme les dates clés de la remobilisation printanière et automnale chez *Miscanthus x giganteus*. En fonction de ces différentes périodes du cycle de la plante, les formes de stockage de l'azote évoluent. Selon les organes et la période, l'azote peut se trouver soit majoritairement sous forme d'acides aminés libres, comme dans le rhizome. IL peut également se trouver majoritairement sous formes de protéines, comme dans les tiges et les feuilles.

### II-4-1 Remobilisation printanière et automnale de l'azote

La définition du stockage de l'azote par les plantes a été établie par Millard (1988). Il considère l'azote comme étant stocké s'il peut être remobilisé d'un tissu pour la croissance d'un autre. La consommation de luxe d'azote conduit, elle, à sa séquestration (sans réutilisation ultérieure). Selon Millard *et al.* (2001), la remobilisation de l'azote est saisonnière, programmée et dépend de la quantité d'azote en réserve. Elle ne découle pas de l'intensité de la nouvelle croissance ou de la quantité d'azote absorbée. Selon Avice *et al.* (1996), la formation de réserve aurait seulement tendance à se produire lorsque la vitesse de croissance de la plante est faible. Cela peut se retrouver, par exemple, à l'automne ou lorsque la croissance est limitée par la disponibilité d'une autre ressource. Nos résultats suggèrent, dans un premier temps, une remobilisation printanière de l'azote des parties souterraines (racines et rhizomes) d'au moins 50% vers les parties aériennes (tiges et feuilles) entre le printemps et l'été, moment où la plante est en période de croissance maximale. Ces résultats correspondent à ceux déjà observés chez différentes plantes pérennes comme le pommier (Neilsen *et al.*, 2001 ; Cheng et Fuchigami, 2002), le poirier (Sanchez *et al.*, 1991), ou le noyer (Weinbaum et Kessel, 1998) où 50% de l'azote total de l'arbre est remobilisé pour soutenir la croissance l'année suivante.

Après l'été, nos résultats montrent que le phénomène inverse est observé : la plante remobilise l'azote vers la partie souterraine. Elle stocke de grandes quantités d'azote (jusqu'à 92% de l'azote total de la plante) dans ces parties souterraines en fin de cycle. C'est le rhizome qui est l'organe souterrain de stockage principal avec 86% de l'azote total de la plante contre seulement 6% pour les racines. Une accumulation d'azote dans les organes souterrains d'autres plantes rhizomateuses (*Phragmites australis, Glyceria maxima)* a

également été observée avant le début de la dormance hivernale (Tylová *et al*., 2008). Le stockage est souvent consacré à l'augmentation de l'offre de ressources supplémentaires, en plus de la capacité d'absorption, pendant les périodes de croissance rapide (par exemple au printemps) ou, dans le cas de certaines espèces fourragères, après la défoliation (Avice *et al*., 1996).

Le phénomène de remobilisation printanière et automnale est un phénomène connu qui a déjà été démontré chez de nombreuses plantes. Par exemple, chez les céréales, un recyclage massif de l'azote a lieu lors du passage de la phase végétative à la phase reproductive (Peoples et Dalling, 1988). Chez les plantes vivaces, cette remobilisation des organes sources vers les organes puits a été observée lors de la sénescence. Cela va permettre de stocker de l'azote sous forme organique qui pourra être ensuite réutilisé au printemps, lors de la reprise de végétation (Guiboileau *et al*., 2010). Pour les arbres à feuilles caduques (comme le peuplier), l'azote est remobilisé à partir des feuilles sénescentes en automne pour être stocké dans les tiges, les troncs et/ou les racines pendant l'hiver. Cet azote pourra ensuite être remobilisé une seconde fois à partir des organes pérennes *via* le xylème vers les organes en développement au printemps. Tout ceci se déroule avant que l'absorption d'azote racinaire ne devienne le principal processus pour répondre aux besoins en azote des arbres. (Millard *et al*., 2006 ; Millard *et al*., 2007 ; Millard et Grelet, 2010).

Ces résultats démontrent donc une remobilisation printanière et remobilisation automnale de l'azote entre les parties souterraines et aériennes chez miscanthus et confirment les résultats obtenus précédemment par Beale et Long (1997) et Strullu *et al*. (2011). Cependant aucune étude n'avait encore mis en évidence la compartimentation entre les différents organes ni les formes sous lesquelles était présent cet azote lors de ces différentes phases de remobilisation.

### II-4-2 Formes de l'azote chez *Miscanthus x giganteus*

L'azote est un constituant que l'on retrouve majoritairement dans trois grandes classes de composés végétaux : l'azote inorganique (nitrate et ammonium), les acides aminés libres et les protéines (Millard, 1988).

- Azote inorganique

Chez de nombreuses espèces comme les céréales ou l'oseille, l'azote peut être stocké sous forme de nitrate (Gebauer *et al.,* 1984 ; Yoneyama, 1991 ; Stewart *et al.,* 1993). Nos résultats montrent que les concentrations en nitrate et ammonium mesurées dans les plantes cultivées en condition N1 sont faibles tout au long de l'année. Le maximum est atteint en juin avec de 8 kg/ha et les teneurs en ces ions sont inférieures à 2kg/ha en fin de cycle. Sans apport exogène d'azote, le miscanthus ne stocke donc pratiquement pas d'azote sous forme inorganique.

- Protéines

Une autre forme de stockage possible de l'azote est un stockage sous forme de protéines. Ces protéines peuvent être de type VSP (vegetative storage proteins) qui sont considérées comme la forme de stockage la plus fréquente de l'azote dans les tissus végétatifs (Staswick, 1994 ; Stepien *et al.,* 1994). Chez les espèces pérennes, on peut trouver de l'azote stocké sous forme de VSP dans les racines et les tubercules, dans le bois et le parenchyme de l'écorce des arbres ainsi que dans d'autres organes végétatifs (Müntz, 1998). Ces VSP peuvent constituer jusqu'à 50 à 60% des protéines solubles chez la luzerne (Dhont *et al*., 2006) et sont généralement contenues dans de petites vacuoles membranaires. Les différents types de régressions nous indiquent que les variations des teneurs en azote dans les rhizomes ne sont pas majoritairement dues aux protéines solubles. De plus, dans les études cytologiques réalisées sur les différents organes de la plante (souterrains et aériens) au cours de l'année, aucune structure classique de VSP dans des corps protéiniques n'a été découverte (cf figure 7 § I-3-2 pp 104). Ces résultats tendent à prouver que le miscanthus ne stocke pas d'azote sous forme de VSP dans les rhizomes durant l'hiver.

Cependant les organes présentent de teneurs en protéines solubles plus ou moins fortes au cours de l'année. En effet, les plus fortes teneurs en protéines solubles dans le miscanthus ont été trouvées dans les organes aériens jeunes (tiges hautes mais surtout feuilles hautes).

Ces tissus jeunes, notamment les tiges hautes sont des tissus méristématiques en pleines croissance. Ils sont donc métaboliquement très actifs ce qui implique un grand nombre protéines (comme des enzymes ou des ribosomes).

Pour les feuilles, on sait que celles-ci nécessitent une grande quantité de protéines pour la photosynthèse. En effet, chez les plantes en C4 à métabolisme NADP-ME, la majorité de l'azote des feuilles se trouve dans les protéines solubles (41% dont 5% de rubisco) et les thylakoïdes (environ 30%) (Ghannoum *et al.*, 2005). Il y a une forte corrélation entre la capacité photosynthétique et la teneur en azote dans les feuilles (Hikosaka, 2005). Selon la définition de Chapin *et al.* (1990), la rubisco peut être considérée comme une VSP. En effet, elle stocke de l'azote pendant les périodes de croissance active puis se décompose lors de la sénescence des feuilles. Les acides aminés libérés sont ensuite utilisés pour la biosynthèse de nouvelles protéines et d'autres processus métaboliques. Par ailleurs, certains organes photosynthétiques contiennent plus de rubisco que nécessaire pour l'assimilation du carbone, comme chez le tabac ou le pin (Millard et Grelet, 2010).

En fin de cycle, les tiges et les feuilles de miscanthus vont voir leurs quantités d'azote et de protéines solubles diminuer. Il a été démontré que les protéines foliaires et en particulier les protéines photosynthétiques des plastes sont largement dégradées au cours de la sénescence, offrant une énorme source d'azote que les plantes peuvent puiser pour compléter l'alimentation des organes en croissance (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Dans les tiges, le phénomène de remobilisation de l'azote a également été observé chez différentes espèces. Il pourrait même être la principale source d'azote du grain chez le maïs (Morot-Gaudry, 1997). De très fortes relations entre les teneurs en azote et en protéines solubles sont observées dans ces organes. Les différentes études de régressions démontrent que les variations d'azote sont expliquées majoritairement par les variations en protéines solubles. Les tiges et les feuilles de *Miscanthus x giganteus* contiennent donc de grandes quantités d'azote sous forme protéiques qui seront ensuite remobilisées en fin de cycle vers les parties souterraines.

Les rhizomes de *Miscanthus x giganteus* contiennent des teneurs en protéines de l'ordre de 12 à 18 mg/g MS. Les plus fortes teneurs en protéines solubles y sont observées en fin de cycle et diminuent durant la phase de croissance des parties aériennes. On pourrait donc en conclure que le *Miscanthus x giganteus* stockerait de l'azote sous forme de protéines solubles dans ses rhizomes et en remobiliserait une partie au printemps. Cependant, les relations entre l'azote et les protéines solubles observées dans les rhizomes sont moins fortes que dans les tiges et les feuilles. L'étude des régressions multiples standardisées montre que les variations des teneurs en azote dans les rhizomes dépendent moins des variations en

protéines solubles que les organes aériens. Les protéines solubles ne semblent donc pas être la forme de stockage de l'azote dans les rhizomes de *Miscanthus x giganteus*.

- Acides aminés

Plusieurs études ont montré l'importance des acides aminés libres notamment pour le stockage de l'azote dans les parties souterraines de plantes herbacées et rhizomateuses comme l'ortie, la myrtille ou la linaigrette ou ils peuvent représenter jusqu'à 20% de l'azote durant l'hiver (Rosnitschek-Schimmel, 1985 ; Sagisaka, 1987 ; Lähdesmäki *et al*., 1990 ; Nordin et Näsholm, 1997). De fortes variations saisonnières des teneurs en acides aminés (comparé aux teneurs en protéines) et une relation étroite entre la baisse des acides aminés et la repousse ont permis aux auteurs de conclure que les acides aminés sont les principaux composés de stockage de l'azote. Le contenu en acides aminés dans les organes pérennes augmente généralement en fin d'automne et reste élevée jusqu'à la fin du printemps chez ce type de plante (Volenec *et al.*, 1996). Le stockage de l'azote sous cette forme présente des avantages par rapport à un stockage sous forme de protéines. En effet, les acides aminés sont facilement accessibles pour les processus de croissance (pas d'hydrolyse enzymatique) ce qui facilite une remobilisation rapide d'azote au printemps ainsi qu'après défoliation (Gloser, 2000).

Chez le *Miscanthus x giganteus*, nous montrons que les acides aminés peuvent représenter jusqu'à près de 50% de l'azote du rhizome. De plus, les rhizomes montrent des relations plus fortes entre l'azote et les acides aminés libres que les tiges et les feuilles. Enfin, l'étude des régressions multiples standardisées montre que les variations des teneurs en azote dans les rhizomes dépendent fortement des variations en acides aminés libres. En fin de cycle, l'asparagine et l'arginine sont les deux acides aminés principaux : respectivement 43 et 26% des acides aminés.

A partir des formules brutes et des concentrations de ces deux acides aminés nous ont permis de déterminer les teneurs en azote contenues sous forme d'asparagine et d'arginine. Durant l'hiver, 1,9 mg d'azote/g MS sont contenus sous forme d'asparagine et 2,4 mg d'azote/g MS sous forme d'arginine dans les rhizomes. Ces valeurs sont supérieures aux valeurs maximales observées dans les rhizomes d'autres plantes cultivées sans apports d'azote (Nordin et Näsholm, 1997). En effet, chez les espèces pérennes de cette étude, la seule espèce contenant de fortes quantités d'azote à la fois sous forme d'asparagine et d'arginine est *Solidago virgaurea*, une plante herbacée de la famille des Astéracées. Cependant cette espèce

contient environ 2 mg/g d'azote sous forme d'asparagine mais seulement 1 mg/g MS sous forme d'arginine. Deux autres espèces (*Trientalis europaea* et *Geranium sylvaticum*) présentent de fortes teneurs d'azote sous forme d'arginine (environ 2 mg/g MS) mais peu d'asparagine, contrairement au *Miscanthus x giganteus*.

Il a été montré que l'asparagine et la glutamine sont les composés majeurs de stockage et de transport chez la plupart des plantes non légumineuses (Ireland *et* Lea, 1999). L'asparagine est un composé de transport et de réserve optimal de l'azote en raison de son fort ratio N/C et de sa stabilité. L'arginine, elle, a le plus fort ratio N/C (4/6) de tous les acides aminés. Cependant, certaines données (Pate 1971 ; Rosnitschek-Schimmel 1985) suggèrent que l'arginine n'est pas souvent trouvé comme composé de transport principal comparé à l'asparagine et la glutamine. Beaucoup de plantes accumulant de l'arginine semblent dépendre de la glutamine pour le transport d'azote dans le xylème. Cela signifie que ces plantes doivent métaboliser l'arginine stocké en glutamine avant le transport ce qui implique une dépense d'énergie supplémentaire et une remobilisation plus tardive (Nordin et Näsholm, 1997).

Dans notre étude, nous avons observé une diminution significative de la proportion d'arginine dans les rhizomes entre avril et juillet, suivie d'une augmentation en fin de cycle. En effet, comme dans l'étude de Nordin et Näsholm (1997) sur la myrtille ou l'ortie, les concentrations d'arginine sont beaucoup plus élevées en automne qu'en été, indiquant un rôle central de l'arginine dans le stockage d'hiver d'azote dans les structures souterraines. Ces diminutions durant la période de remobilisation printanière indiquent que l'arginine sert bien de forme de stockage et non de séquestration de l'azote.

Ces résultats nous montrent que chez *Miscanthus x giganteus*, l'azote est fortement lié aux protéines solubles dans les parties aériennes de la plante (tiges et feuilles) alors que dans les rhizomes, il est fortement lié aux acides aminés libres. Durant l'hiver, les deux acides aminés de stockage principaux sont l'asparagine et l'arginine, ils seront mobilisés vers les organes aériens durant la remobilisation printanière.

### II-4-3 Etude de l'apport d'azote chez *Miscanthus x giganteus*

Pour étudier l'effet d'un apport d'engrais azoté sur le métabolisme de l'azote de la plante, différents dosages ont été réalisés sur des plantes cultivées avec un apport d'azote (condition N2 = 120 unités d'azote marqués $^{15}N$) réalisé après le prélèvement d'avril.

Les dosages des ions nitrate et ammonium en condition N2 nous indiquent que la plante absorbe de grandes quantités de nitrate du sol dès le début du cycle de croissance (avril). Le maximum est atteint au mois de juin avec 102 kg/ha dans les rhizomes et les tiges basses. L'ammonium étant toxique à forte concentration, il semble donc logique de ne pas en trouver en grande quantité dans la plante. Les plus faibles quantités d'ions nitrate et ammonium se trouvent dans les feuilles.

Les faibles quantités d'ions trouvées dans cet organe peuvent provenir d'une réduction et d'une assimilation très rapide des ions nitrate et ammonium. En effet, plusieurs enzymes permettent la réduction et l'assimilation de l'azote minéral et sont généralement fortement présentes dans les feuilles : la nitrate réductase, la nitrite réductase, la glutamine synthétase, la glutamate déshydrogénase, l'asparagine synthétase et la GOGAT (Bascomb et Schmidt, 1987; Faure *et al.*, 1997 ; Martin *et al.*, 2006 ; Todd *et al.*, 2008 ; Kant *et al.*, 2011). Cette hypothèse pourrait être confirmée grâce à la mise en place de dosages de ces principales activités enzymatiques du métabolisme azoté dans les différents organes de la plante (dont les feuilles).

Après le mois de juin, les quantités d'ions nitrate et ammonium chutent fortement jusqu'à rejoindre des valeurs assez proches de celles obtenues en N1. Ces résultats nous indiquent donc que le *Miscanthus x giganteus* peut accumuler de manière transitoire de grandes quantités de nitrate mais n'en stocke pas durant l'hiver. En effet, selon Heilmeier et Monson (1994), malgré la capacité de nombreuses plantes à stocker de grandes quantités de nitrate dans leurs vacuoles, le stockage à long terme d'azote sous forme de nitrate n'a généralement pas lieu. Les coûts énergétiques élevés pour leur réduction sont défavorables lors de la repousse des plantes qui sont dépendantes des réserves limitées d'hydrates de carbone. Les plantes vont donc, pour le stockage à long terme, assimiler ces nitrates en acides aminés et/ou en protéines.

Le suivi des ions a permis de mettre en évidence une forte hausse des quantités de nitrate absorbé dans les plantes entre avril et juin (en condition d'apport azoté N2). C'est à cette même période que l'azote marqué $^{15}N$ va s'accumuler dans la plante. En juin, de grandes quantités d'azote marqué se retrouvent dans les organes contenant les plus grandes quantités de nitrate de d'ammonium : les rhizomes et les tiges basses. Cependant, des quantités non négligeables d'azote marqué sont retrouvées dans les feuilles basses et hautes alors que ces

organes contiennent très peu de nitrate et d'ammonium. La présence de cet azote marqué confirme donc une assimilation rapide dans les feuilles des ions absorbés dès le mois de juin.

Après le mois de juin, aucune perte significative d'azote marqué $^{15}N$ n'est observée dans les plantes alors que les nitrates chutent fortement dès le mois de juillet. La plante a donc non seulement absorbé ces nitrates mais les a aussi assimilés. L'augmentation d'azote dans les parties aériennes étant fortement corrélées aux protéines solubles, le nitrate absorbé en début de cycle se retrouve donc assimilé sous forme de protéines solubles en milieu de cycle.

Après le mois de juillet, on observe une augmentation des proportions de l'azote marqué dans les parties souterraines de la plante et majoritairement dans les rhizomes (87%). Ces résultats confirment la remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes vers les parties souterraines (rhizome) observée en condition N1.

En condition N2 (avec apport de 120 unités d'azote), le *Miscanthus x giganteus* absorbe de grandes quantités de nitrate entre avril et juin. Ce nitrate est temporairement stocké dans les rhizomes et les tiges basses. Une grande partie de ce nitrate semble ensuite être assimilé dès le mois de juillet puis remobilisé vers les rhizomes en fin de cycle.

## II-5 Conclusion

En condition de culture sans apport d'azote, *Miscanthus x giganteus* contient peu d'azote sous forme ionique. Il stocke de grandes quantités d'azote dans ses rhizomes durant l'hiver dont une grande quantité sous forme d'asparagine et d'arginine. Entre avril et juin, la plante va mobiliser une grande quantité de ces acides aminés afin de favoriser la croissance des parties aériennes. Ce stockage sous forme d'acides aminés solubles permet une remobilisation rapide d'azote au printemps (Gloser, 2000) et peut expliquer la rapide et forte production de biomasse observée chez *Miscanthus x giganteus*.

L'azote va s'accumuler en milieu de cycle dans les parties aériennes de la plante. L'accumulation d'azote va se faire majoritairement sous forme de protéines solubles. Cet azote protéique va ensuite être remobilisé en fin de cycle vers les parties souterraines et s'accumuler sous forme principalement d'arginine mais également d'asparagine. Cette forte capacité de remobilisation explique les faibles besoins de la plante en azote observée par de nombreux auteurs.

Lorsque les plantes sont cultivées avec un apport de 120 unités d'azote, le miscanthus absorbe de grandes quantités de nitrate dès le mois d'avril et, au mois de juin, stocke plus de 100 kg d'azote sous forme ionique. Ce stockage a lieu principalement dans les rhizomes et les tiges basses. Ces ions (principalement des nitrates) seront assimilés dès le mois de juillet et remobilisés vers les rhizomes en fin de cycle.

L'étude de Christian et *al.* (2008) montre que l'apport d'azote n'a pas d'impact sur la formation de biomasse sur les plantes récoltées rapidement. Des échantillons ayant été récoltés pour la condition de culture avec 120 unités d'azote, il serait intéressant de travailler de manière plus approfondie sur ces plantes. En effet, cet azote est peut être stocké dans une forme différente de celui observée en condition N1 (arginine et asparagine) ou dans des proportions différentes avec notamment des proportions plus élevées d'arginine. Il pourrait également inciter la plante à produire davantage de biomasse souterraine. En condition N2, cet azote supplémentaire n'est peut-être pas stocké mais plutôt séquestré et donc non remobilisable. Enfin, même si le marquage $^{15}N$ ne semble pas montrer de pertes d'azote (cf figure 11-1 § II-3-7 pp 139), il semblerait intéressant de confirmer ceci avec une étude plus poussée de la volatilisation de l'azote. En effet, la volatilisation de l'azote est un phénomène dans lequel une partie de l'azote à l'intérieur des plantes est émis dans l'atmosphère sous forme

de $NH_3$ à travers les stomates. Il semble que cette volatilisation soit accentuée par la disponibilité en azote due à la fertilisation (Hayashi *et al.*, 2011).

# III- Approches physiologiques et intégrées de la remobilisation printanière et de la remobilisation automnale des réserves azotées dans le *Miscanthus x giganteus.* (Physiological and integrated approaches of spring and autumn remobilization of nitrogen reserves in *Miscanthus x giganteus*)

## III-1 Introduction

De nombreuses études menées sur le miscanthus tendent à prouver que l'apport d'engrais azotés n'aurait pas d'effet sur la production de biomasse de la plante. Même après de nombreuses années de culture sans apport d'azote, aucune perte de rendement de biomasse n'est observée sur les plantes ayant été récoltées tardivement (Christian *et al.*, 2008 ; Strullu *et al.*, 2011).

Les données obtenues précédemment (cf. partie II) semblent indiquer un fort stockage d'azote dans les rhizomes sous forme d'acides aminés libres durant l'hiver. Les principaux acides aminés de stockage semblent être l'asparagine et de l'arginine. Une forte remobilisation d'azote des organes souterrains vers les organes aériens est observée au printemps (remobilisation printanière) et est suivie d'une forte remobilisation de l'azote dans les rhizomes en fin de cycle (remobilisation automnale).

Afin d'étudier finement l'azote remobilisé depuis les parties souterraines vers les parties aériennes en début de cycle en condition N1, un marquage des parties souterraines a été réalisé l'année précédant les prélèvements sur une autre parcelle cultivée en condition N1 depuis son implantation. Hormis cette remobilisation printanière, une étude de la réduction des nitrates a été réalisée dans les différents organes de la plante. L'assimilation de l'azote issu de ces nitrates et de la remobilisation des réserves souterraines a également été étudiée au milieu de la phase de remobilisation printanière (juin).

Les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'azote et spécifiquement induites lors de la remobilisation ont été identifiées chez une majorité de plantes (notamment le maïs) comme étant essentiellement la glutamine synthétase cytosolique (GS1), la glutamate déshydrogénase (GDH) et l'asparagine synthétase (AS) (Martin et *al.*, 2006 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). La remobilisation automnale de l'azote ayant lieu entre juillet et décembre, des études plus approfondies des acides aminés ainsi que des enzymes responsables de ces phénomènes ont été réalisées au mois d'octobre.

## III-2 Matériel et méthodes

### III-2-1 Matériel végétal et milieu expérimental

Le site expérimental de culture est situé dans la région Picardie, dans le nord de la France (49°52'N, 3°00'E). Le sol est de type argilo-limoneux constitué de 74% de limon, 7.6% d'argile et 5% de sable avec un pH de 7,6. La parcelle est située sous un climat est océanique, avec des précipitations moyennes de 625 mm par an et une température moyenne de 10,7° C pour les 10 dernières années.

L'essai est composé de deux différents traitements en fonction de l'apport d'engrais azotés (N) : 0 kg d'azote.ha$^{-1}$ (N1) ou 120 kg d'azote.ha$^{-1}$ (N2) apportés sous forme de nitrate (25%), d'ammonium (25%) et d'urée (50%). Chaque traitement est répété 3 fois sur des parcelles de 360 m$^2$ (12 m x 30 m) contenant 540 plantes d'un même clone de Miscanthus x giganteus (clone britannique de l'ADAS). Les parcelles entières ont été récoltées en février les années précédentes afin que les plantes aient une remobilisation automnale optimale.

Différents prélèvements ont été réalisés à 6 stades de développement de la plante : avril (émergence des parties aériennes), juin (stade 8 feuilles ligulées), juillet (stade 10-12 feuilles ligulées), octobre (phase de maturité, stade 18-20 feuilles ligulées), décembre (phase de maturité avancée) et février (phase de sur-maturité).

A chaque stade, nous avons prélevé les différents organes du système souterrain et ceux de l'appareil aérien. Pour la partie souterraine, les racines (Rac) et les rhizomes (RH) ont été prélevés. Pour la partie aérienne, nous avons divisé la plante en différentes parties en fonction du nombre de nœuds et de feuilles. Quatre à six parties ont donc été déterminées selon les stades de développement : les tiges basses (Tb), les tiges moyennes (Tm), les tiges hautes (Th), les feuilles basses (Fb), les feuilles moyennes (Fm) et les feuilles hautes (Fh). Pour le prélèvement d'avril, les parties aériennes étant peu développées, il était impossible de différencier les feuilles des tiges. Lors des prélèvements de juin et juillet, la partie aérienne a été divisée en quatre (Tb, Th, Fb, Fh), les deux étages foliaires étaient encore verts. Pour les prélèvements d'octobre à février, la partie aérienne a été divisée en six (Tb, Tm, Th, Fb, Fm et Fh). En octobre, les feuilles basses récoltées étaient sénescées (entièrement jaunes et sèches) et les feuilles moyennes en cours de sénescence (feuilles jaunissantes avec un pourcentage de matière sèche supérieur à celui des feuilles hautes). En décembre, les feuilles basses étaient tombées, les feuilles moyennes étaient sénescées et les feuilles hautes

sénescentes. En février, Il ne restait que les feuilles hautes sénescées, les Fb et Fm étaient tombées.

Les échantillons prélevés ont été immédiatement pesés, découpés et plongés dans l'azote liquide pour assurer leur conservation pendant le transport. Ils ont ensuite été broyés à froid au broyeur à billes puis stockés à -80°C.

Des études de composition de sève xylémienne ont été réalisées sur des plantes cultivées en serre. Les prélèvements de xylème ont été effectués selon le protocole de Chaffei *et al.* (2004). Les tiges ont été sectionnées environ 1cm au dessus de la jonction tige/rhizome. L'endroit sectionné a été rincé à l'eau puis essuyé. Les écoulements de sève ont été prélevés à l'aide d'une pipette et placés dans des tubes 15mL placés dans de la glace. Après avoir recueilli 5 mL d'exsudat, les tubes ont été conservés à -80°C. Des dosages d'acides aminés ont ensuite été réalisés sur les exsudats par HPLC comme décrit ci-dessous.

### III-2-2 Extraction et dosages

#### *III-2-2-1 Dosages C/N et excès isotopiques ($^{15}N$)*

Les échantillons broyés et stockés à -80°C ont été lyophilisés. Puis les concentrations totales d'azote et de carbone ont été déterminées par la méthode Dumas en utilisant un analyseur élémentaire (EA 1112 FLASH série, Thermo Electron, Allemagne). Les enrichissements 15N ont été déterminés à l'aide de l'analyseur élémentaire lié à un spectromètre de masse (DELTA V Avantage, Thermo Electron, Brême, Allemagne).

#### *III-2-2-2 Méthode de calcul du flux de mobilisation des parties souterraines*

Afin de quantifier l'azote remobilisé depuis les parties souterraines vers les parties aériennes en début de cycle en condition N1, un marquage des parties souterraines a été réalisé l'année précédant les prélèvements sur une autre parcelle spécifiquement dévolue à l'azote marqué et cultivée en condition N1 depuis son implantation. Afin de rester le plus proche possible de la condition N1, une faible quantité d'azote a été apportée (5 unités d'ammonitrate sous forme liquide très fortement marqué $^{15}N$ (50% sur chaque forme ionique). A la fin du cycle de l'année de marquage, l'ensemble de la biomasse aérienne a été retirée du

champ afin d'éviter tout apport $^{15}N$ provenant de la minéralisation de la biomasse marquée tombée au sol. Des plantes provenant la même parcelle mais n'ayant pas reçues d'apport d'azote marqué 15N ont également été récoltées et analysées pour servir de témoin.

Les concentrations en azote total et de l'abondance $^{15}N$ ont été déterminées en utilisant un analyseur élémentaire (Flash EA 1112) liée à un spectromètre de masse (Delta V Avantage, Thermo Electron). L'utilisation d'azote $^{15}N$ permet de calculer les flux bruts de remobilisation printanière. Le calcul est basé sur la dilution de l'enrichissement $^{15}N$ entre les organes aériens et souterrains.

Les hypothèses de départ sont les suivantes:

1) Au vu de la petite quantité d'azote $^{15}N$ apporté en année N-1 (5U) et l'exportation des parties aériennes, il n'y a plus d'azote marqué libre dans le sol. L'azote marqué se trouve uniquement dans les parties souterraines.

2) L'enrichissement $^{15}N$ des parties souterraines est constant durant la période d'étude de remobilisation printanière.

Principe des calculs :

Pour mesurer la quantité d'azote remobilisé depuis les organes sources (parties souterraines) vers les organes puits (parties aériennes), nous avons utilisé le rapport d'allocation spécifique (RSA) comme défini par Cliquet *et al.* (1990).

$$RSA = \frac{E_{PA} - E_{PA0}}{E_{PS} - E_{PS0}}$$

$E_{PA}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties aériennes (atom%)

$E_{PS}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties souterraines (atom%)

$E_{PA0}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties aériennes des plantes témoins (atom%)

$E_{PS0}$ Excès isotopique $^{15}N$ des parties souterraines des plantes témoins (atom%)

### *III-2-2-3 Extraction et dosages des acides aminés*

Un échantillon de 20 mg de poudre lyophilisée a été placé dans des tubes à centrifuger de 1,5 mL avec 1 mL d'éthanol à 80%. Après 2 heures d'incubation à température ambiante sous agitation (140 rpm), les tubes ont été centrifugés à 12000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les surnageants ont été récupérés puis placés dans des tubes de 5 mL.

Deux nouvelles extractions ont été répétées sur les culots avec de l'alcool à 60% puis avec de l'eau distillée et les trois surnageants contenant les acides aminés ont ensuite été réunis.

La détermination des acides aminés a été réalisée par HPLC sur une colonne Kromasil C18 -100 Ǻ-5µm 4,6 X250mm après dérivation à l'o-phtalaldéhyde (OPA). Pour la dérivation, 50µl de l'échantillon ont été ajoutés à 50µl de tampon borate contenant 0,25% (w: v) l'OPA et 5% de β-mercaptoéthanol (v:v). 5 µl de cette solution ont été injectés.

La phase mobile est constituée de l'éluant A: 50 mM CH3COONa (pH 7,4): 50 mM NaHPO4 (pH 7,4): MeOH: THF (48:48:2:2; v: v: v: v) et Éluant B: MeOH:eau (65:35; v:v) et les gradients suivant ont été appliqués: 80% de A durant les 3 premières minutes, 80% - 70% A durant 12 min, 70% - 50% A durant 15 min, de 50% - 45% A durant 10 min, de 45% - 20% A durant 10 min, de 20% - 15% A durant 5 minutes, 15% - 10% A durant 3 min, de 10% - 0% A durant 2 min et 0% A durant 15 min à un débit de 1,2 ml / min.

La détection a été faite par spectrofluorimétrie à 330 nm (λex) et à 430 nm (λem).

### *III-2-2-4 Dosages des protéines et des activités GS et GDH*

L'extraction des protéines a été effectuée selon la méthode décrite par Fontaine *et al.* (2006). A 100 mg de poudre végétale conservée à -80°C, 200 µL de tampon d'extraction (Tricine 100 mM, CaCl2 40 mM, PVPP 0,5% (p/v), Triton X100 0,05% (v/v), EDTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, PMSF 1 mM ; pH 8,0) sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé et centrifugé à 15000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant constitue l'extrait brut de protéines solubles.

Les dosages de l'activité GS ont été réalisés selon la méthode d' O' Neal et Joy (1973). Les dosages de l'activité aminante de la GDH sont basés sur la cinétique d'oxydation du NADH, qui est suivie à 340 nm. Le protocole utilisé dérive de celui de Turano (1996), sauf que le tampon d'extraction est le même que celui utilisé pour mesurer l'activité GS.

La concentration en protéines des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant un kit commercial (réactif de Coomassie Protein Assay; Bio-Rad, Munich, Allemagne) et en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme gamme étalon.

### *III-2-2-5 Western-blot*

Les protéines solubles ont été extraites à 4°C dans du tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, 1 mM de MgCl2, PVP 0,5% (p / v), β-mercaptoéthanol 0,1% (v/v) et

leupeptine 4 µM , pH 8,8) à partir des poudres conservées à -80°C. Après dosage des protéines, celles-ci sont dénaturées par l'ajout de 0,1% de SDS et un passage à 100°C pendant 5 min.

Des électrophorèses, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), ont été réalisées selon un protocole adapté de celui de Laemmli (1970). Le gel d'électrophorèse est constitué d'un gel de concentration de 4% et d'un gel de séparation de 10% en acrylamide/bisacrylamide et contenant 0,1% de SDS. Des quantités égales de protéines (10 µg) ont été chargées dans chaque puits. Après électrophorèses, les protéines ont été transférées à des membranes de nitrocellulose pour les analyses par Western blot. Les anticorps primaires utilisés ont été produits chez le lapin à partir d'une immunisation à l'aide de peptides de synthèses spécifiques par la société Eurogentec (Eurogentec, Angers).

### *III-2-2-6 Marquage $^{15}N$ et analyse de l'assimilation d'azote par RMN*

Des feuilles jeunes et ligulées ont été prélevées avec leur gaine sur des tiges au stade 10 feuilles ligulées. Les gaines de ces feuilles ont ensuite été plongées dans une solution contenant 4mM de $NO_3^-$ marqué $^{15}N$ 99%. Des témoins ont été réalisés sur des feuilles dont les gaines ont été plongées dans une solution contenant 4mM de $NO_3^-$ non marqué. Au bout de trois et six heures, les feuilles ont été plongées dans l'azote liquide, broyées à froid au broyeur à billes puis lyophilisées.

L'extraction a été réalisée pendant 24 heures à température ambiante à partir de 100 mg de matière sèche dans 30 mL d'éthanol 70% suivie d'une centrifugation à 4°C pendant 20 minutes à 6000 g. Le surnageant est filtré et séché au speedvac. Le culot est repris dans 2 mL de tampon phosphate à 0,1 M deutéré (H2O:D2O (90:10), 1mM de TMSP, 5 mM NaN3) à pH6. Cet extrait est ensuite analysé par RMN.

Le principe de la RMN est le suivant : un échantillon est placé dans un champ magnétique statique intense appelé $B_0$. Les molécules de cet échantillon sont soumises à un champ magnétique appliqué $B_1$ qui provoque une perturbation des atomes considérés. L'application de ce champ de radiofréquence (RF) choisie (que l'on appelle impulsion ou "pulse") est de quelques microsecondes. Les noyaux génèrent à leur tour un micro-champ magnétique qui est capté par une bobine réceptrice, c'est le signal RMN ou « signal de précession libre » ou encore FID pour (Free Induction Decay). Ces données sont envoyées à un ordinateur où elles sont analysées.

L'abondance naturelle du proton ($^{1}H$) de 100% et son rapport gyromagnétique élevé (42,58 MHz/Tesla) font que la résonance magnétique du proton est la plus utilisée. De ce fait, l'acquisition des spectres est réalisée directement après l'impulsion. Du fait de son abondance naturelle très faible (0,37%), et d'un rapport gyromagnétique très petit, la sensibilité RMN de l'Azote $^{15}N$ est très faible. De ce fait, l'acquisition des spectres est réalisée par des techniques de détection « inverse » qui permettent d'observer le noyau $^{15}N$ *via* les protons. Pour ce faire, des séquences d'acquisition HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) sont utilisées.

La séquence HSQC permet d'observer le noyau $^{15}N$ par l'intermédiaire des couplages $^{1}J$ des protons non labiles directement liés à l'azote. La séquence HMBC permet d'observer le noyau $^{15}N$ par le couplage des protons liés à un carbone voisin de cet azote par l'intermédiaire des couplages $^{2}J$ ou $^{3}J$. Cette séquence HMBC est particulièrement intéressante dans le cas de protons échangeables portés par les azotes, dans le cas ou aucune information n'est obtenue par la séquence HSQC.

Tous les spectres sont enregistrés à 600,17 MHz et à 60, 84 MHz respectivement pour le proton et pour l'azote 15. La température de l'échantillon est maintenue à 25°C. L'acquisition des spectres $^{1}H$ est réalisée en utilisant une séquence noesypr (1D NOESY), avec une largeur spectrale de 14 ppm (8417 Hz), 128 scans sur 131072 points (128K) et un temps de relaxation de 5s. Les spectres RMN $^{15}N$ sont des spectres à deux dimensions $^{1}H$ et $^{15}N$. Pour chaque expérience (HSQC ou HMBC), la largeur de la fenêtre spectrale utilisée pour le proton est de 14 ppm (8417 Hz) et pour l'azote de 200 ppm (12164 Hz) avec une acquisition de 32 scans par 256 lignes sur 16384 points (16K) et un temps de relaxation de 1,5s. Les échantillons sont placés dans des tubes de 5 mm et introduits dans le spectromètre lui-même relié à un ordinateur qui permet l'exploitation des données spectrales grâce au logiciel Topspin 3 (BRUKER).

Le signal FID obtenu est converti en un spectre par une transformée de Fourier à une dimension dans le cas de l'acquisition de simples spectres protons et à deux dimensions dans le cas des HSQC et HMBC. Les spectres sont ensuite phasés manuellement. Pour les spectres RMN protons la référence choisie est le TMSP-d4 (3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-$d_4$ acid sodium salt) avec comme déplacements chimiques 0 ppm et pour les études réalisées en RMN du $^{15}N$, la référence choisie pour les déplacements chimiques est l'urée à -298,8 ppm. L'ensemble du traitement du signal est effectué grâce au logiciel Topspin 3 (BRUKER). Les pics et les taches ont été attribués grâce à la comparaison avec des produits commerciaux (non marqués, à pH identique à celui des extraits).

### *III-2-2-7 Etudes cytologiques*

Les échantillons sont initialement fixés dans une solution de paraformaldéhyde 1,5% dans un tampon phosphate (NaH2PO4 200mM, Na2HPO4 200mM ; pH 7,4). Ils ont ensuite été déshydratés dans une série de bain d'éthanol [concentration finale de 90% (v / v) d'éthanol], puis fixés dans de la résine LR White (Londres Résine White) (Polysciences, Warrington, PA, USA). La polymérisation a été effectuée dans des capsules de gélatine pendant une nuit à 55°C. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT).

Pour les études structurales, les coupes semi-fines sont traitées pendant 5 min à l'acide périodique 1%. Après séchage, les lames sont plongées 20 min dans le réactif de Schiff (0,5% de fuschine basique). Elles sont ensuite colorées 7 min en présence de Naphtol Blue-Black (Agar Scientific) à 1% dans de l'acide acétique à 7%.

Pour les études d'immunolocalisation en microscopie, les coupes fines (1µm) ont été montées sur des lames silanées (Silane-prep slides, Sigma). Les lames sont ensuite plongées dans un tampon T1 (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4) durant 10 min puis dans un tampon T1' (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 2,3%, BSA 0,1%, Tween-20 0,025%, pH 7,4) pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les lames sont incubées pendant 1 heure avec le sérum pré-immun de chèvre puis avec le sérum spécifique dilué au 1:400 durant quatre heures. Suite à trois lavages au T1', les lames sont plongées dans un bain d'anticorps secondaires (1 :100ème dans T1') (Sigma) couplés à des billes d'or de 10 nanomètres durant 2 heures. Enfin, une succession de lavages termine l'immunomarquage. Après le dernier lavage réalisé dans l'eau distillée les lames subissent une amplification à l'argent (silver kit enhancing, Biocell) et une coloration de fond est effectuée avec une solution de fuscine à 1%. L'observation est effectuée avec un microscope Nikon eclipse E800 en fond clair et lumière épipolarisée.

### *III-2-2-8 Statistiques*

Les résultats ont été exposés sous forme d'histogrammes ou de courbes représentant les moyennes des valeurs mesurées ainsi que leur erreur standard. Des analyses de variance et des tests de Newman-Keuls au risque ($\alpha$ = 5%) ont été réalisés à l'aide du logiciel Statbox 6 afin de comparer les moyennes et de faire ressortir les valeurs significativement différentes.

## III-3 Résultats

### III-3-1 Remobilisation de l'azote des parties souterraines

Les mesures des excès isotopiques $^{15}N$ des parties souterraines et aériennes prélevées nous ont permis de calculer le rapport d'allocation spécifique (RSA). Nous avons en outre vérifié que l'enrichissement des parties souterraines par de l'azote marqué ne variait pas durant la période de mesure, validant notre hypothèse de départ.
L'analyse de variance des valeurs calculées en avril, mai et juin n'ont pas montré d'effet significatif de la date de mesure pour ce RSA. La valeur moyenne obtenue atteint 83,1% avec un coefficient de variation de 9,9%. Ainsi, 83,1% de l'azote remobilisé au printemps provient des rhizomes.

### III-3-2 Réduction des nitrates

Malgré ces forts taux de mobilisation printanière observés, il semblait important de caractériser les voies classiques d'absorption et d'assimilation de l'azote minéral. Afin de caractériser la réduction des nitrates chez miscanthus, des mesures de l'activité nitrate réductase (NR) ont été effectuées sur les différents organes de *Miscanthus x giganteus* au cours de son cycle de développement. En condition N1 (sans apport d'azote), les activités mesurées étaient très faibles avec un maximum de 0,08 nmol/min/mg MS (± 0,03) obtenu dans les feuilles hautes de juillet. Ces résultats ont été confirmés grâce à la réalisation de western-blots qui n'ont pas permis de révéler de bande correspondant à cette enzyme dans les feuilles hautes (données non montrées).

La mesure de l'activité nitrate réductase a également été réalisée sur des plantes cultivées en condition N2 (120 unités d'azote par hectare) au niveau des différents organes récoltés en juillet (figure 1-A). Comme observé pour la condition N1, les activités NR les plus fortes ont été trouvées dans les feuilles hautes (environ 0,35 nmol/min/mg MS). Les autres organes montrent des activités NR assez faibles, inférieures à 0,1 nmol/min/mg MS.

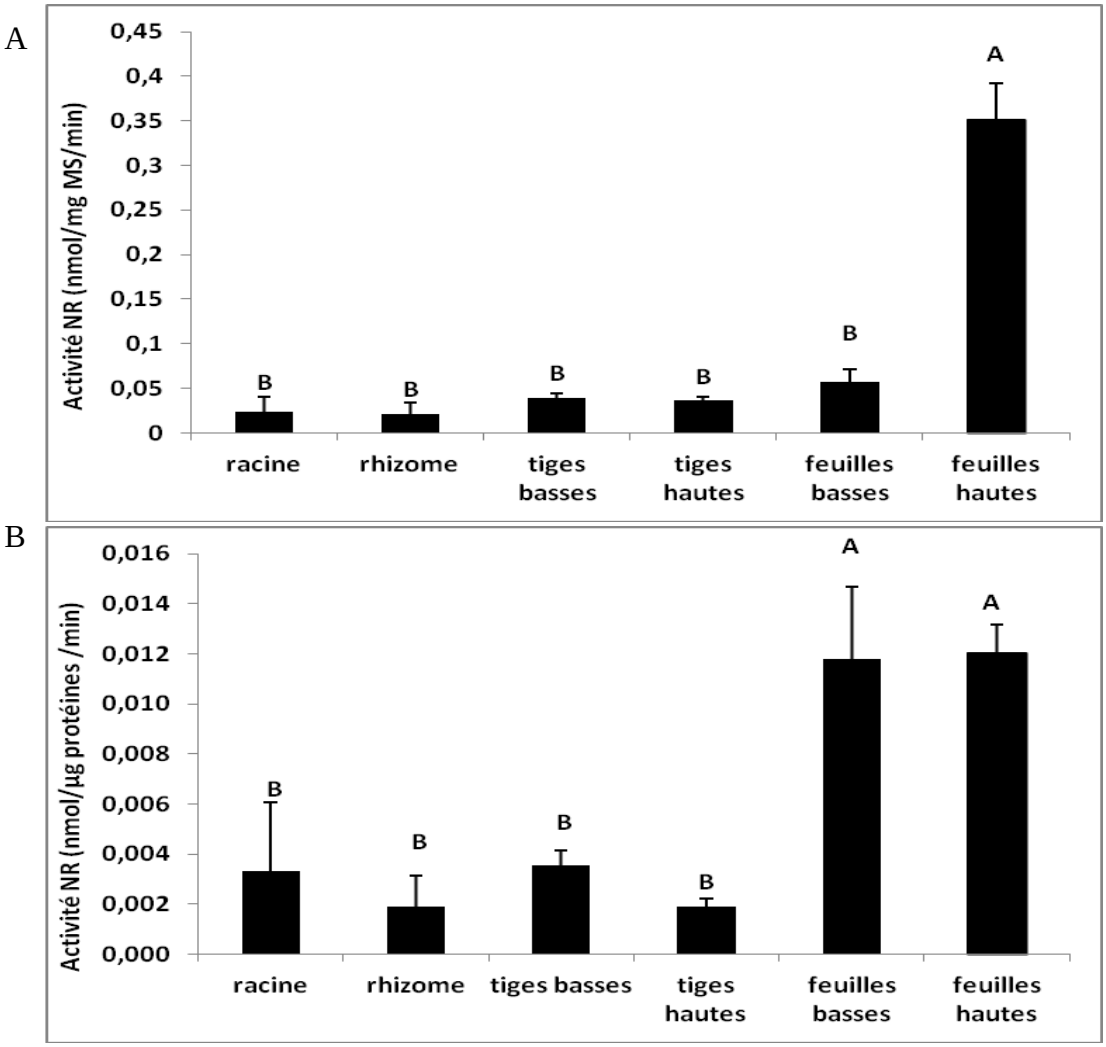



**Figure 1. Dosages des activités NR dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet.**
A- dosage d'activité NR exprimé en nmol/min/mg MS, B- dosage d'activité NR exprimé en nmol/min/ µg de protéines
Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5%. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

Afin de confirmer les résultats obtenus pour la mesure des activités nitrate réductase mesurés par dosages enzymatiques, des western-blots ont été réalisés avec les mêmes échantillons (figure 2).

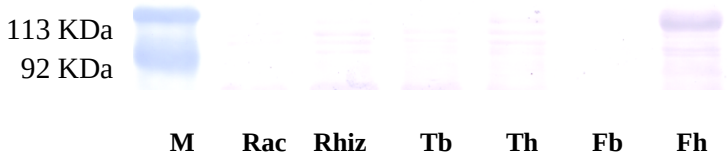



**Figure 2. Western-blot réalisés sur dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet avec des anticorps anti-NR.**

Les résultats confirment bien le peu de présence voire l'absence de NR dans les organes souterrains et dans les tiges. Pour les feuilles, les résultats des westerns ne sont pas parfaitement corrélés aux mesures d'activités enzymatiques. En effet, nos dosages enzymatiques montrent peu d'activité dans les feuilles basses alors qu'une bande apparaît sur le western-blot. Cette différence vient du fait que les dosages enzymatiques sont réalisés avec des volumes constants d'extraits et que les western-blot ne sont pas réalisés avec un volume constant d'extrait mais avec une quantité constante de protéines. Si l'on exprime la mesure de l'activité NR dosée colorimétriquement en nmol de nitrite formé par minute par µg de protéines (figure 1-B), les résultats sont bien corrélés à ceux obtenus avec le western-blot.

Suite à ces premiers résultats, des dosages d'activité NR ont été réalisés sur les feuilles des plantes cultivées en condition N2 à différentes périodes du cycle de croissance du miscanthus (figure 3).

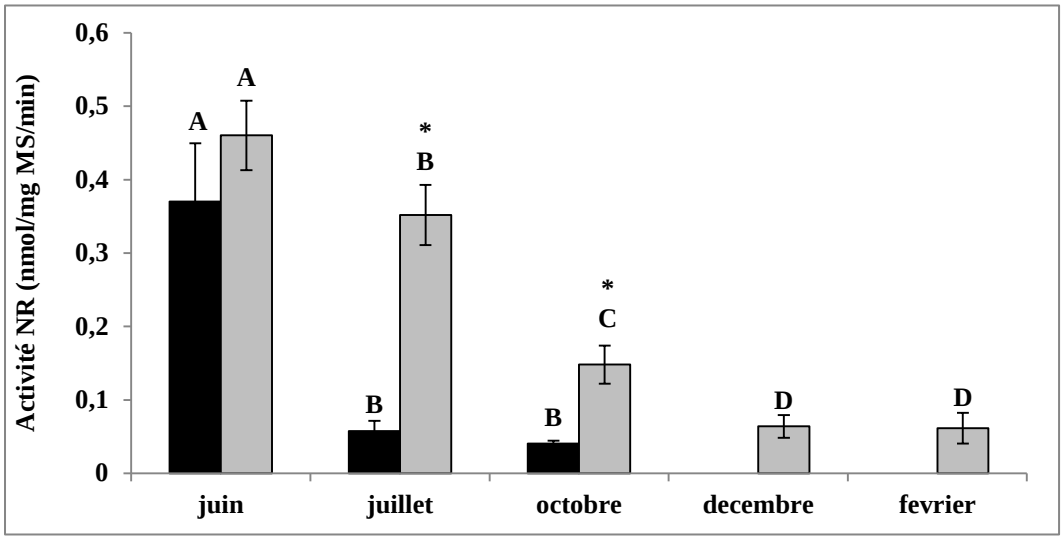



**Figure 3 : Dosages des activités NR dans les feuilles basses et hautes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N2 en juillet.**
Les histogrammes noirs représentent les activités NR totale (exprimées en nmol/min/mg MS) mesurées dans les feuilles basses et les histogrammes gris représentent les activités NR totale (exprimées en nmol/min/mg MS) mesurées dans les feuilles hautes. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova ainsi qu'un test de Newman Keuls ont été réalisés sur l'ensemble des données (avec une probabilité de 5%). Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

La plus forte activité NR a été mesurée dans les feuilles basses et les feuilles hautes de juin (respectivement 0,37 et 0,46 nmol/min/mg MS). Cette activité diminue ensuite fortement dans les feuilles basses et ce dès le mois de juillet (0,05 nmol/min/mg MS). Dans les feuilles hautes, elle diminue de manière progressive entre le mois de juin et le mois de décembre. En parallèle de ces mesures et afin d'avoir un élément de comparaison externe l'activité NR a également été mesurée enzymatiquement sur un témoin constitué de feuilles étendard de blé au stade épi = 1cm (cultivé en champ avec apport d'azote, 120U). L'activité NR mesurée sur le blé est de 9 nmol/min/mg MS (± 0,16) soit près de 20 fois supérieure à l'activité mesurée sur miscanthus. Si l'on exprime les résultats d'activité NR en nmol/min/µg de protéines, on observe des tendances proches de celles mesurées nmol/min/mg MS. La seule différence notable se trouve au niveau des feuilles basses de juillet et d'octobre.

### III-3-3 Etude des acides aminés libres

Les résultats obtenus précédemment (chapitre 2) nous indiquent que le miscanthus stocke de grandes quantités d'azote dans ses rhizomes durant l'hiver sous forme d'asparagine et d'arginine puis mobilise une grande quantité de ces acides aminés entre avril et juin afin de

favoriser la croissance des parties aériennes. Afin d'appréhender plus finement ces phénomènes de remobilisation printanière et automnale, des dosages d'acides aminés libres ont été effectués par HPLC dans les différents organes de la plante durant ces deux phases en juin et en octobre (figure 4-A et 4-B).

### *III-3-3-1 Analyse des acides aminés pendant la phase de remobilisation printanière*

Les proportions des principaux acides aminés libres dans les organes de miscanthus pendant la phase de remobilisation printanière (Juin) sont présentées (figure 4-A).

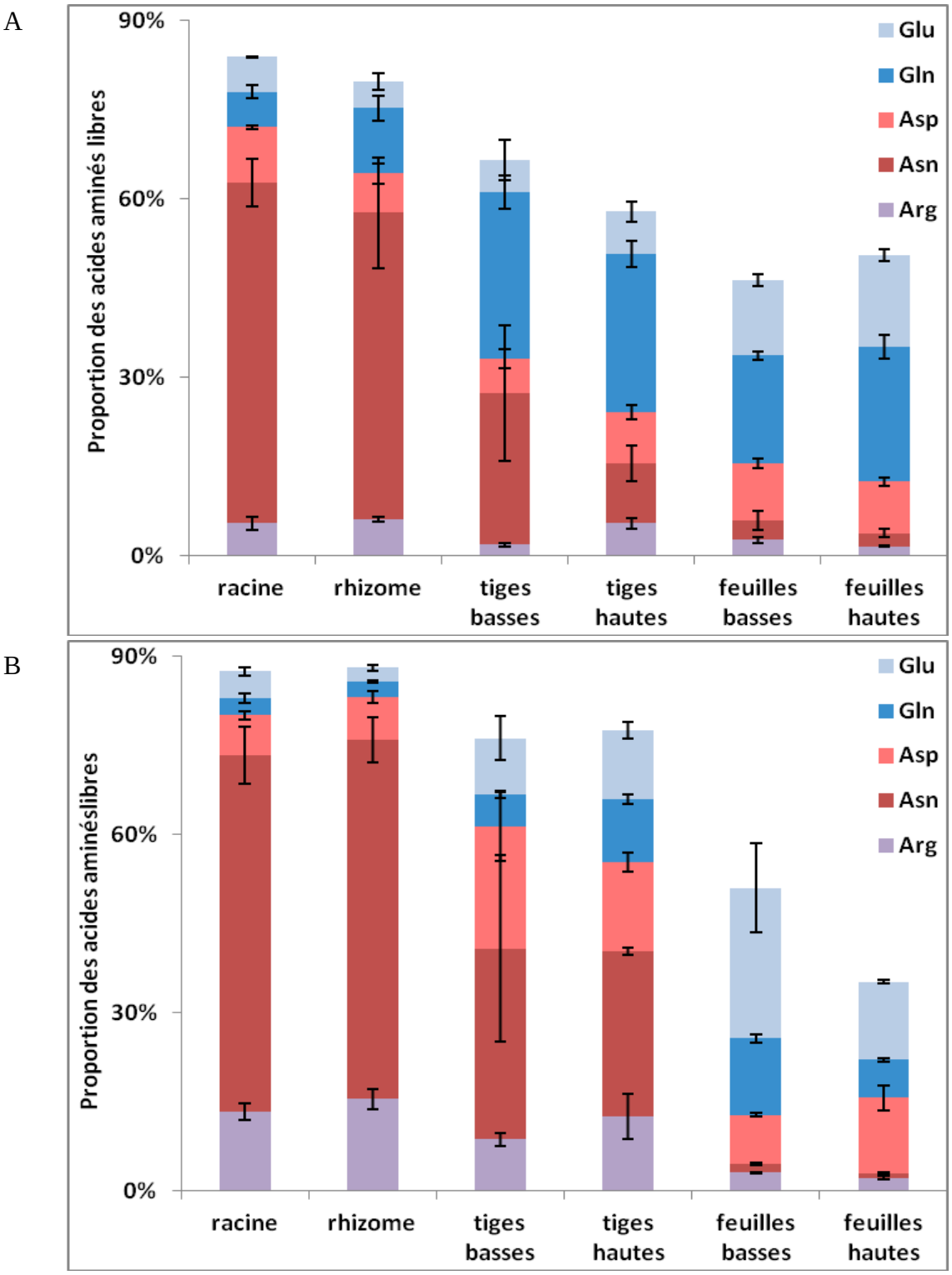



**Figure 4 : Proportion des cinq acides aminés (Arg, Asn, Asp, Gln et Glu) par rapport à l'ensemble des acides aminés libres.**

A- phase de mobilisation, B- phase de remobilisation

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Arg : arginine ; Asn : asparagine ; Asp : aspartate, Gln : glutamine, Glu : glutamate

Le principal acide aminé des parties souterraines est l'asparagine (57% dans les racines et 51% dans les rhizomes). Durant cette phase de remobilisation, le ratio d'arginine est assez faible dans les organes souterrains (5 % et 6%) et c'est la glutamine qui est le deuxième acide aminé le plus important (11%).

Dans les organes aériens, la proportion d'asparagine est beaucoup moins importante que dans les organes souterrains. Dans les tiges basses, l'asparagine représente environ 25% des acides aminés, et seulement 10% dans les tiges hautes. Dans les feuilles, l'asparagine représente moins de 4% des acides aminés. Les proportions d'aspartate, qui est potentiellement un précurseur de l'Asparagine sont assez homogènes dans l'ensemble des organes de la plante (7 à 10%).

C'est la glutamine qui est le principal acide aminé des organes aériens. Elle représente environ 27% des acides aminés dans les tiges basses et hautes et 18 à 23% dans les feuilles basses et hautes. Le glutamate représente moins de 7% des acides aminés dans les tiges et 13 à 16% dans les feuilles.

Ces cinq acides aminés représentent 80 à 84% des acides aminés des organes souterrains. Cette proportion est moins importante dans les organes aériens, elle atteint 66 et 58% des acides aminés des tiges basses et hautes respectivement et environ 50% dans les feuilles. Dans ces organes aériens, deux autres acides aminés sont présents en quantités non négligeables : l'alanine et la sérine. L'alanine qui représente 6 à 9% des acides aminés des tiges et 12% des acides aminés des feuilles et la sérine 7% dans les tiges et 9 à 10% dans les feuilles (données non montrées).

#### *III-3-3-2 Analyse des acides aminés pendant la phase de remobilisation automnale*

Les proportions des principaux acides aminés libres dans les organes de miscanthus pendant la phase de remobilisation automnale sont présentées (figure 5-B). Dans les rhizomes, les proportions d'asparagine sont encore plus importantes que pendant la phase de remobilisation printanière (60% des acides aminés). Le second acide aminé fortement présent est l'arginine (13,5 et 15,5%). La proportion de ce dernier est aussi importante que celle des 3 autres acides aminés majeurs réunis (aspartate, glutamine et glutamate) et il est présent en proportions deux à trois fois supérieures à celles observées en Juin à l'issue de la phase de remobilisation printanière.

Les proportions d'asparagine, d'aspartate ainsi que d'arginine dans les tiges sont également plus importantes que durant la phase de remobilisation printanière. En effet dans les tiges basses ces acides aminés représentent respectivement 32, 20 et 9% des acides aminés et dans les tiges hautes 12,5, 28 et 15%. Les proportions de glutamate (9,5 et 11,5%) ont légèrement augmenté dans les tiges entre juin et octobre et sont supérieures à celles de la glutamine qui ont, quant à elles, fortement chuté (5,5 et 10,5%) entre ces deux mêmes périodes.

Dans les feuilles, les proportions d'arginine et d'asparagine sont toujours très faibles (< 3%). Par rapport à la phase de remobilisation printanière, les changements les plus notables se situent au niveau des proportions de glutamine qui ont fortement diminué (13%) et de glutamate qui a fortement augmenté (25%) et dépasse celle de la glutamine. Dans les feuilles hautes, la proportion d'aspartate a augmenté (13%) et est égale à celle de glutamate. La glutamine qui était l'acide aminé le plus présent pendant la phase de remobilisation printanière est trois fois moins importante et ne représente maintenant que 6,5% des acides aminés.

Durant la phase de remobilisation automnale, ces 5 acides aminés représentent environ 88% des acides aminés des parties souterraines, 77% dans les tiges, 51% dans les feuilles basses et seulement 35% dans les feuilles hautes. L'alanine et la sérine représentent environ chacun 11% des acides aminés des feuilles et la sérine 18,5% dans les feuilles basses et 15% dans les feuilles hautes (données non montrées).

### *III-3-3-3 Analyse des acides aminés de transport*

Afin d'avoir une idée plus précise sur les acides aminés circulants, des prélèvements de xylème ont été réalisés durant la phase de remobilisation printanière des réserves. Des dosages des acides aminés individuels ont été réalisés par HPLC (figure 5). Les analyses de variances et les tests de Newman-Keuls révèlent que l'acide aminé de transport majoritaire chez le miscanthus est la glutamine (42,1%) et que l'asparagine (23,8%) est le second acide aminé le plus présent dans la sève xylémienne.

Les proportions d'acides aminés dans l'exsudat xylémien sont différentes de celles des rhizomes et des tiges basses. En effet, les analyses de variances et les tests de Newman-Keuls montrent que dans les rhizomes l'asparagine est le principal acide aminé et qu'il n'y a pas de différence significative entre les autres acides aminés. Au niveau des tiges basses, les analyses

statistiques montrent que les teneurs en asparagine et en glutamine ne sont pas différentes statistiquement.

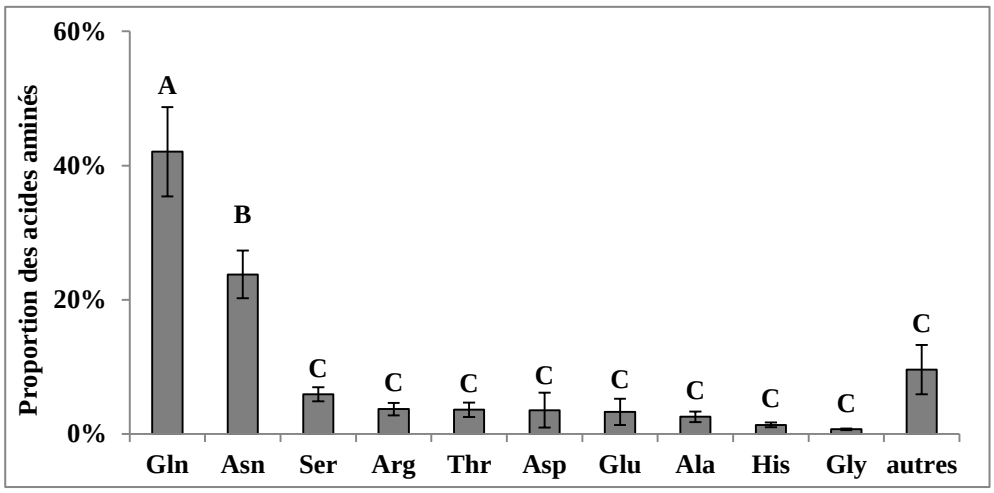



**Figure 5 : Proportions des acides aminés de la sève xylemienne durant la phase de mobilisation**
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'acides aminés totaux. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.
Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5%. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.
Gln : glutamine ; Asn : asparagine ; Ser : sérine ; Arg : arginine ; Asp : aspartate ; Thr : thréonine ; Glu : glutamate ; Ala : alanine ; His : histidine ; Gly : glycine ; autres : autres acides aminés

### *III-3-3-4 Etude des relations entre l'arginine et la glutamine dans les rhizomes*

Comme nous l'avons montré (chapitre 2), l'arginine est un acide aminé qui semble jouer un rôle important dans les rhizomes. Sa teneur diminue entre avril et juillet et augmente entre juillet et décembre. Le contraire est observé avec la glutamine. Afin d'affiner les relations entre les teneurs en arginine et glutamine dans les rhizomes, des études de régression ont été mises en place sur l'ensemble des rhizomes prélevés durant le cycle de la plante (figure 6).

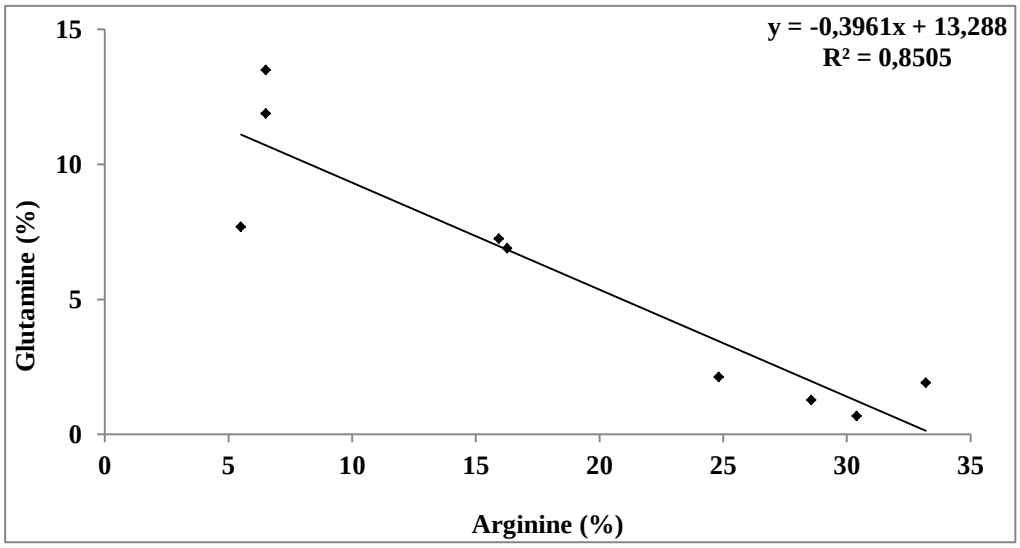



**Figure 6 : Relations entre les proportions d'arginine et de glutamine dans les rhizomes de *Miscanthus x giganteus* cultivées en condition N1.**

Il existe une relation négative statistiquement significative (avec une probabilité de 5%) entre les teneurs en arginine et en glutamine dans les rhizomes.

### III-3-4 Etude des activités GS et GDH

Les périodes avril-juillet et juillet-décembre ont été définies comme les phases de remobilisation printanière et automnale de l'azote (chapitre 2). La glutamine synthétase (GS) et la glutamate déshydrogénase (GDH) étant deux enzymes clés de l'assimilation de l'ammonium, des dosages d'activités de ces protéines ont été réalisés sur les différents organes de *Miscanthus x giganteus* durant des deux phases.

Les activités enzymatiques peuvent être exprimées soit en activités molaires, soit en activités spécifiques. Ces deux unités sont différentes mais complémentaires. Les activités molaires (ici en nmol/min/mg MS) vont nous permettre de comparer les activités enzymatiques entre différents organes sans tenir compte de leur teneur en protéines et vont exprimer les activités maximales. Les activités spécifiques (ici en nmol/min/µg de protéines) vont tenir compte de la teneur en protéines de chaque organe et refléter la proportion de l'enzyme considérée parmi l'ensemble des protéines. Comparer des activités spécifiques entre des organes différents n'est pas évident car les organes photosynthétiques comme les feuilles sont beaucoup plus riches en protéines que les organes non photosynthétiques. Cependant il est intéressant de comparer les activités spécifiques au sein des mêmes organes prélevés à deux dates différentes. En effet, si l'activité molaire reste constante dans un même organe à

deux moments distincts mais que la teneur en protéines totales diminue ou augmente, on observe alors une hausse ou une baisse de l'activité spécifique suggérant donc un rôle important de cette protéine.

### *III-3-4-1 Etude des activités GS durant les phases de remobilisation printanière et automnale*

Les dosages d'activité GS (exprimés en nmol/min/mg MS) durant la phase de remobilisation printanière (juin) et automnale (octobre) sont présentés figure 7-A.

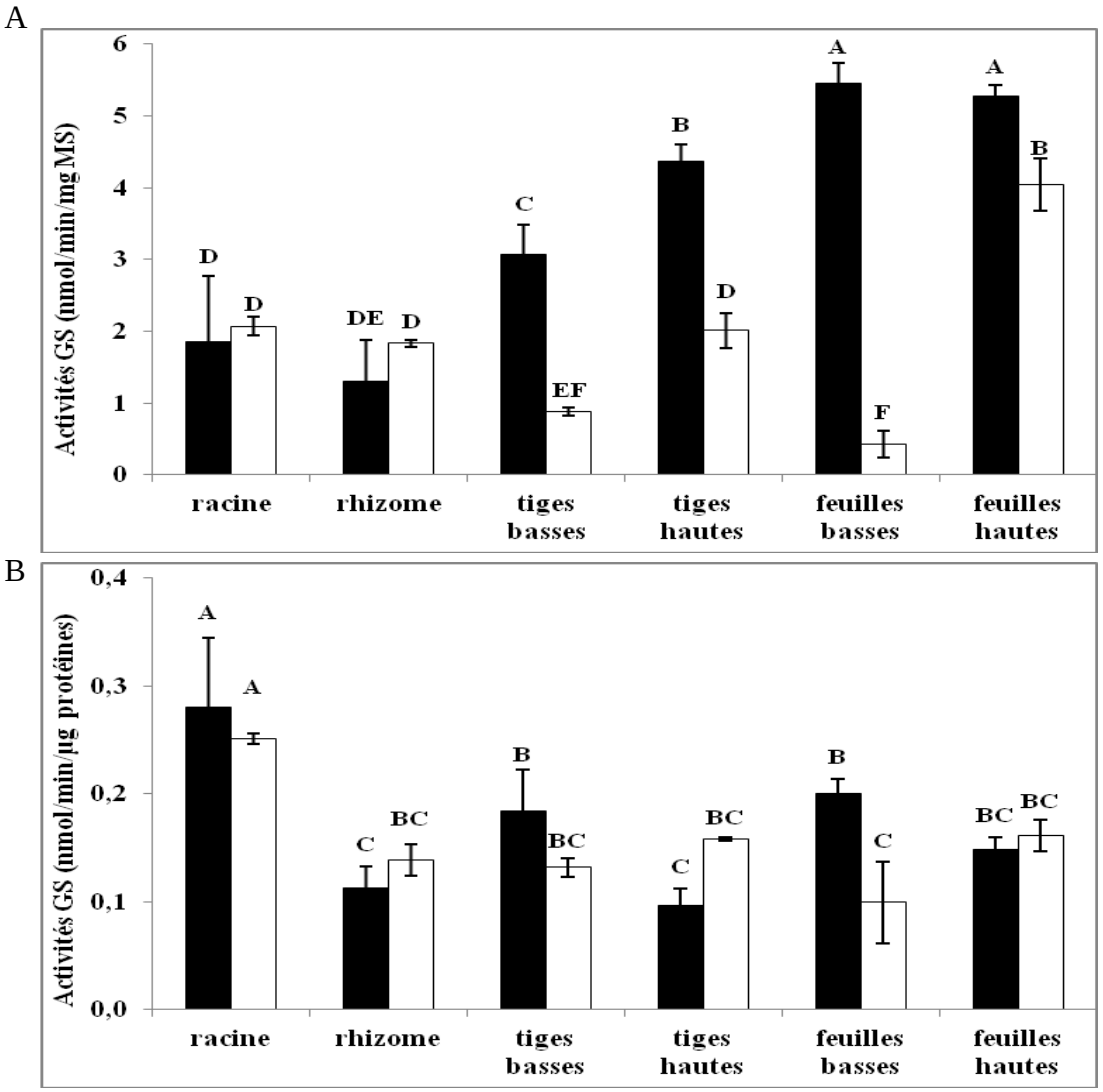



**Figure 7 : Dosages des activités GS dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de mobilisation de l'azote (juin) et de remobilisation (octobre)**

A- activité exprimée en nmol de produit formé/min/mg MS, B- activité exprimée en nmol de produit formé min/µg de protéines

Les histogrammes noirs représentent les activités GS en juin et les histogrammes blancs représentent les activités GS en octobre. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur l'ensemble des données. Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

Durant la phase de remobilisation printanière, les plus fortes activités GS ont été mesurées dans les feuilles basses et hautes. Elles sont légèrement plus faibles dans les tiges hautes et encore plus faibles dans les tiges basses. Les racines et les rhizomes sont les organes qui présentent les activités les plus faibles durant cette période. Durant la phase de remobilisation automnale, l'activité GS la plus importante a été mesurée dans les feuilles hautes indiquant une forte assimilation d'ammonium. Cette activité est inférieure à celle

mesurée dans les feuilles hautes de juin mais est aussi importante que celle mesurée dans les tiges hautes à cette même période. La plus faible activité GS en octobre a été observée dans les feuilles basses alors que durant la phase de remobilisation printanière l'activité GS de cet organe était très importante. Au niveau des tiges, les activités GS en octobre sont beaucoup plus faibles qu'en juin (deux fois plus faibles dans les tiges hautes et trois fois plus faibles dans les tiges basses) mais comme en juin les activités sont supérieures dans tiges hautes. Enfin, les activités GS mesurées dans les organes souterrains en octobre ne sont pas différentes statistiquement de celles observées en juin.

Les plus fortes activités GS ont été mesurées dans les feuilles basses et hautes durant la période de remobilisation printanière. Durant la période de remobilisation automnale, ces activités seront toujours fortes dans les feuilles hautes mais elles vont très fortement chuter dans les feuilles basses. Au niveau des tiges, les activités GS les plus fortes sont observées durant la période de remobilisation printanière et sont supérieures dans les tiges hautes par rapport aux tiges basses. Durant la phase de remobilisation automnale, ces activités vont fortement diminuer dans les tiges mais comme précédemment, elles vont être plus fortes dans les tiges hautes que dans les tiges basses. Les racines et les rhizomes sont les organes qui présentent les activités les plus faibles durant la période de remobilisation printanière et elles varient peu lors de la phase de remobilisation automnale.

Afin de confirmer les résultats obtenus par dosages enzymatiques, des western-blots ont été réalisés avec des anticorps anti-GS sur les échantillons de juin (figure 8) ainsi que sur un témoin d'*Arabidopsis thaliana*. L'étude par western-blot de la protéine GS nous permet surtout de visualiser les différentes isoformes protéiques responsables des activités mesurées et de savoir quelle isoforme est principalement associée aux variations observées d'activité.

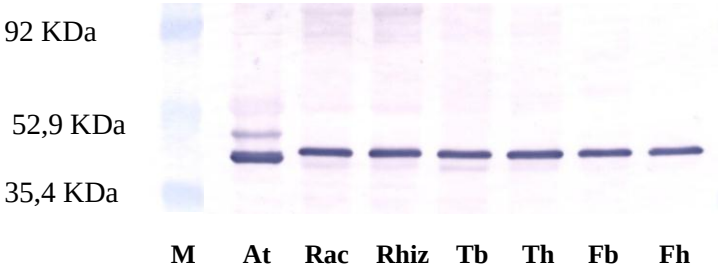



**Figure 8 : Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation printanière avec des anticorps anti-GS**

La figure 8 nous montre la présence des deux isoformes de GS chez *Arabidopsis thaliana* (At) et d'une seule chez miscanthus. On sait que chez *Arabidopsis thaliana*, les isoformes de la GS ont des poids moléculaires de 44kDa pour la GS2 (isoforme chloroplastique) et de 40kDa pour la GS1 (isoforme cytosolique). En se basant sur cette étude, aucune bande représentant la GS2 n'est visible sur les échantillons de *Miscanthus x giganteus*. La GS2 étant chloroplastique, il n'est pas étonnant de ne pas la voir dans les organes souterrains mais il est plus surprenant de ne pas la voir dans les organes aériens notamment dans les feuilles. Ces résultats indiquent, que dans les parties aériennes de miscanthus, les quantités de GS2 sont faibles ou que le ratio GS1/GS2 est beaucoup plus fort que chez Arabidopsis.

Le western-blot confirme la présence de GS dans les différents organes mais les tendances observées sont différentes de celles mesurées enzymatiquement. Les bandes correspondant à la GS semblent plus intenses dans les racines, les tiges basses et les feuilles basses. Cependant ce western-blot a été réalisé à partir d'une quantité constante de 20µg de protéines. Si on exprime les activités GS par µg de protéines (figure 7-B) et non en par mg de MS, on observe des résultats convergents à ceux obtenus par western-blot. En effet, les résultats légèrement différents viennent du fait que certains organes sont plus ou moins riches en protéines.

Une étude d'immunolocalisation histologique de la GS (figure 9) confirme les résultats observés. Un témoin réalisé avec des anticorps préimmuns à la place des anticorps anti-GS atteste de la spécificité de marquage observé (Fig 9-F). Au niveau foliaire, la GS apparaît principalement localisée au niveau des cellules de la gaine périvasculaire et des cellules compagnes de phloème (Fig 9-A, B). L'aspect diffus du signal observé dans des deux types de cellules conjugué à l'absence de plastes dans les cellules compagnes de phloème nous confirme que dans ces organes, c'est principalement la GS cytosolique qui est présente. Dans les tiges (Fig 9-C) et les rhizomes (Fig 9-D,E) la GS est également observée dans le cytoplasme des cellules compagnes de phloème mais aussi au niveau du cytoplasme des cellules de parenchyme xylémien (Fig 9-D).

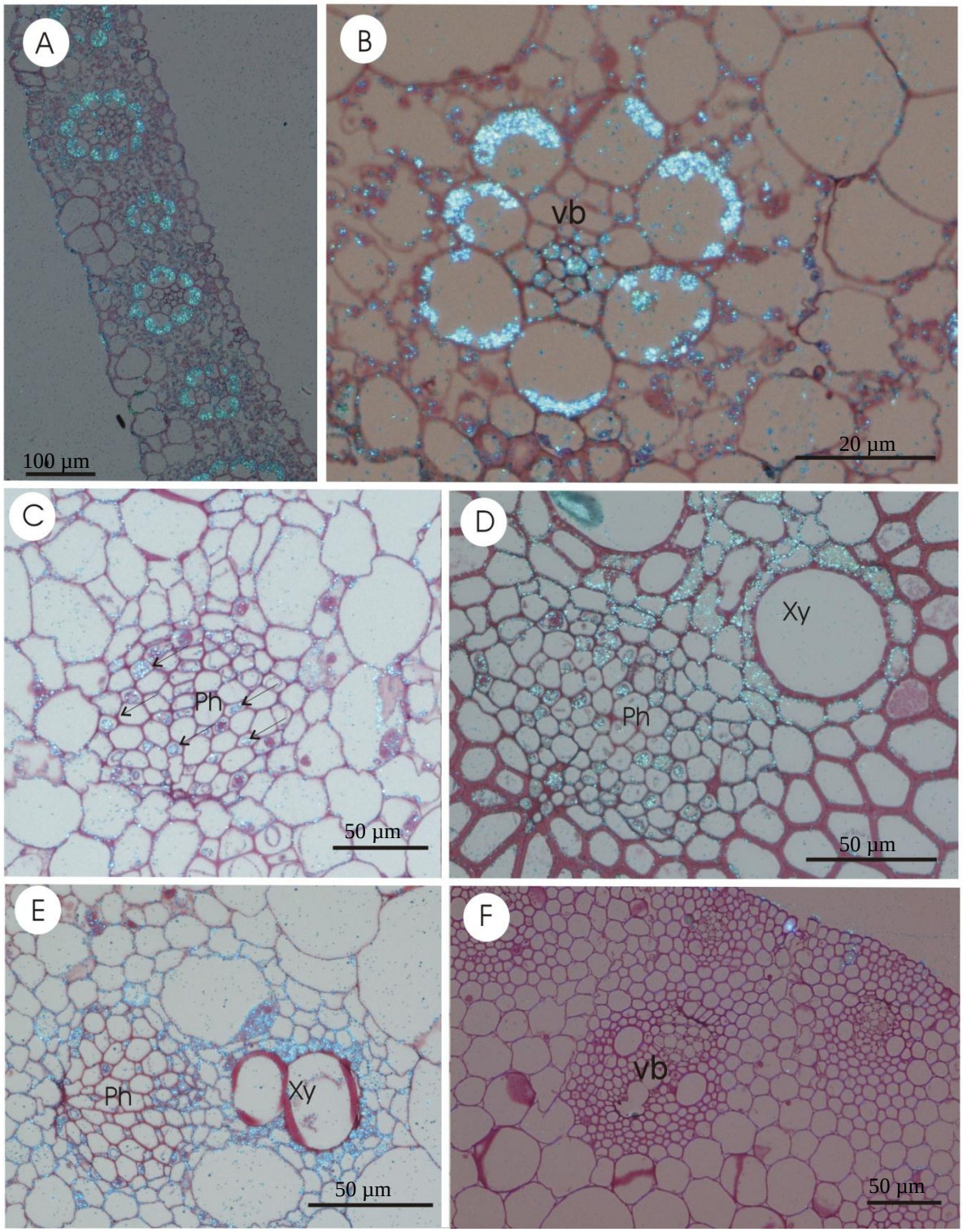



**Figure 9 : Immunolocalisation histologique de la GS**

Immunolocalisation de la GS dans les feuilles (A et B), les tiges (C) et les rhizomes (D et E) de *Miscanthus x giganteus*. F- témoin réalisé avec les anticorps pré-immun

Ph : phloème ; vb : faisceau vasculaire, Xy : xylème.

### *III-3-4-2 Etude des activités GDH durant les phases de remobilisation printanière et automnale*

Les dosages activités GDH (nmol/min/mg MS) mesurées durant les différents organes (figure 10) montrent des tendances légèrement différentes de celles observées pour la GS. La plus forte activité est observée dans les tiges hautes durant la phase de remobilisation printanière. Les autres organes aériens présentent des activités similaires et les rhizomes sont les organes qui présentent les activités GDH les plus faibles.

Durant la phase de remobilisation automnale, les activités GDH sont plus fortes dans les tissus aériens jeunes (tiges hautes / feuilles hautes) que les tissus aériens âgés (tiges basses / feuilles basses). Les plus fortes activités sont observées dans les feuilles hautes, en effet, les activités ont fortement chuté dans l'ensemble des organes aériens exceptés dans celles-ci. Dans les organes souterrains, contrairement à ce que l'on observe pour la GS, il y a une diminution des activités lors de la phase de remobilisation automnale.

Le western-blot réalisé avec les anticorps anti GDH durant la phase de remobilisation printanière (figure 11) montrent deux bandes par organes. On sait qu'il existe deux sous-unités α et β de la GDH ayant respectivement des poids moléculaires de 43kDa et 42,5kDa (Dubois *et al.*, 2003). Si l'on regarde les intensités des bandes organes par organe, il y a peu de différences hormis dans les racines ou celles-ci sont plus intenses ce qui indique que la GDH représente une part importante des protéines racinaires. Ceci est confirmé par les activités spécifiques GDH (figure 10-B) que l'on peut corréler avec les résultats obtenus par le western-blot réalisé avec les anticorps anti-GDH. En effet, les activités GDH spécifiques les plus fortes ont bien été mesurées dans les racines.

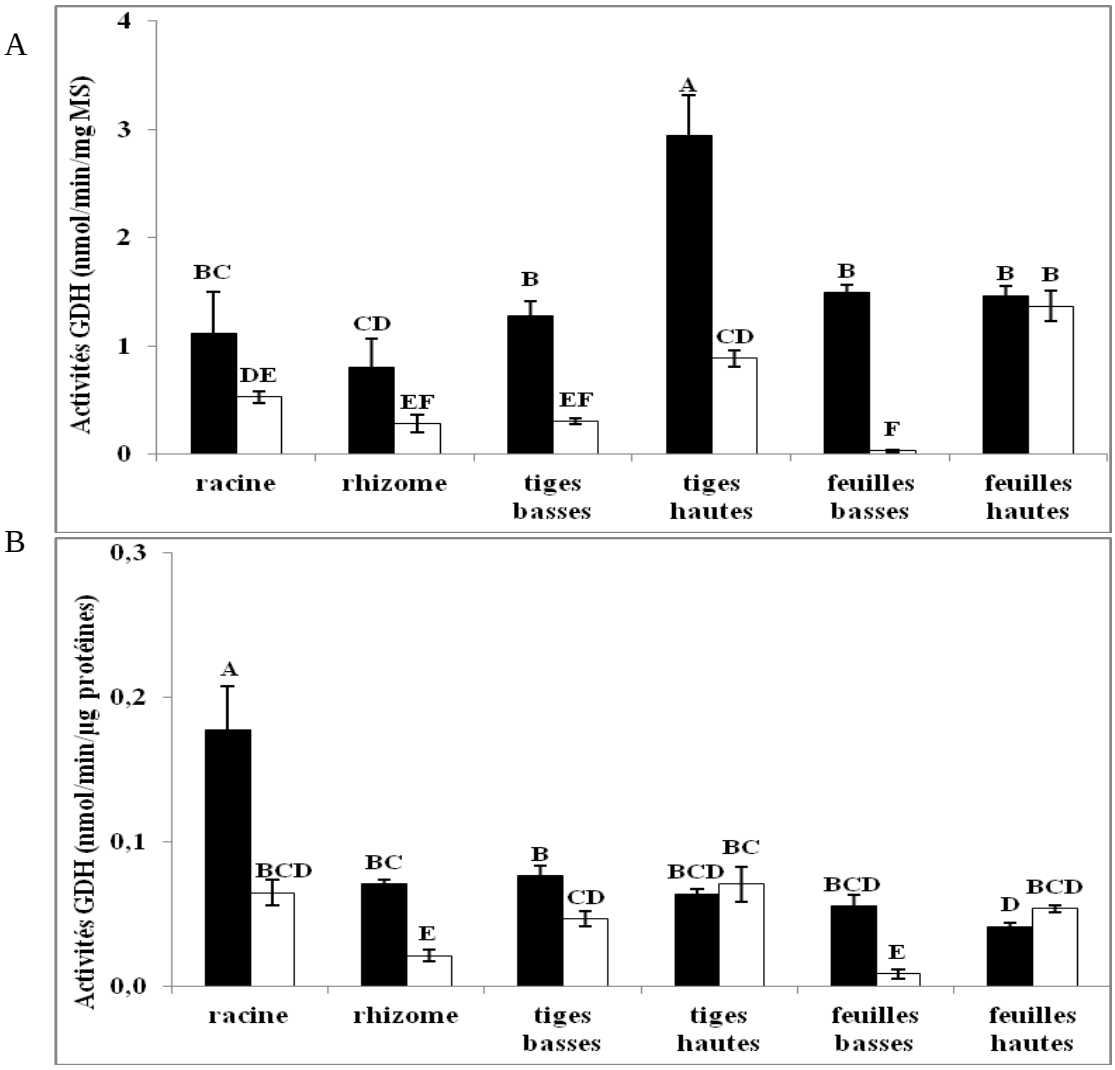



**Figure 10 : Dosages des activités GDH dans les organes de *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de mobilisation de l'azote (juin) et de remobilisation (octobre) A- Activité exprimée en nmol de produit formé/min/mg MS, activité exprimée en nmol de produit formé min/µg de protéines**

Les histogrammes noirs représentent les activités GDH en juin et les histogrammes blancs représentent les activités GDH en octobre. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

Une anova a été réalisée ainsi qu'un test de Newman Keuls avec une probabilité de 5% sur l'ensemble des données.

Les moyennes avec une lettre commune ne sont pas considérées comme statistiquement différentes.

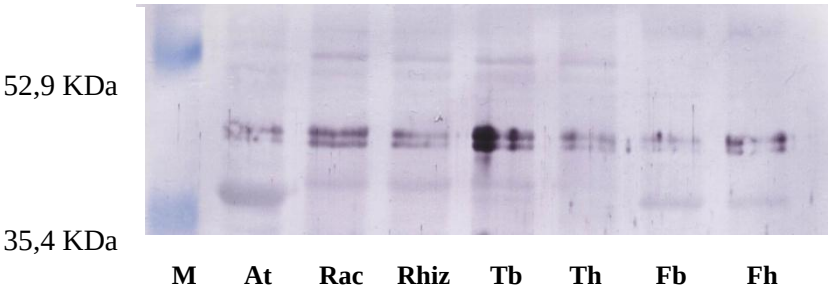



**Figure 11 : Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation avec des anticorps anti-GDH.**

### III-3-5 Etude de la synthèse d'asparagine

Les fortes teneurs en asparagine observées dans la plante nous ont amené à étudier la principale enzyme responsable de sa synthèse : l'asparagine synthétase. Le dosage de l'activité enzymatique étant impossible à mettre en place de manière colorimétrique, l'étude de cette enzyme a été réalisée uniquement par western-blot (figure 12).

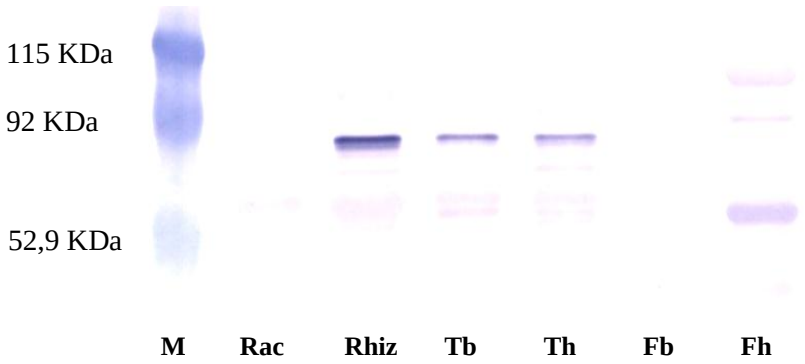



**Figure 12 : Western-blot réalisés sur organes *Miscanthus x giganteus* cultivés en condition N1 durant la phase de remobilisation avec des anticorps anti-AS.**

Le western-blot réalisé durant la phase de remobilisation automnale de l'azote nous indique qu'aucune présence d'asparagine synthétase n'a pas été retrouvée dans les feuilles ou les racines. Cependant, une bande a été observée pour les tiges et le rhizome. On sait qu'il existe quatre gènes AS chez le maïs codant quatre isoformes Asn3, Asn1, Asn4 et Asn2 de poids moléculaires proches: 66, 67,4, 65 et 65 kDa (Todd *et al.*, 2008). Les isoformes ayant des poids moléculaires très proches, nous ne les différentions pas sur le western-blot. Cependant le western-blot nous indique que la synthèse d'asparagine semble avoir lieu uniquement dans les tiges et le rhizome.

### III-3-6 Etude l'assimilation de l'azote par RMN

Le spectre HSQC réalisé sur les feuilles à $t_0$ ne montre aucune présence de molécule marquée $^{15}N$. Les spectres HSQC réalisés sur les feuilles au bout de 3 heures dans la solution marquée $^{15N}$ montrent des taches de corrélation entre -263,5 / 7,62 et -263,5 / 6,89 ppm. Ces taches sont identiques à celles observées sur un témoin glutamine. Elles correspondent aux taches de corrélation entre les protons et l'azote de la fonction amide. Le spectre HMBC des

feuilles au bout de 3 heures, ne révèle pas la présence de glutamine. Il n'y a donc pas de glutamine marquée sur la fonction amine au bout de trois heures.

Les spectres HMBC et HSQC au bout de trois heures nous indiquent que la principale molécule marquée est la glutamine. Cette glutamine est marquée au niveau de sa fonction amide et pas au niveau de sa fonction amine. Cette glutamine provient de l'assimilation d'ammonium marqué $^{15}N$ sur du glutamate non marqué. La GS est donc la principale enzyme permettant l'assimilation de l'ammonium chez miscanthus. Ces résultats sont en accord avec les résultats des activités NR et GS observées dans les feuilles en début de cycle (figures 2 et 7). Ces spectres nous révèlent également que l'activité de la GDH n'est pas aminante. En effet, si la GDH avait une activité aminante, on retrouverait du marquage $^{15}N$ sur les fonctions amine du glutamate et de la glutamine.

Au bout de 6h, le spectre HSQC nous montre la présence de glutamine et de composés N-acétylés marqués $^{15}N$ (données non montrées). Le spectre HSQC (figure 12-C) montre la présence d'autres composés marqués $^{15}N$ : glutamine, composés N-acétylés, bétaïne, choline et alanine. Cependant aucune présence de glutamate n'est observée sur ce spectre.

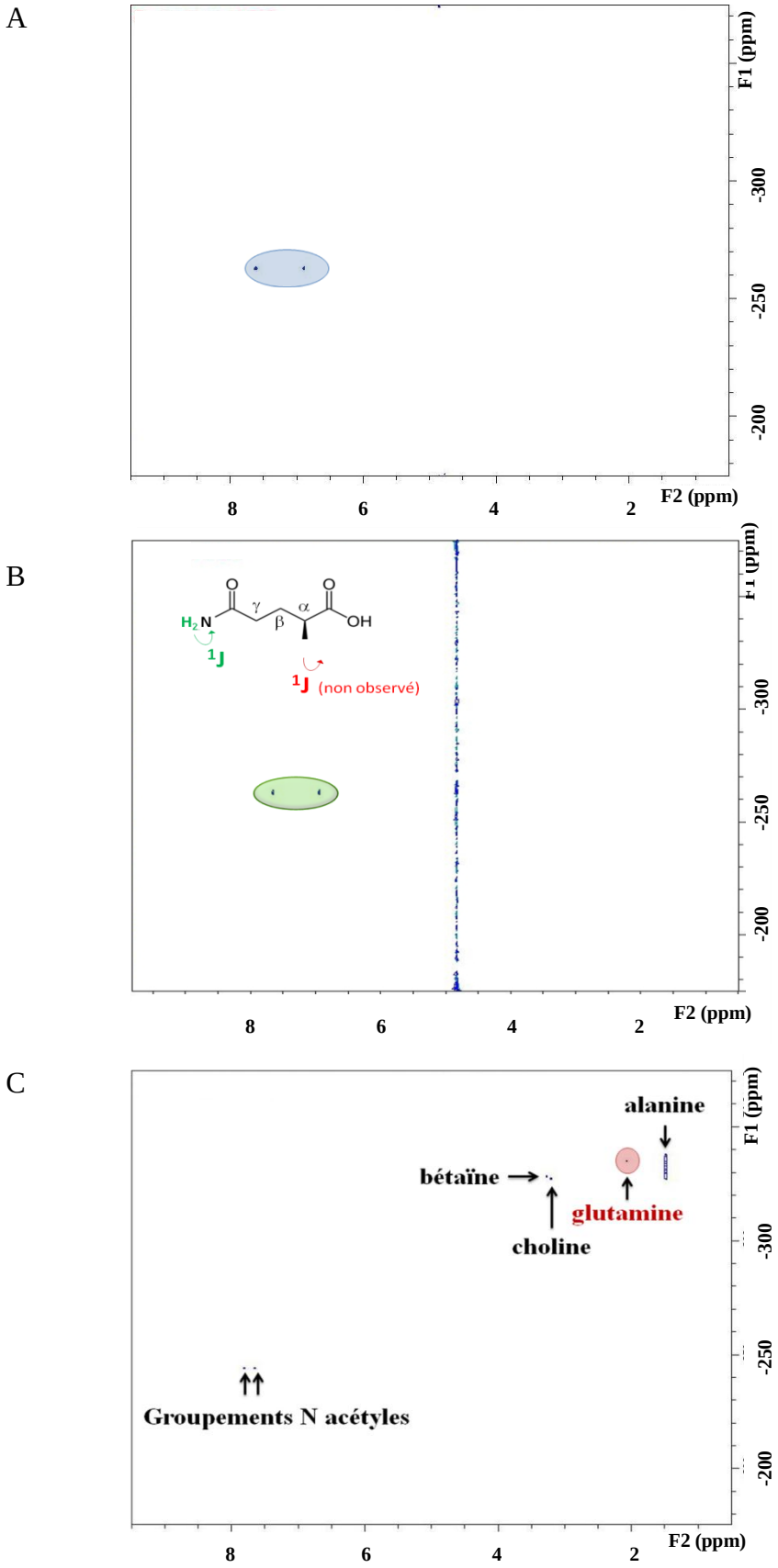



**Figure 13 : Spectres RMN HSQC et HMBC de feuilles marquées à t = 3h et t = 6h**
A- spectre HSQC des feuilles à t = 3h ; B- spectre HSQC du témoin glutamine ; C- spectre HMBC feuilles à t = 6h

## III-4 Discussion

Des activités NR ont été mesurées en début de cycle de croissance dans les feuilles des plantes cultivées avec apport d'azote. Nous avons vu qu'en condition de culture sans apport d'azote, la remobilisation des rhizomes représente plus de 80% de l'azote des parties aériennes en début de cycle. Les dosages d'acides aminés ont montré des profils différents selon les organes et la période de croissance de la plante notamment au niveau de la glutamine et de l'asparagine. Ces deux acides aminés étant également très importants transport de l'azote lors des phénomènes de remobilisation. Enfin, les études des principales activités enzymatiques semblent indiquer que la GS, de la GDH et de l'AS interviennent dans l'assimilation et la remobilisation de l'azote.

### III-4-1 Réduction des nitrates

Les principales sources d'azote absorbées par les plantes sont le nitrate et l'ammonium. L'assimilation de l'azote inorganique exige la réduction du nitrate en ammonium (Meyer et Stitt, 2001), suivie d'une formation d'acides aminés à partir de cet ammonium. La première étape de l'assimilation étant la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate réductase, des dosages d'activité de cette enzyme ont été réalisés.

En condition N1 (sans apport d'azote), les activités mesurées sont très faibles et uniquement détectables dans les feuilles avec un maximum de 0,08 nmol/min/mg MS (± 0,03) atteint en juin et en juillet. On sait que la présence de nitrate induit fortement l'expression des gènes de la NR (Patterson *et al.*, 2010). Les faibles quantités de nitrate et d'ammonium trouvées en conditions N1 (cf § II-3-6 pp 135-136) pourraient donc expliquer la faible activité NR mesurée dans cette condition. Il semblait alors intéressant d'étudier cette activité NR dans des conditions d'amendements azotés (condition N2 à120 unités d'azote par hectare) afin de visualiser plus précisément la localisation de la réduction des nitrates assimilés par la plante. Les plus fortes quantités de nitrate ayant été observées en juin (102 kg/ha) (cf § II-3-6 pp 136-137) et diminuant fortement en juillet et octobre, des dosages d'activité NR ont été mesurées durant le mois de juillet, là où la NR est censée être la plus active. Parallèlement à ces dosages en conditions N2, des dosages d'activités NR ont été réalisés sur des feuilles de blé. Les activités sont nettement inférieures (20 fois) dans les feuilles de miscanthus que dans les feuilles de blé. Les dosages sur le blé n'ont pas été réalisés afin de comparer les deux espèces, le blé est un témoin intéressant pour vérifier le bon fonctionnement de l'expérience afin de

confirmer que la faiblesse des activités mesurées ici sur miscanthus ne provenait pas du dosage.

Ces dosages d'activité NR mesurées en juillet (figures 1 et 2) ont montré que la réduction du nitrate chez *Miscanthus x giganteus* a lieu majoritairement dans les feuilles. Cette activité est maximale en juin dans les feuilles basses et hautes puis diminue fortement dans les feuilles basses dès juillet. Dans les feuilles hautes, cette activité reste importante jusqu'en juillet et diminue progressivement en fin de cycle. Les grandes différences observées entre les feuilles basses et hautes en juillet et octobre peuvent s'expliquer par le fait que les concentrations en protéines dans les feuilles basses de juillet et d'octobre sont très basses par rapport à celles des feuilles hautes pour les mêmes périodes.

D'après Andrews (1986), la localisation de cette réduction dépend de nombreux facteurs tels que la quantité de nitrate, de l'espèce, de l'âge de la plante. Chez la majorité des plantes, la réduction du nitrate peut se faire aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes. Chez les plantes herbacées, cette réduction s'effectue principalement dans les parties aériennes alors que chez les ligneux elle se produit majoritairement dans les racines (Faure *et al.*, 1997). Chez les plantes ayant une photosynthèse de type C4, les cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire connues comme ayant un rôle dans l'assimilation du CO2 sont également impliquées dans l'assimilation du nitrate.

Ces résultats d'assimilation du nitrate dans les feuilles de miscanthus ont été confirmés par l'analyse RMN (figure 13). En effet, quelques heures après avoir placé les feuilles dans une solution de nitrate marqué $^{15}N$, une apparition de molécules organiques marquées $^{15}N$ (glutamine) est observée. Ce marquage $^{15}N$ dans la glutamine provient donc d'une réduction de ce nitrate ainsi que d'une assimilation dans les feuilles.

### III-4-2 Remobilisation printanière de l'azote des parties souterraines

Le miscanthus étant une plante pérenne, son métabolisme azoté ne dépend pas uniquement de l'azote absorbé dans le sol. En effet, le rhizome, organe de stockage possède également des réserves azotées qui peuvent être remobilisées en période de croissance de la plante. L'étude de la remobilisation printanière de l'azote des rhizomes vers les parties aériennes réalisée grâce à l'utilisation de rhizomes marqués par application de $^{15}N$ en année n-1 nous permet de conclure que la remobilisation printanière représente 83,1% (± 9,9%) de l'azote des parties aériennes. Nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux observés par

Strullu *et al.* (2011) chez *Miscanthus x giganteus*. En effet, selon ces auteurs la remobilisation printanière des rhizomes représente environ 71% (±15%) de l'azote des parties aériennes pour des plantes récoltées tardivement et cultivées avec ou sans apport d'azote. Les différences observées peuvent provenir du dispositif expérimental ainsi que du mode de calcul de remobilisation et de l'âge des plantes. En effet, dans cette étude de Strullu *et al.* (2011), les flux de remobilisation n'ont pas été déterminés par un marquage $^{15}N$ des rhizomes mais calculés par la différence des quantités d'azote contenues dans les rhizomes en février et en été. Enfin, une autre explication peut provenir du fait que les plantes utilisées lors de leur expérience étaient moins âgées que les nôtres (3 et 4 ans). Ainsi, en accord avec l'étude de Strullu *et al.* (2001), nos résultats confirment une implication très importante de l'azote issu de remobilisation printanière lors de la période de croissance des parties aériennes.

On sait que les principales formes de transport d'azote dans la sève xylémienne chez les espèces pérennes sont les acides aminés et plus particulièrement l'asparagine, la glutamine, la citrulline et l'arginine (Malaguti *et al.*, 2001). Les dosages d'acides aminés libres réalisés sur les exsudats xylémiens (sèves ascendantes) collectés au niveau de la base des tiges basses sectionnées (transition rhizome-tige) indiquent que la remobilisation d'azote sous forme d'acides aminés s'effectue essentiellement sous forme de glutamine (environ 42% des acides aminés transportés dans le xylème) et d'asparagine (24%). Des fortes teneurs en acides aminés dans le xylème ont déjà été observées chez des espèces pérennes lors de la repousse de printemps (Malaguti *et al.*, 2001). Ce pic d'acides aminés libres a été attribué à la remobilisation de l'azote des parties souterraines et joue un rôle très important dans la croissance des méristèmes, le développement des feuilles et des jeunes tiges (Sauter et Van Cleve, 1992 ; Glavac et Jockheim 1993; Schneider *et al.*, 1994). Dans les pommiers, l'asparagine compte pour plus de la moitié de l'azote transporté sous forme d'acides aminés libres dans la sève durant la remobilisation, suivi par la glutamine et l'aspartate (Malaguti *et al.*, 2001). Au contraire, la glutamine est la principale forme dans laquelle l'azote est transportée dans le xylème des pruniers (Youssefi *et al.*, 2000) et des peupliers (Sauter et Van Cleve, 1992; Schneider *et al.*, 1994). Le faible taux d'arginine retrouvé chez miscanthus dans la sève xylémienne indiquerait que l'arginine est plus un acide aminé de stockage que de transport.

Les teneurs en glutamine et en arginine mesurées dans les rhizomes entre les différentes phases sont corrélées négativement. En effet, lors de la période de remobilisation printanière de l'azote de la plante, la teneur en arginine dans les organes souterrains est

inférieure à celle observée en hiver et le contraire est observé pour la glutamine. Durant cette période, la présence d'activité GS ainsi que la diminution de la teneur en arginine pourrait indiquer une synthèse de glutamine issue de la dégradation de l'arginine. En effet, on sait que chez les plantes, la dégradation d'arginine par le biais d'une cascade de réactions impliquant différentes enzymes telles que l'arginase, l'uréase et la GS amène à la synthèse de glutamine (figure 13 ; Witte, 2011). Les fortes teneurs en glutamine observées dans le xylème pendant la phase de remobilisation printanière nous indiquent que le catabolisme de l'arginine dans les parties souterraines permet la remobilisation de cet azote sous forme de glutamine vers les parties aériennes. Ce type de mécanisme a également été observé chez le peuplier où l'azote est stocké majoritairement sous forme de BSP (bark storage proteins) riches en arginine et où la principale forme de transport est la glutamine (Sauter et Van Cleve, 1992).

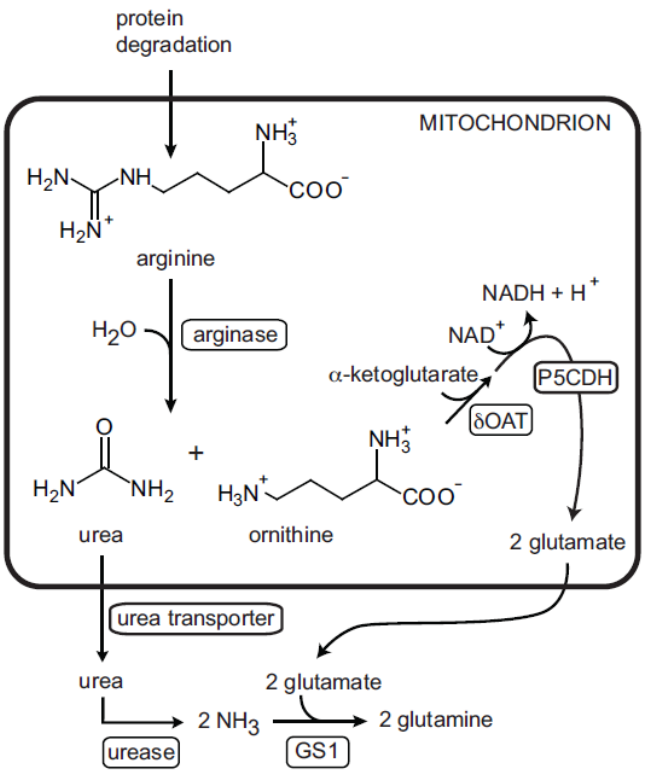



**Figure 14 : Schéma du catabolisme de l'arginine**
GS1 : glutamine synthétase cytosolique ; OAT : ornithine aminotransférase mitochondriale ; P5CDH : pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase
(Witte, 2011)

### III-4-3 Assimilation de l'azote dans les parties aériennes

L'étude menée par RMN sur les feuilles ayant reçu un apport de nitrate marqué $^{15}N$ indique que l'ammonium issu de la réduction de ce nitrate marqué est d'abord incorporé dans le groupement amide de la glutamine. On sait que chez les plantes l'enzyme qui permet la fixation de l'ammonium sur une molécule de glutamate pour former de la glutamine est la GS (quelle que soit la source de la libération d'ammonium). La présence de glutamine marquée sur la fonction amine peut s'expliquer par l'action cumulée de la GS et de la GOGAT.

En effet, la GS et la GOGAT sont deux enzymes qui travaillent de concert chez les plantes. Les activités combinées de ces deux enzymes jouent un rôle clé dans la mobilisation et le recyclage de l'azote pour répondre à la forte demande d'azote pendant la croissance végétative et reproductive des plantes (Miflin et Lea 1980). La GOGAT, en présence de glutamine marquée $^{15}N$ sur la fonction amide et d'α-cétoglutarate, forme deux molécules de glutamate dont l'une est marquée $^{15}N$. Ce glutamate marqué 15N), sous l'action de la GS, permettra de produire une molécule de glutamine marqué sur la fonction amine. La présence de glutamine marquée $^{15}N$ sur la fonction amine seulement au bout de 6 heures d'expérience et l'absence de glutamate marqué $^{15}N$ confirment l'action combinée de ces deux enzymes. La GS permet la synthèse de glutamine marquée sur la fonction amide dès 3 heures. Cette glutamine marquée sous l'action de la GOGAT et en présence d'α-cétoglutarate (provenant notamment de la désamination du glutamate par la GDH) va donc former deux glutamates dont l'un aura sa fonction amine marquée $^{15}N$. Ce glutamate marqué ne s'accumulera pas et sera aussitôt utilisé comme substrat par la GS pour former une glutamine (marquée sur la fonction amine).

- ✓ La GS1 est la principale enzyme permettant l'assimilation d'ammonium

Les activités GS mesurées dans les parties aériennes suggèrent une forte assimilation d'ammonium dans les tiges et les feuilles durant la phase de remobilisation printanière. Ces résultats sont cohérents avec les fortes teneurs en azote total et en protéines solubles mesurées dans les parties aériennes en début de cycle (cf § II-3-2 pp 123-125 et § II-2-3 pp 126-129). L'ammonium peut provenir de la réduction des nitrates absorbés, d'un transport d'ammonium, de la photorespiration ou du recyclage des acides aminés. L'activité NR étant très faible en condition N1 et la remobilisation printanière de l'azote des parties souterraines

représentant environ 80% de l'azote des parties aériennes, l'ammonium pourrait donc essentiellement provenir du catabolisme de certains acides aminés transportés via le xylème.

Les westerns-blots réalisés avec les anticorps anti GS révèlent que l'isoforme trouvée majoritairement dans les organes aériens est la GS cytosolique (GS1). Des résultats similaires ont été observés chez la canne à sucre (Nogueira *et al.*, 2005) et le maïs (Hirel *et al.*, 2005a). En effet, par rapport au témoin Arabidopsis utilisé, la GS chloroplastique (GS2) est assez faible. Ces faibles teneurs en GS2 s'expliquent par les natures différentes des systèmes photosynthétiques des deux plantes. En effet, les teneurs en GS2 sont plus importantes chez les espèces C3 que les espèces C4. Cette différence s'explique par le fait que la glutamine synthétase chloroplastique est impliquée dans l'assimilation d'azote primaire mais également dans le recyclage de l'ammonium issu de la photorespiration (Cren et Hirel 1999). Or chez les plantes en C4, cette photorespiration est en grande partie éliminée (Long, 1999; Sage *et al.*, 1999). La GS1, elle, est particulièrement importante pour l'assimilation d'ammonium provenant du recyclage de l'azote et notamment du catabolisme des acides aminés (Bernard et Habash, 2009).

- ✓ La GDH permet la libération d'ammonium

Les dosages d'activités GDH observées dans les parties aériennes ne nous permettent pas d'affirmer si la GDH permet la formation de glutamate suite à la fixation d'ammonium sur l'α-cétoglutarate (amination) ou si au contraire elle permet la libération d'ammonium à partir du glutamate (désamination). Cependant l'étude menée sur les feuilles par RMN ne montre pas d'accumulation de glutamate ni de glutamine marqués 15N sur leur fonction amine. Si les fortes activités GDH mesurés dans les organes aériens était aminantes, il y aurait accumulation de glutamate et/ou de glutamine marqué $^{15}N$ sur leur fonction amine. La GDH chez le miscanthus jouerait plutôt un rôle de désamination du glutamate. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études menées sur la GDH. En effet, selon les auteurs, la principale activité de la GDH dans les cellules végétales, hormis en cas de très fortes teneurs en ammonium ou de carences en molécules carbonées, est l'activité désaminante (Dubois *et al.*, 2003 ; Restivo, 2004; . Hirel *et al.*, 2004 ; Martin *et al.* 2006). Cette dégradation de glutamate chez miscanthus permettrait d'éviter une trop forte accumulation de glutamate issu du catabolisme de l'asparagine, de fournir de l'ammonium pour la GS mais également de libérer de l'α-cétoglutarate. Cet α-cétoglutarate va pouvoir être assimilé par la GOGAT mais va également pouvoir recharger le cycle de Krebs pouvoir. Il n'est donc pas étonnant que la

plus forte activité GDH ait été retrouvée dans les tiges hautes durant la période de remobilisation printanière. En effet, ces tissus sont très jeunes et nécessitent de grandes quantités d'énergie pour leur croissance. Cette forte activité GDH fournirait donc de l'α-cétoglutarate pour recharger le cycle de Krebs.

La glutamine présente dans les parties aériennes en juin pourrait provenir du catabolisme de l'arginine dans les organes souterrains mais également indirectement de celui de l'asparagine dans les tiges et les feuilles. En effet, les proportions en asparagine dans les tiges et les feuilles étant moins importantes que celles des organes souterrains (et que celle retrouvée dans le xylème) pourrait indiquer un catabolisme de cet asparagine dans ces organes. Ce catabolisme permettrait la libération d'ammonium qui serait ensuite réassimilé en glutamine sous l'action de la GS1. En effet, on sait que chez le maïs, la principale voie de dégradation de l'asparagine est l'asparaginase (Brouquisse *et al.*, 1992). Sous l'action de l'asparaginase, l'asparagine peut être désaminée en ammonium et en aspartate. Cet aspartate peut servir à synthétiser directement d'autres acides aminés (comme la lysine, la thréonine, la méthionine, et l'isoleucine) (Azevedo *et al.*, 2006). Il peut également, sous l'action de l'aspartate amino transférase (AAT), amener à la synthèse d'oxaloacétate et de glutamate qui lui-même permet l'assimilation d'ammonium sous forme de glutamine (figure 14, Galili *et al.*, 2008).

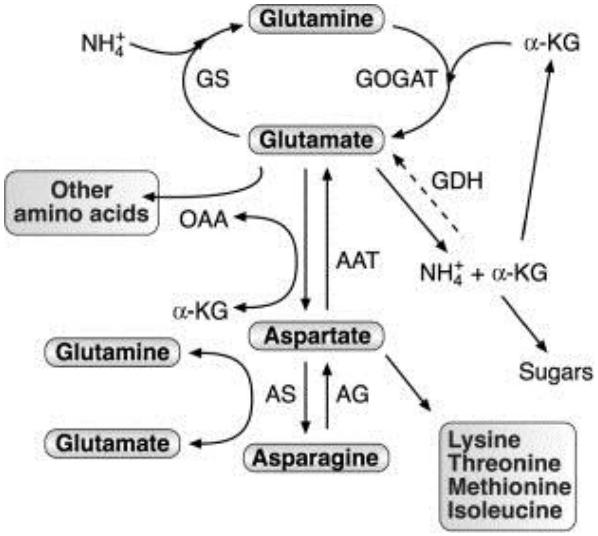



**Figure 15 : Schéma du métabolisme des acides aminés et des amines chez les plantes**
GS : glutamine synthétase ; GOGAT : glutamate synthase ; AAT : aspartate amino-transférase ; GDH : glutamate déshydrogénase ; AS : asparagine synthétase ; AG : asparaginase ; OAA : l'oxaloacétate ; α-KG : α-cétoglutarate. La flèche en pointillés représente l'activité d'amination possible de la GDH
(Galili *et al.*, 2008)

L'azote des groupes amide de la glutamine et amine du glutamate va pouvoir ensuite être transféré à d'autres molécules pour permettre la formation de composés azotés majeurs dans les plantes : les bases azotées des acides nucléiques, les chlorophylles et la synthèse d'autres acides aminés (Canton *et al.*, 2005 ; Forde et Lea, 2007). Ces autres acides aminés permettront à leur tour la synthèse de protéines. En effet, chez les jeunes plantes, les acides aminés sont majoritairement utilisés pour la synthèse d'enzymes et de protéines essentiellement impliquées dans la construction de l'architecture des plantes et les différents composants de la machinerie photosynthétique (Hirel *et al.*, 2007).

### III-4-4 Remobilisation automnale de l'azote vers les parties souterraines

Une diminution des teneurs en protéines et plus généralement en azote dans les organes aériens est observée en fin dans cycle (partie 2). On sait que la protéolyse lors de la sénescence entraîne une libération d'acides aminés libres et qu'une série de réactions de transaminations conduit à une synthèse de glutamate (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

Habituellement les études sur la remobilisation de l'azote montrent une augmentation de l'activité GDH et GS1 dans les organes en sénescence afin de synthétiser de la glutamine à partir de ce glutamate issu de la protéolyse. Chez miscanthus ce n'est pas le cas, les activités GDH diminuent entre juin et octobre dans tous les organes aériens sauf dans les feuilles hautes. Cette hausse n'est pas observée car contrairement aux études précédentes, essentiellement menées sur des plantes annuelles, la principale source d'azote pendant la phase de croissance de la plante n'est pas l'assimilation d'ammonium issu de la réduction des nitrates absorbés mais la remobilisation printanière d'acides aminés des rhizomes. Cette remobilisation d'acides aminés entraine donc une forte activité désaminante de la GDH dans les organes aériens riches en acides aminés libres issus de la remobilisation printanière dès le début du cycle.

Chez le miscanthus, en fin de cycle, les activités GDH sont tout de même élevées dans les tiges et les feuilles hautes et assez corrélées aux activités GS. Ces activités GDH indiquent une libération d'ammonium à partir de ce glutamate issu de la protéolyse et les activités GS une assimilation de cet ammonium sous forme de glutamine. Cependant, durant cette période, les proportions en glutamine dans les organes aériens ne sont pas très élevées notamment dans les feuilles hautes. Ces faibles teneurs en Glutamine peuvent être expliquées par le fait que la glutamine étant un acide aminé de transport préférentiel chez le miscanthus pourrait être immédiatement exportée *via* le phloème.

Au niveau des tiges et des organes souterrains, les proportions de glutamine sont également assez faibles, comparées à celles observées durant la phase de remobilisation printanière. En revanche, les proportions en aspartate et en asparagine sont assez élevées. Ces faibles proportions de glutamine et ces fortes proportions d'asparagine peuvent s'expliquer par une forte présence d'AS dans les tiges et les rhizomes (observée par western-blot). En effet, il a été montré que l'AS est la principale voie de synthèse d'asparagine chez le maïs (Brouquisse *et al.*, 1992). L'asparagine synthétase permet le transfert du groupement amide de la glutamine (ou de l'ammonium) sur l'aspartate pour générer du glutamate et de l'asparagine en présence d'aspartate et de glutamine. Cependant l'AS présente une très forte préférence pour la glutamine par rapport à l'ammonium comme donneur de groupement amide (Duff *et al.*, 2011). Les études cytologiques ont permis de localiser cette asparagine synthétase dans les tiges et le rhizome essentiellement au niveau du phloème. La synthèse d'asparagine dans le phloème est cohérente avec une remobilisation automnale d'azote sous forme d'asparagine vers les organes souterrains. Une partie de la glutamine synthétisée dans ces organes et de la glutamine provenant des feuilles va permettre la synthèse d'asparagine qui va être remobilisée et stockée dans les organes souterrains. L'absence (ou la faible présence) d'AS dans les feuilles durant cette période explique la faible présence d'asparagine observée dans ces mêmes organes. La glutamine et l'aspartate des feuilles migrent donc dans les tiges où elles forment de l'asparagine qui sera remobilisé vers le rhizome pour être stockée.

Les proportions en arginine sont assez importantes dans les tiges et les organes souterrains durant cette période par rapport à la période de remobilisation printanière. Cette arginine présente dans les tiges pourrait servir de stockage temporaire afin d'éviter une trop forte accumulation de glutamine issue de la remobilisation d'acides aminés des feuilles dans ces organes.

Comme il semble que l'arginine ne soit pas un acide aminé de transport chez le miscanthus, on peut penser que l'arginine dosée dans les tiges ne sera pas mobilisée directement mais sous forme de glutamine ou d'asparagine dans les organes souterrains et qu'elle constituerait donc une forme de stockage temporaire ou transitoire dans les tiges. D'ailleurs la proportion d'arginine dans les rhizomes est plus importante en octobre que durant la phase de remobilisation printanière mais elle est moins importante qu'en fin de cycle. Il y a donc une importante accumulation d'arginine très tardive en toute fin de cycle. Cette accumulation tardive permet de stocker un maximum d'azote avec un minimum de

carbone dans les racines et les rhizomes. En effet l'arginine présente un meilleur ratio N/C (4N/6C) que la glutamine (2N/5C) et l'asparagine (2N/5C).

Les activités NR, GS et GDH dans les feuilles basses en octobre sont très faibles par rapport à celles des feuilles hautes. Ces faibles activités s'expliquent par le fait que les feuilles basses soient dans un état de sénescence déjà très avancé en octobre. Nous avons montré dans une étude précédente que les quantités d'azote dans les feuilles basses en juillet étaient déjà trois plus faibles que celles des feuilles hautes (cf figure 3 § II-3-2 pp 124). Ces feuilles basses avaient donc déjà commencé à remobiliser une partie de leur azote dès le mois de juillet.

On peut alors résumer la remobilisation ainsi : la protéolyse dans les feuilles entraine la libération d'acides aminés. Ces acides aminés vont se transaminer en glutamate et glutamine. Sous l'action de la GDH, ce glutamate va permettre la libération d'ammonium qui sera assimilé grâce à la GS1 sous forme de glutamine. Cette glutamine va être exportée des feuilles vers les tiges et le bas des rhizomes *via* le phloème. Dans ces deux organes, l'AS va transaminer la glutamine en asparagine. Cette dernière va s'accumuler dans les rhizomes en automne et en hiver. En fin de cycle, la remobilisation d'asparagine et de glutamine va permettre de reconstituer le stock d'arginine dans les rhizomes. Cette accumulation tardive permet à la plante de stocker un maximum d'azote avec un minimum de carbone.

## III-5 Conclusion

Les dosages des principales enzymes du métabolisme de l'azote (NR,GS, GDH et AS) nous ont permis de mieux comprendre les principales phases d'assimilation et de remobilisation de l'azote au cours du cycle de croissance de *Miscanthus x giganteus* cultivé en condition de culture standard (sans apport d'azote). Cultivé sans apport d'azote, la réduction de nitrate est assez faible chez le miscanthus et s'effectue principalement dans les feuilles en début de cycle. L'assimilation d'ammonium issu de ce nitrate se fait majoritairement grâce à la GS. La principale source d'azote des tiges et des feuilles en début de cycle provient de la remobilisation printanière d'azote stocké précédemment dans ses rhizomes. En effet, environ 80% de l'azote des parties aériennes au printemps provient de la remobilisation printanière des réserves azotées des parties souterraines. Durant l'hiver, presque 50% de l'azote dans les rhizomes est stocké sous forme d'acides aminés libres et essentiellement sous forme d'asparagine et d'arginine. La remobilisation printanière de ces acides aminés va se faire *via* la sève ascendante du xylème sous forme d'asparagine et de glutamine. Ces deux acides aminés vont permettre la synthèse de protéines nécessaires à la croissance des parties aériennes de la plante. En fin de cycle, la sénescence des parties aériennes entraine une protéolyse qui permet la libération d'acides aminés. Le métabolisme de ces acides aminés va permettre la synthèse de glutamine au niveau des feuilles. Cette glutamine, puis d'asparagine au niveau des tiges. L'ensemble de ces acides aminés va ensuite être remobilisé via le phloème dans les organes souterrains durant l'hiver.

Nous avons vu que la GS, la GDH et l'AS interviennent dans l'assimilation et la remobilisation de l'azote. Les connaissances obtenues sur la physiologie de la plante pourront être un outil pour la sélection de nouveaux génotypes de *Miscanthus x giganteus*.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de poursuivre l'analyse menée par RMN mais cette fois ci sur plante entière avec apport de nitrate marqué $^{15}N$ apporté au niveau racinaire. On pourrait également utiliser des plantes dont les rhizomes ont été précédemment enrichis. Il serait également intéressant de concentrer nos recherches sur argininosuccinate lyase (ASL) et l'arginosuccinate synthétase (ASS) qui sont les enzymes responsables de la synthèse d'arginine ainsi que de l'arginase, responsable du catabolisme de cette arginine.

# DISCUSSION GENERALE

Avec la diminution des ressources de carburant d'origine fossile et l'impact environnemental de ces derniers sur l'environnement, les chercheurs se tournent vers de nouvelles sources d'énergies renouvelables. La production de biocarburant de deuxième génération à partir de biomasse végétale semble être une des pistes privilégiées. La biomasse est la matière végétale provenant des interactions entre le $CO_2$ de l'air, l'eau et la lumière du soleil *via* la photosynthèse. Ce processus métabolique permet la production de glucides qui forment les éléments constitutifs de cette biomasse (McKendry, 2002). Ces biocarburants d'origine lignocellulosique présentent l'avantage, lors de leur combustion, de rejeter dans l'atmosphère le $CO_2$ assimilé durant l'année par les plantes. Cela diffère des carburants d'origine fossile qui utilisent le carbone emprisonné depuis des années dans le sol. Ces biocarburants permettent donc de réduire les émissions de gaz à effet de serre de 85% par rapport aux carburants classiques (Wang *et al.*, 2007).

Le *Miscanthus x giganteus* semble être une plante candidate idéale pour la production de biocarburants de deuxième génération (Heaton *et al.*, 2008). En effet, il est capable de produire de grandes quantités de biomasse (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; 2004) et cette forte production de biomasse, lors de récoltes tardives, ne semble pas être influencée par les apports d'azote (Christian *et al.*, 2008 ; Strullu *et al.*, 2011). Or, chez les végétaux, la disponibilité en azote est un facteur très important à la fois de la capacité photosynthétique et du rendement des cultures (Foyer *et al.*, 2006). En effet, une grande quantité d'azote est investi dans l'appareil photosynthétique, en particulier pour la mise en place de la rubisco et des photosystèmes (Zhu et al., 2008). Cet azote est donc nécessaire à l'assimilation de $CO_2$, à la production des glucides, des acides organiques et des acides aminés, indispensables à l'accumulation de biomasse (Nunes-Nesi *et al*., 2010). Une particularité pouvant expliquer le faible besoin en azote du miscanthus provient tout d'abord de son métabolisme photosynthétique de type C4. En effet, dans les feuilles des plantes en C4, l'efficacité d'utilisation d'azote est plus élevée que dans les feuilles des plantes en C3 car elles contiennent moins de protéines photosynthétiques (seulement 60% de rubisco par rapport aux feuilles de C3) (Taylor *et al.* 2010). La capacité de *Miscanthus x giganteus* à produire de grandes quantités de biomasse avec de faibles besoins d'azote peut s'expliquer également grâce à son rhizome. En effet, l'un des avantages des graminées vivaces comme le *Miscanthus*

*x giganteus* est la capacité à recycler et à remobiliser des éléments nutritifs entre les organes souterrains et aériens (Himken *et al.*, 1997).

Partant de ces premières caractérisations du *Miscanthus x giganteus*, l'objectif principal de nos travaux étaient donc d'essayer de comprendre le fonctionnement du métabolisme carboné et azoté de la plante en condition de culture standard (sans apport d'azote et récoltée tardivement). Les principales formes de stockage et de transport dans la plante des composés azotés et des glucides ont pour cela été caractérisées. Les principales enzymes responsables de l'assimilation, de la mobilisation et de la remobilisation l'azote ont également été étudiées.

- Stockage de glucides et d'acides aminés

La première partie de l'étude était consacrée au stockage et à la dynamique saisonnière des glucides non structuraux dans les rhizomes et les pousses de *Miscanthus x giganteus* (chapitre I). Nous avons montré que les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* ont la capacité de stocker des glucides de réserves durant l'hiver. Ces derniers représentent environ 27,5% de la matière sèche du rhizome. Ce stockage se fait majoritairement sous forme d'amidon. Celui-ci représente au moins 20% de la matière sèche des rhizomes et 10% de celle des racines. Ces résultats sont proches de ceux observés dans les rhizomes d'autres plantes telles que *Canna edulis* (Puncha-Arnon *et al.*, 2007) ou *Phragmites australis* (Klimes *et al.*, 1999). Chez *Miscanthus x giganteus*, le saccharose est également une forme de stockage de glucides non structuraux. Il représente jusqu'à 5% de la matière sèche des rhizomes. Le fructose représente quand à lui moins de 2% de la matière sèche et le glucose et le fructose moins de 0,5%.

Parallèlement à ce stockage de glucides, le rhizome peut également accumuler de l'azote (chapitre II). Cet azote est présent en moins grande quantité que les glucides non structuraux et représente environ 1,5% de la matière sèche du rhizome. Jusqu'à 50% de cet azote est stocké sous forme d'acides aminés libres dont deux sont majoritaires : l'asparagine et l'arginine. Ces deux derniers représentent respectivement 44% et 26% de ces acides aminés. Durant l'hiver, les acides aminés représentent environ 1,8% de la matière sèche du rhizome. Le stockage d'azote sous forme d'acides aminés riches en azote comme l'arginine (4N/6C) ou l'asparagine (2N/5C) est plus avantageux du point de vue coût en carbone que le

stockage sous forme de protéines (Cheng *et al.*, 2002). Les faibles quantités de nitrate et d'ammonium mesurées dans les organes souterrains de la plante durant cette période suggèrent que la plante ne stocke pas d'azote sous forme ionique durant l'hiver (chapitre II figure ).

Les stockages simultanés de glucides non structuraux sous forme d'amidon et d'azote sous forme d'acides aminés sont également observables chez les arbres fruitiers comme le pécher (Moreno *et al.*, 1994 et Jordan et Habib; 1996).

- Remobilisation printanière simultanée de glucides et d'acides aminés

Entre la fin de l'hiver (février) et le milieu de l'été (juillet), les réserves glucidiques (chapitre I) et azotées (chapitre II) diminuent dans les organes souterrains de *Miscanthus x giganteus* indiquant une mobilisation de celles-ci vers les organes aériens. Pendant cette période, une augmentation faible mais significative de la teneur en glucose et le fructose est observée dans les racines et les rhizomes. Cette augmentation pourrait être expliquée par l'hydrolyse de l'amidon. L'augmentation de la concentration en ces deux monosaccharides n'étant pas proportionnelle à la diminution de l'amidon, il est possible que les deux sucres soient rapidement convertis en saccharose. Nous avons constaté que la teneur en saccharose varie peu en début de cycle lors de la mobilisation des réserves (chapitre I). On sait que ce dernier est la principale forme de carbone utilisé pour la translocation des glucides chez les géophytes (Lemoine, 2000). On peut alors émettre l'hypothèse d'une translocation de ce saccharose vers les parties aériennes.

La variation saisonnière de la teneur en amidon observée peut être expliquée par le fait que les réserves de carbone dans les organes de stockage souterrains soient mobilisées pour permettre une croissance rapide des pousses. Ce mécanisme a également été observé pour d'autres géophytes (Kleijn *et al.*, 2005). Ce résultat suggère aussi que, bien que la plante soit déjà bien développée, le carbone originaire de la photosynthèse n'est probablement pas suffisant pour soutenir la croissance des pousses, ce qui amène la plante à utiliser ses réserves de carbone. Ces variations saisonnières ont déjà été observées dans le *Galanthus nivalis*, une autre géophyte (Orthen et Wehrmeyer, 2004).

L'analyse de rhizomes marqués avec de l'azote $^{15}N$ (chapitre III) nous a permis d'estimer que 83% de l'azote contenu dans les parties aériennes en début de cycle provenait des parties souterraines. Les études de régressions (chapitre II) ont montré que les variations

des teneurs en azote dans les rhizomes étaient fortement liées aux variations des acides aminés solubles, indiquant une mobilisation de ces acides aminés. Le stockage sous forme d'acide aminés présente l'avantage que ceux-ci sont facilement accessibles (pas d'hydrolyse enzymatique de protéines) et solubles ce qui facilite une mobilisation rapide d'azote au printemps ainsi qu'après défoliation (Kang *et al.*, 1982 ; Gloser, 2000). Les dosages d'acides aminés dans les exsudats xylèmiens (chapitre III) nous montrent que la mobilisation s'effectue majoritairement sous la forme de deux acides aminés l'asparagine et la glutamine.

L'arginine, trouvée en forte proportion dans les parties souterraines de la plante, apparaît donc uniquement comme un acide aminé de stockage et non un acide aminé de transport. Comme nous l'avons vu précédemment, le stockage de l'azote sous forme d'arginine présente un avantage en coût de carbone car la molécule présente un ratio C/N très faible. Cependant cette arginine n'étant pas transportée chez miscanthus, cette dernière nécessite d'être transaminée en glutamine pour le transport de l'azote. Le stockage sous forme d'asparagine (bien qu'ayant un ratio C/N inférieur à l'arginine) présente lui l'avantage de pouvoir être mobilisé directement. L'asparagine aurait donc la double fonction d'acide aminé de stockage et de transport. Cette mobilisation d'acides aminés a déjà été observée chez les arbres, elle se déroule avant que l'absorption d'azote racinaire ne devienne le principal processus pour répondre aux besoins en azote des arbres. (Millard *et al*., 2006 ; Millard *et al*., 2007 ; Millard et Grelet, 2010). La mobilisation d'acides aminés permet à la plante d'être quasi autonome vis-à-vis de l'azote présent dans le sol en début de cycle et permet à cette dernière de réaliser des économies d'énergies liées à l'absorption, au transport et à la réduction de nitrate. Ces résultats sont cohérents avec les faibles activités nitrate réductase mesurées dans les plantes cultivées sans apport d'azote (chapitre III).

- Assimilation des ressources absorbées et remobilisées

Chez *Miscanthus x giganteus*, la biomasse aérienne est principalement de type lignocellulosique. Elle se compose majoritairement de cellulose (42,5%), d'hémicelluloses (33,5%) et de lignines (9,1%) (Allison *et al.*, 2011). Ces structures sont majoritairement composées de divers polysaccharides pouvant être issus de l'hydrolyse du saccharose mobilisé. Ce saccharose peut être dégradé par la sucrose synthase ou par l'inverstase. La sucrose synthase catalyse l'hydrolyse de cette molécule pour former de l'UDP-glucose et de fructose. Cet UDP-glucose peut avoir plusieurs rôles. Il va pouvoir jouer le rôle de précurseur

pour la synthèse de cellulose (Colemann *et al.*, 2009), de l'hémicellulose et des pectines (Kärkönen *et al.*, 2005) ainsi que de la lignine (Amthor, 2003). L'UDP glucose est également impliqué dans la synthèse de glucides de réserves, de glycolipides et de glycoprotéines (Flores-Diaz *et al*., 1997; Bishop *et al.*, 2002). Sous l'action de l'invertase, le saccharose va libérer du glucose, qui sous l'action de l'hexokinase, va donner du glucose-6-phosphate. Ce glucose-6-P va pouvoir entrer dans la voie de la glycolyse et/ou la voie des pentoses phosphates afin de fournir des molécules énergétiques (ATP) et des pouvoirs réducteurs (NADH, NADPH). La glycolyse, en plus de permettre la synthèse de ces cofacteurs, permet la synthèse de différentes molécules telles que l'α-cétoglutarate et le pyruvate. Le pyruvate issu de cette glycolyse va également pouvoir entrer dans le cycle de Krebs et permettre de nouveau la synthèse d'ATP et de NADH. L'α-cétoglutarate, lui, va pouvoir entrer dans le cycle de Krebs mais aussi dans la synthèse des acides aminés. Il a également été montré que des feuilles de tabac ayant reçu un apport de saccharose présentent une augmentation de l'assimilation des nitrates, de la synthèse d'α-cétoglutarate et d'un large spectre d'acides aminés (Morcuende *et al.*, 1998). Ces différentes molécules issues du saccharose, interviendraient donc également dans le métabolisme azoté de la plante.

La formation de biomasse dépend de la disponibilité des glucides issus de la photosynthèse ainsi que des réserves carbonées. Elle nécessite la mise en place de nombreuses voies métaboliques impliquant un grand nombre d'enzymes. La synthèse des protéines, constituées d'acides aminés, nécessite de grandes quantités d'azote.

Lorsqu'un apport d'azote est réalisé (sous forme d'azote marqué en début de cycle), les dosages d'ions et d'azote $^{15}N$ (chapitre II) montrent que le miscanthus absorbe l'azote disponible dans le sol. Les dosages d'activités NR (chapitre III) nous ont montré que, dans le cas présent, la réduction des nitrates absorbés a lieu uniquement dans les feuilles et essentiellement entre les mois de juin et juillet (phase de croissance active de la plante). L'étude menée par RMN de l'azote à partir des feuilles placées dans une solution contenant du nitrate marqué $^{15}N$ confirme cette réduction des nitrates dans les feuilles. Cette étude nous a également appris que l'assimilation de cet azote était réalisée sur la glutamine grâce à la GS.

Alors que les plantes cultivées sans apport d'azote présentent de faibles activités NR, celles-ci présentent néanmoins de fortes activités GS (chapitre III). Ces fortes activités GS nous indiquent donc une forte assimilation d'ammonium provenant d'une autre source que de

la réduction des nitrates. Cet ammonium pourrait notamment provenir de la désamination des acides aminés mobilisés. La libération d'ammonium à partir des acides aminés mobilisés est également confortée par les fortes activités GDH mesurées. En effet, durant le mois de juin, les tiges hautes sont les organes aériens qui présentent les plus fortes concentrations en acides aminés (chapitre II) et les plus fortes activités GDH (chapitre III). Les dosages d'acides aminés dans les exsudats xylémiens nous montrent que la mobilisation s'effectue sous la forme de deux acides aminés majoritaires : l'asparagine et la glutamine (chapitre III). Ces deux acides aminés vont, sous l'action de divers enzymes comme la GOGAT, l'asparaginase et de l'aspartate amino-transférase, pouvoir former du glutamate (Brouquisse *et al.*, 1992 ; Lea et Forde, 1994 ;Azevedo *et al.*, 2006). Ce glutamate ne s'accumulant pas dans les tiges hautes et ces organes présentant de fortes activités GDH, il est raisonnable de penser que ce glutamate servira alors de substrat à la GDH et permettra la libération d'α-cétoglutarate et d'ammonium. L'ammonium sera assimilé par la GS et l'α-cétoglutarate, comme nous l'avons vu précédemment, servira à recharger le cycle de Krebs. La mobilisation d'acides aminés (tout comme la mobilisation de saccharose) permettra donc de la formation de grandes quantités d'α-cétoglutarate pour fournir de l'ATP et du NADH. En effet, ces tissus sont très jeunes et nécessitent de grandes quantités d'énergie pour leur croissance.

Enfin, l'azote des groupes amide de la glutamine et amine du glutamate va pouvoir également permettre la formation des autres acides aminés (Canton *et al.*, 2005 ; Forde et Lea, 2007). Ces autres acides aminés permettront à leur tour la synthèse de protéines retrouvées en grandes quantités dans les parties aériennes de miscanthus. En effet, chez les jeunes plantes, les acides aminés sont majoritairement utilisés pour la synthèse d'enzymes et de protéines essentiellement impliquées dans la construction de l'architecture des plantes et les différents composants de la machinerie photosynthétique (Hirel *et al.*, 2007).

Au cours de la période de croissance de la plante, la mobilisation simultanée de saccharose, de glutamine et d'asparagine va permettre de fournir l'ensemble des ressources nécessaires à la synthèse de biomasse : Les glucides à l'origine des constituants pariétaux (cellulose, hémicellulose et lignine), les acides aminés qui permettront la synthèse de protéines et notamment les enzymes nécessaires à la photosynthèse et à la synthèse de biomasse ainsi que les cofacteurs (ATP et NADH).

- Remobilisation automnale simultanée des molécules carbonées et azotées

Entre l'été et l'automne, les réserves en amidon se reforment dans les organes souterrains, il n'y a donc plus d'apport de saccharose des parties souterraines vers les parties aériennes (chapitre I). Les organes souterrains étant non photosynthétiques, ces sucres ont donc été synthétisés dans les parties aériennes puis mobilisés. En effet, durant l'automne, la croissance de la partie aérienne de la plante est terminée. Les besoins en glucides sont donc moins importants. Les glucides produits dans les feuilles par la photosynthèse vont alors être remobilisés vers les organes souterrains pour être stockés sous forme d'amidon. Ces résultats indiquent bien que les flux de glucides dans la plante dépendent des besoins des parties aériennes pour la production de biomasse. La remobilisation de saccharose vers les organes souterrains semble très importante au point que les parties souterraines ne puissent pas assimiler tout ce saccharose et qu'une partie de celui-ci soit stocké temporairement sous forme d'amidon dans les parties basses et ne soit remobilisé que plus tard.

Parallèlement à cette remobilisation de saccharose des parties aériennes et à ce stockage d'amidon dans les parties souterraines, les quantités d'azote diminuent fortement dans les tiges et les feuilles et augmentent dans les organes souterrains (chapitre II). Cette chute d'azote (et de protéines), n'étant pas accompagnée d'une forte augmentation d'acides aminés, suggère une remobilisation de ces derniers vers les rhizomes. Le suivi de l'azote marqué $^{15}N$ (chapitre II figures 110 et b) confirme cette remobilisation de l'azote vers les organes souterrains en fin de cycle. Les feuilles en sénescence vont hydrolyser leurs protéines en acides aminés puis, grâce à l'action des enzymes comme la GS et la GDH (chapitre III), permettre la synthèse de glutamate et de glutamine afin les exporter vers les rhizomes. Les western-blots réalisés avec les anticorps anti AS (chapitre III) nous indiquent qu'une partie de cette glutamine, sous l'action de l'asparagine synthase, va être transaminée en asparagine dans les tiges et les rhizomes lors cette remobilisation. Entre l'automne et l'hiver, le stock d'arginine va se reconstituer dans les rhizomes (chapitre II) indiquant que les rhizomes sont toujours actifs durant cette période. Cette formation d'arginine semble indiquer un besoin pour la plante d'optimiser ses réserves de carbone et d'azote afin d'économiser un maximum de carbone lors du stockage de l'azote.

La remobilisation et le stockage de molécules carbonées et azotées avant la sénescence complète des parties aériennes permettent de minimiser les pertes d'azote et d'énergie lors de

la récolte de la biomasse aérienne. Cela permet également de reconstituer le stock d'amidon, d'asparagine et d'arginine dans les rhizomes jusqu'en hiver. Durant l'automne, la remobilisation des glucides vers les organes souterrains entraine une forte augmentation des quantités d'amidon dans le bas des tiges (chapitre I). Cet amidon augmenterait donc la quantité de sucres fermentescibles et donc le rendement en bioéthanol.

Cependant, les coupes précoces, empêchent la fin de la remobilisation automnale et diminuent donc les réserves d'amidon mais également d'asparagine et d'arginine dans les rhizomes. Ces réserves carbonées et azotées permettant d'aider la croissance de la plante l'année suivante, une répétition de ces coupes précoces serait préjudiciable pour le rendement en biomasse et la pérennité de la culture. En effet, en condition de culture sans apport d'azote, l'azote du sol étant présent en quantité limitée, une mauvaise gestion de celui-ci serait encore plus préjudiciable qu'une mauvaise gestion des glucides.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous avons montré que les plantes de *Miscanthus x giganteus*, cultivées sans apport d'azote et récoltées tardivement, étaient capables, durant l'hiver, de stocker de grandes quantités de réserves carbonées et azotées dans leurs rhizomes. Les principales formes de stockage sont pour les glucides l'amidon et pour les composés azotés l'arginine et l'asparagine.

Au moment de la reprise de végétation et jusqu'en été, ces réserves vont être remobilisées sous forme de saccharose, de glutamine et d'asparagine. Ceci va favoriser la croissance des parties aériennes. En fin de cycle, les glucides issus de la photosynthèse et les acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines des parties aériennes vont être remobilisés. Cela va permettre de reconstituer les réserves d'amidon, d'asparagine et d'arginine dans les parties souterraines jusqu'en hiver.

Notre étude était basée sur des plantes cultivées sans apport d'azote et récoltées tardivement. Il pourrait également être intéressant d'étudier les réserves et les flux de remobilisation sur des plantes ayant subies des récoltes précoces (automne) successives. En effet, la remobilisation de carbone et d'azote se continuant entre l'automne et l'hiver, on pourrait s'attendre à voir des teneurs en amidon et en acides aminés différentes. Cette étude pourrait également être réalisée sur d'autres clones de *Miscanthus x giganteus* afin d'identifier si certains génotypes présentent des remobilisations de carbone et d'azote plus précoces et pourraient être récoltées dès l'automne.

Notre étude nous a également permis de montrer que l'asparagine est un acide aminé dédié au stockage et au transport. L'arginine, lui, ne jouerait qu'un rôle de stockage et serait ensuite remobilisé sous forme de glutamine.

Il serait intéressant d'étudier plus finement le métabolisme de l'arginine dans les rhizomes de la plante. Pour cela, nous pourrions envisager une injection d'arginine marqué $^{15}N$ dans les rhizomes et un suivi par RMN ou par GC/MS du devenir de cet acide aminé marqué afin de confirmer son hydrolyse et son transport sous forme de glutamine. En parallèle, les enzymes responsables de la dégradation et de la synthèse d'arginine pourraient être étudiées le long du cycle de croissance de la plante.

Nous avons pu estimer qu'en condition de culture sans apport d'azote, plus de 82% de l'azote présent dans les parties aériennes provenaient de la remobilisation printanière des

rhizomes. Les 18% restants pourraient provenir de l'absorption racinaire ou encore d'une fixation d'azote atmosphérique. En effet, de précédentes études montrent que des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique ainsi que des activités nitrogénases ont été découvertes dans les rhizomes et racines de miscanthus. Ceci laisse supposer une fixation d'azote atmosphérique (Eckert *et al*., 2001 ; Miyamoto *et al*., 2004).

En se basant sur ces hypothèses, il serait alors envisageable d'étudier les enrichissements $^{15}N$ des plantes cultivées sans apport d'azote à celui du sol afin d'estimer la contribution de la fixation d'azote atmosphérique chez le *Miscanthus x giganteus*.

Des études similaires pourraient être mises en place sur des plantes cultivées avec apport d'azote. Cela nous permettrait de voir si la mobilisation et la fixation d'azote atmosphérique sont différentes sur des plantes cultivées en présence d'azote dans le milieu.

Des plantes de *Miscanthus x giganteus* ont également été récoltées le long du cycle de croissance de la plante suite à un apport d'azote marqué (120 unités/ha). Grâce aux analyses réalisées, nous avons montré que le *Miscanthus x giganteus* réduit et assimile le nitrate absorbé dans ses feuilles. Ensuite, l'azote assimilé sera remobilisé vers les rhizomes en fin de cycle.

Il semblerait intéressant de comparer le stockage de l'azote entre les deux conditions de culture. En effet, un apport pourrait entraîner un stockage d'azote supplémentaire sous formes d'acides aminés libres ou sous forme de protéines de stockage. Des variations dans les proportions en acides aminés libres pourraient également être observées avec probablement de plus fortes proportions d'arginine.

Pour finir, l'ensemble des travaux de cette thèse ayant été réalisé sur *Miscanthus x giganteus*, il pourrait être intéressant, de refaire ces mêmes expériences sur d'autres espèces de miscanthus. En effet, *Miscanthus x giganteus* est un hybride interspécifique stérile qui ne présente donc pas de « puits » apical (graines) de réserves carbonées et azotées. Il est donc fortement probable que les métabolismes carbonés et azotés aient des fonctionnements différents chez des espèces fertiles. Il semblerait donc pertinent d'étudier, la physiologie des espèces *Miscanthus sinensis* et *Miscanthus sacchariflorus* en la comparant entre eux et à celle de *Miscanthus x giganteus*.

D'autre part, il faudrait vérifier chez les différents écotypes parentaux de *Miscanthus sinensis* et de *Miscanthus sacchariflorus* l'existence d'une variabilité génétique relative aux statuts carbonés et du métabolisme azoté afin d'obtenir une large gamme de génotypes

différents. Ces génotypes permettraient de réaliser différents croisements et de sélectionner de nouveaux *Miscanthus x giganteus* plus performants pour les processus d'assimilation, de remobilisation et de stockage du carbone et de l'azote.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Adam Z., Clarke A.K.** (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. Trends in Plant Science 7: 451-456.

**Allison G.G., Morris C., Clifton-Brown J., Lister S.J., Donnison I.S.** (2011) Genotypic variation in cell wall composition in a diverse set of 244 accessions of Miscanthus. Biomass and Bioenergy 35: 4740-4747.

**Amthor J.S.** (2003) Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. Annals of Botany 91: 673-695.

**An G.H., Miyakawa S., Kawahara A., Osaki M., Ezawa T.** (2008) Community structures of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: habitat segregation along pH gradients. Soil Science and Plant Nutrition 54: 517-528.

**Anderson E., Arundale M. Maughan A. Oladeinde A. Wycilso, T. Voigt** (2011) Growth and agronomy of *miscanthus x giganteus* for biomass production. Biofuels 2:167-179.

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

**Aspinall D.** (1961) The control of tillering in the barley plant 1. The pattern of tillering and its relation to nutrient supply. Australian Journal of Biological Sciences 14: 493–505.

**Avice J.C., Ourry A., Lemaire G., Boucaud J.** (1996) Nitrogen and carbon flows estimated by 15N and 13C pulse-chase labeling during regrowth of alfalfa. Plant Physiology 112: 281-290.

**Azevedo R.A., Lancien M., Lea P.J.** (2006) The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. Amino Acids 30: 143–162.

**Bascomb N.F., Schmidt R.R.** (1987) Purification and partial kinetic and physical characterization of two chloroplast-localized NADP-specific glutamate dehydrogenase isoenzymes and their preferential accumulation in *Chlorella sorokiniana* cells cultured at low or high ammonium levels. Plant Physiology 83: 75-84.

**Bauer D., Biehler K., Fock H., Carryol E., Hirel B., Migge A., Becker T.W.** (1997) A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. Physiologia Plantarum 99: 241-248.

**Beale C.V., Long S.P.** (1995) Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy-conversion in cool climates. Plant Cell Environment 18: 641-650.

**Beale C.V., Bint D.A., Long S.P.** (1996) Leaf photosynthesis in the C4- grass *Miscanthus* × *giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England. Journal of Experimental Botany 47: 267-273.

**Beale C.V., Long S.P.** (1997) Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus x giganteus* and *Spartina* cynosuroides. Biomass and Bioenergy 12: 419-428.

**Becker T.W., Caboche M., Carryol E., Hirel B. (**1992) Nucleotide sequence of a tobacco cDNA encoding plastidic glutamine synyhetase and light inductibility, organ specificity and diurnal rhythmicity in the expression of the corresponding genes of tobacco and potato. Plant Molecular Biology 19: 367-379.

**Becker T.W., Perrot-Rechenmann C., Suzuki A., Hirel B.** (1993) Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mésophyll and bundle-sheet cells of maize leaves. Planta 191: 129-136.

**Becker T.W., Carryol E., Hirel B.** (2000) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. Planta 211: 800-806.

**Beevers L., Hageman R.H.** (1969) Nitrate reduction in higher plants. Annual Review of Plant Physiology 20: 495-522.

**Bernard S.M., Møller A.L., Dionisio G., Kichey T., Jahn T.P., Dubois F., Baudo M., Lopes M.S., Tercé-Laforgue T., Foyer C.H., Parry M.A., Forde B.G., Araus J.L., Hirel B., Schjoerring J.K., Habash D.Z.** (2008) Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum L.*). Plant Molecular Biology 67: 89-105.

**Bernard S.M., Habash D.Z.** (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. New Phytologist 182: 608-620.

**Bishop J.D., Moon B.C., Harrow F., Gomer R.H., Dottin R.P., Brazill D.T.** (2002) A second UDP-glucose pyrophosphorylase is required for differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. Journal of Biological Chemistry 277: 32430-32437.

**Bonnett G.D., Sims I.M., Simpson R.J., Cairns A.J.** (1997) Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. New Phytologist 136: 11-17.

**Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.

**Britto D.T., Glass A.D.M., Kronzucker H.J., Siddiqi M.Y.** (2001) Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $NH4^+$/NH3. An evaluation of recent proposals. Plant Physiology 125: 523–526.

**Brouquisse R., Masclaux C., Feller U., Raymond P.** (2001) Protein hydrolysis and nitrogen remobilisation in plant life and senescence. In: Lea P, Morot-Gaudry JF, eds. Plant Nitrogen INRA Springer Verlag pp 275-293.

**Brugière N., Dubois F., Masclaux C., Sangwan R.S., Hirel B.** (2000) Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. Planta 211: 519-527.

**Buchanan B.B, Gruissem W., Jones R.L.** (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, American Society of Plants Physiologists.

**Buchanan-Wollaston V., Ainsworth C.** (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. Plant Molecular Biology 33: 821-834.

**Bullard M.J., Heath M.C., Nixon P.M.I.** (1995) Shoot growth, radiation interception and dry-matter production and partitioning during the establishment phase of *Miscanthus sinensis giganteus* grown at 2 densities in the UK. Annals of Applied Biology 126: 365-378.

**Bullard M.J., Nixon P.M., Heath M.C.** (1997) Quantifying the yield of *Miscanthus* × *giganteus* in the UK. Aspects of Applied Biology 49: 199–206.

**Burner D.M., Tew T.L., Harvey J.J., Belesky D.P.** (2009) Dry matter partitioning and quality of Miscanthus, *Panicum*, and *Saccharum* genotypes in Arkansas, USA. Biomass and Bioenergy 33: 610-619.

**Cadoux S., Riche A.B., Yates N.E., Machet J.M.** (2011) Nutrient requirements of *Miscanthus x giganteus*: Conclusions from a review of published studies. Biomass and Bioenergy 38: 14-22.

**Cai Q., Aitken K., Deng H.H., Chen X.W., Fu C., Jackson P.A., McIntyre C.I.** (2005) Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. Plant Breeding 124: 322-328.

**Canton F.R., Suárez M.F., Cánovas F.M.** (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. Photosynthesis Research 83: 265-278.

**Caputo C., Barneix A.J.** (1997) Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. Physiologia Plantarum 101: 853-860.

**Carvalho H.G., Pereira S., Sunkel C., Salema R.** (1992) Detection of a cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum L.* by immunocytochemical methods. Plant Physiology 100: 1591-1594.

**Chaffei C., Pageau K., Suzuki A., Gouia H., Ghorbel M., Masclaux-Daubresse C.** (2004) Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. Plant Cell Physiology 45: 1681–1693.

**Chapin F.S., Schulze E.D., Mooney H.A.** (1990) The ecology and economics of storage in plants. Annual Review of Ecology and Systematics 21: 423-447.

**Cheng L., Fuchigami L.H.** (2002) Growth of young apple trees in relation to reserve nitrogen and carbohydrates. Tree Physiology 22: 1297-1303.

**Christian D.G., Haase E.** (2001) Agronomy of Miscanthus. in: Jones M., Walsh M. (Eds.),Miscanthus for energy and fibre, James and James, London, UK, pp 21–45.

**Christian D.G., Riche A.B., Yates N.E.** (2008) Growth, yield and mineral content of *Miscanthus* × *giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests, Industrial Crops and Products 28: 320-327.

**Clifton-Brown J.C., Jones M.B.** (1997) The thermal response of leaf extension rate in genotypes of the C4-grass Miscanthus: an important factor in determining the potential productivity of different genotypes. Journal of Experimental Botany 48: 1573-1581.

**Clifton-Brown J.C., Lewandowski I.** (2000) Water use efficiency and biomass partitioning of three different Miscanthus genotypes with limited and unlimited water supply. Annals of Botany 86: 191-200.

**Clifton-Brown J.C., Neilson B., Lewandowski I., Jones M.B.** (2000) The modeled productivity of *Miscanthus* × *giganteus* (GREEF et DEU) in Ireland, Industrial Crops Production 12: 191-200.

**Clifton-Brown J.C., Lewandowski I., Anderson B., Basch G., Chritian D.G., Bonderup-Kjeldsen J., Jorgensen U., Mortensen J., Riche A.G., Schawarz K.U., Tayebi K., Teixeira F.** (2001) Performance of 15 Miscanthus genotypes at five sites in Europe. Agronomy Journal 93: 1013-1019.

**Clifton-Brown J.C., Lewandowski I.** (2002) Screening Miscanthus genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. European Journal of Agronomy 16: 97-100.

**Clifton-Brown J.C., Stampfl P.F., Jones M.B.** (2004) Miscanthus biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. Global Change Biology 10: 509-518.

**Clifton-Brown J.C., Breuer J., Jones M.B.** (2007) Carbon mitigation by the energy crop, Miscanthus. Global Change Biology 13: 2296-2307.

**Clifton-Brown J., Chiang Y., Hodkinson T.R.** (2008) Miscanthus: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production. Dans : "Genetic Improvement of bioenergy crops", W., Vermerris (ed), pp 273-294.

**Cliquet J.B., Deléens E., Mariotti A.** (1990) C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by C and N tracing in *Zea mays L.* Plant Physiology 94: 1547-1553.

**Cock J.M., Brock I.W., Watson A.T., Swarup R., Morby A.P., Cullimore J.V.** (1991) Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Molecular Biology 17: 761-771.

**Coleman H.D., Yan J., Mansfield S.D.** (2009) Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall structure. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 106: 13118-13123.

**Cosentino S.L., Patane C., Sanzone E., Copani V., Foti S.** (2007) Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. Industrial Crops Production 25: 75-88.

**Costa J.A.V., Greque de Morais M.** (2011) The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource technology 102: 2-9.

**Crawford N.M., Glass A.D.M.** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends in Plant Science 3: 389-395.

**Cren M., Hirel B.** (1999) Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. Plant and Cell Physiology 40: 1187-1193.

**Cullimore J.V., Gebhardt C., Saarelainen R., Miflin B.J., Idler K.B., Barker R.F.** (1984) Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris L.*: organ-specific expression of a multigene family. Journal of Molecular and Applied Genetics 2: 589-599.

**Cullimore J.V., Bennett M.J.** (1988) The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris L.* and other legumes. Journal of Plant Physiology 132: 387-393.

**Danalatos N.G., Archontoulis S.V., Mitsios I.** (2007) Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus x giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. Biomass and Bioenergy 31: 145-152.

**Delrot S., Rochat C., Tegeder M., Frommer W.B.** (2001) Amino acid transport In, Lea P., Morot-Gaudry J.F., Eds Plant Nitrogen, INRA Springer Verlag pp 35-213.

**Dhont C., Castonguay Y., Avice J.C., Chalifour F.P.** (2006) VSP accumulation and cold-inducible gene expression during autumn hardening and overwintering of alfalfa. Journal of Experimental Botany 57: 2325-2337.

**Dinant S.** (2008) Phloème, transport inter-organe et signalisation à longue distance. Comptes Rendus Biologies 331: 334-346.

**Drincovich M.F., Casati P., Andreo C.S.** (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. FEBS Letters 490: 1-6.

**Dubois F., Brugière N., Sangwan R.S., Hirel B.** (1996) Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. Plant Molecular Biology 31: 803-817.

**Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo J.M., Sangwan R., Gallais A. Hirel B**. (2003) Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? Plant Physiology and Biochemistry 41: 565-576.

**Duff S.M., Qi Q., Reich T., Wu X., Brown T., Crowley J.H., Fabbri B.** (2011) A kinetic comparison of asparagine synthetase isozymes from higher plants. Plant Physiology Biochemistry 49: 251-256.

**Eckert B., Weber O.B., Gudrun K., Andras H., Marion S., Anton H. (**2001) *Azospirillum doebereinerae sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4- grass Miscanthus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 17-26.

**Edwards J.W., Coruzzi G.M.** (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. Plant Cell 1: 241-248.

**Ercoli L., Mariotti M., Masoni A., Bonari E.** (1999) Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of Miscanthus. Field Crops Research 63: 3-11.

**Farineau J., Morot-Gaudry J.F.** (2011) La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Edition INRA. 412p.

**Faure J.D., Meyer C., Caboche M.** (1997) Assimilation du nitrate: nitrate et nitrite réductases. In: Morot-Gaudry, J.-F., (Ed.), Assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, pp. 45-65.

**Fei H., Chaillou S., Hirel B., Mahon J.D., Vessey J.K.** (2003) Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. Planta 216: 467-474.

**Ferrario-Mery S., Valadier M.H., Foyer C.H.** (1998) Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. Plant Physiology 117: 293-302.

**Finnemann J., Schjoerring J.K.** (1999) Translocation of $NH_4^+$ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. Physiologia Plantarum 105: 469-477.

**Flores-Díaz M., Alape-Girón A., Persson B., Pollesello P., Moos M., von Eichel-Streiber C., Thelestam M., Florin I.** (1997) Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene. Journal of Biological Chemistry 272: 23784-23791.

**Fontaine J.X., Saladino F., Agrimonti C., Bedu M., Tercé-Laforgue T., Tétu T., Hirel B., Restivo F.M., Dubois F.** (2006) Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 47: 410-418.

**Forde B.G.** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation, Biochimica et Biophysica Acta 1465: 219-235.

**Forde B.G., Lea P.J.** (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation and signalling. Journal of Experimental Botany 58: 2339-2358.

**Foyer C.H., Noctor G., Verrier P.** (2006) Photosynthetic carbon-nitrogen interactions: modelling inter-pathway control and signalling. In: Plaxton W, McManus MT, editors. Annual Plant Reviews: Control of Primary Metabolism in Plants. Oxford: Blackwell Chapter 14, pp 325-347.

**Galili S., Amir R., Galili G.** (2008) Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology 1: 49-80.

**Gaufichon L., Reisdorf-Cren M., Rothstein S.J., Chardon F., Suzuki A.** (2010) Biological functions of asparagine synthetase in plants. Plant Science 179: 141-153.

**Gebauer G., Melzer A., Rehder H.** (1984) Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius L.* I. Differences in organs and diurnal changes. Oecologia 63: 136-142.

**Ghannoum O., Evans J.R., Soon Chow W., Andrews T.J., Conroy J.P., Von Caemmerer S.** (2005) Faster rubisco is the key to superior nitrogen-use efficiency in NADP-malic enzyme relative to NAD-malic enzyme C4 grasses. Plant Physiology 137: 638-650.

**Gillet M.** (1980) Les graminées fourragères, Gauthiers-Villars, 306 p.

**Givan C.V.** (1980) Aminotransferases in higher plants In, Miflin B.J. Ed., The Biochemistry

**Glass A.D.M., Shaff J.E., Kochian L.V.** (1992) Studies of the Uptake of Nitrate in Barley: IV. Electrophysiology. Plant Physiology 99: 456-463.

**Glavac V., Jockheim H.** (1993) A contribution to understanding the internal nitrogen budget of beech (*Fagus sylvatica L.*). Trees 7: 237–241.

**Gloser V.** (2000) Seasonal changes in allocation of nitrogen-rich compounds within a rhizomatous grass *Calamagrostis epigejos*. In: Gaborcik et al. (eds.) Grassland Ecology V. Proceedings of the 5th Ecological Conference. Banska Bystrica : Grassland and mountain agriculture research institute, 58-68.

**Gloser V.** (2002) Seasonal changes of nitrogen storage compounds in a rhizomatous grass *Calamagrostis epigeios*. Biologia Plantarum 45: 563-568.

**Gomez L., Faurobert M.** (2002) Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica L.* Batsch). Journal of Experimental Botany 53: 2431-2439.

**Good A.G., Shrawat A.K., Muench D.G.** (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? Trends in Plant Science 9: 597-605.

**Greef J.M., Deuter M.** (1993) Syntaxonomy of *Miscanthus-x-Giganteus* Greef-Et-Deu, Angewandte Botany 67: 87–90.

**Guiboileau A., Sormani R., Meyer C., Masclaux-Daubresse C.** (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. Comptes Rendus Biologies 333: 382-391.

**Guy C.L., Huber J.L.A., Huber S.C.** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. Plant Physiology 100: 502-508.

**Habash D.Z., Bernard S., Schondelmaier J., Weyen J., Quarrie S.A.** (2007) The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat: N utilisation, development and yield. Theoretical and Applied Genetics 114: 403-419.

**Hajirezaei M.R., Börnke F., Peisker M., Takahata Y., Lerchl J., Kirakosyan A., Sonnewald U.** (2003) Decreased sucrose content triggers starch breakdown and respiration in stored potato tubers (*Solanum tuberosum*). Journal of Experimental Botany 54: 477-488.

**Hansen E.M., Christensen B.T., Jensen L.S., Kristensen K.** (2004) Carbon sequestration in soil beneath long-term Miscanthus plantations as determined by 13C abundance. Biomass and Bioenergy 26: 97-105.

**Hastings A.F., Clifton-Brown J.C., Wattenbach M., Stampfl P., Mitchell C.P., Smith P.** (2008) Modelling the potential of Miscanthus to meet Europe's energy needs and reduce greenhouse emissions for future climate scenarios. Agronomy for Sustainable Development. 28: 465–472.

**Hatch D.M.** (2002) C4 photosynthesis: discovery and resolution. Photosynthesis research 73: 251-256.

**Hayashi H., Chino M.** (1990) Chemical composition of phloem sap from the upper most internode of the rice plant. Plant Cell Physiology 31: 247-251.

**Heaton E.A., Clifton-Brown J., Voigt T.B., Jones M.B., Long S.P.** (2004) Miscanthus for renewable energy generation: European Union experience and projections for Illinois. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change 9: 21-30.

**Heaton E.A., Flavell R.B., Mascia P.N., Thomas S.R., Dohleman F.G., Long S.P.** (2008) Herbaceous energy crop development: Recent progress and future prospects. Current Opinion in Biotechnology 19: 202–209.

**Heaton E.A., Dohleman F.G., Miguez A. F., Juvik J.A. Lozovaya V., Widholm J., Zabotina O.A., McIsaac G.F., David M.B., Voigt T.B., Boersma N.N., Long S.P.** (2010) Miscanthus: A Promising Biomass Crop. Advances in Botanical Research 56: 75-137.

**Heilmeier H., Monson R.K.** (1994) Carbon and nitrogen storage in herbaceous plants. In: Roy J., Garnier E., editors. A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions. The Hague: SPB Academic Publishing pp 149-171.

**Heldt H.W.** (1997) Plant biochemistry and molecular biology. Oxford university press. 522p.

**Heldt H.W., Piechulla B.** (2011) ATP is generated by photosynthesis. In: Heldt HW, Piechulla B, eds. Plant Biochem. Elsevier, London, UK. pp 113–131.

**Hendry G.A.F.** (1987) The ecological significance of fructan in a contemporary flora. New Phytologist 106: 201-216.

**Hendry G.A.F.** (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. New Phytologist 123: 3-14.

**Hendry G.A.F., Wallace R.K.** (1993) The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In Science and Technology of Fructans. eds Suzuki M, Chatterton NJ. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 119–139.

**Hibberd J.M., Covshoff S.** (2010) The Regulation of Gene Expression Required for C4 Photosynthesis. Annual Review of Plant Biology 61: 181-207.

**Hikosaka K.** (2005) Leaf canopy as a dynamic system: ecophysiology and optimality in leaf turnover. Annals of Botany 95: 521-533.

**Himken M., Lammel J., Neukirchen D., Czypionka-Krause U., Olfs H.W.** (1997) Cultivation of Miscanthus under west european conditions : seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. Plant Soil 189: 117-126.

**Hirel B., Lea P.** (2001) Ammonium assimilation, dans Lea P.J. et Morot-Gaudry J.F. Ed., Plant Nitrogen, p. 79-100, Springer-Verlag, Berlin et INRA edition, Versailles, France.

**Hirel B., Andrieu B., Valadier M.H., Renard S., Quilleré I., Chelle M., Pommel B., Fournier C., Drouet J.L.** (2005) Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. Physiologia Plantarum 124: 178-188.

**Hirel B., Le Gouis J., Ney B., Gallais A.** (2007) The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany 58: 2369-2387.

**Hodge A., Robinson D., Fitter A.** (2000) Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen? Trends in Plant Science 5: 304-308.

**Hoover R.** (2001) Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. Carbohydrate Polymers 53: 253-26.

**Hörtensteiner S., Feller U.** (2002) Nitrogen metabolism and mobilisation during senescence. Journal of Experimental Botany 53: 927-937.

**Howitt S.M., Udvardi M.K.** (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 152-170.

**Ireland R.J., Joy K.W.** (1985) Plant transaminases In, Christen P., Metzler D.E., Eds. Transaminases, Vol. 2., Wiley, New York, pp 376-384.

**Ireland R.J., Lea P.J.** (1999) The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism, in: B.K. Singh (Ed.), Plants Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology, Dekker, M. Inc., New York/Basel/Hong Kong, 1999, pp 49–109.

**Ishiyama K., Inoue E., Watanabe-Takahashi A., Obara M., Yamaya T., Takahashi H.** (2004) Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. The Journal of Biological Chemistry 279: 16598-16605.

**Jones M.B., Walsh M. (**2001) Miscanthus for Energy and Fibre. James and James, London, 192 pp.

**Jordan M.O., Habib R.** (1996) Mobilizable carbon reserves in young peach trees as evidenced by trunk girdling experiments. Journal of Experimental Botany 47: 79-87.

**Joy K.W.** (1988) Ammonia, glutamine and asparagine: A carbon nitrogen interface. Canadian Journal of Botant 66: 2103–2109.

**Kang S.M., Ko K.C., Titus J.S.** (1982) Mobilization and metabolism of protein and soluble nitrogen during spring growth of apple tree. Journal of the American Society for Horticultural Science 107: 209–213.

**Kant S., Bi Y.M., Rothstein S.J.** (2011) Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. Journal of Experimental Botany 62: 1499-1509.

**Kärkönen A., Murigneux A., Martinant J.P., Pepey E., Tatout C., Dudley B.J., Fry S.C.** (2005) UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. Biochemical Journal 391: 409-415.

**Kleijn D., Treier U.A., Müller-Schärer H**. (2004) The importance of nitrogen and carbohydrate storage for plant growth of the alpine herb *Veratrum album*. New Phytologist 166: 565–575.

**Klimeš L., Klimešová J., Čížková H.** (1999) Carbohydrate storage in rhizomes of *Phragmites australis*: the effects of altitude and rhizome age. Aquatic Botany 64: 105-110.

**Krapp A., Fraisier V., Scheible W.R., Quesada A., Gojon A., Stitt M., Caboche M., Daniel-Vedele F.** (1998) Expression studies of Nrt2: 1Np, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. Plant Journal 6: 723–732.

**Kühn C., Grof C.P.** (2010) Sucrose transporters of higher plants. Current Opinion in Plant Biology 13: 288-298.

**Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 277: 680–685.

**Lähdesmäki P., Pakonen T., Saari E., Laine K., Havas P.** (1990) Environmental factors affecting basic nitrogen metabolism and seasonal levels of various nitrogen fractions in tissues of bilberry, *Vaccinium myrtillus*. Holarctic Ecology 12: 19-30.

**Lam H.M., Coschigano K., Scultz C., Melo-oliveira R., Tjaden G., Oliveira I., Ngai N., Hsieh M.H., Coruzzi, G.** (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. Plant Cell 7: 887-898.

**Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M**. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47: 569-593.

**Lam H.M., Hsieh M.H., Coruzzi G.** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagines synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 16: 345-353.

**Lawrence C.J., Walbot V.** (2007) Translational genomics for bioenergy production from fuelstock grasses: maize as the model species. Plant Cell 19: 2091–2094.

**Lea P.J., Miflin B.J.** (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614-616.

**Lea P.J., Miflin B.J.** (1980) Transport and metabolism of asparagin and other nitrogen compounds within the plant In, Stumpf P.K., Conn E.E. Eds, The biochemistry of plants, Vol. 5., Academic Press, New York pp 569-607.

**Lea P.J., Forde B.G.** (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acids metabolism. Plant Cell Environment 17: 541-556.

**Lea P.J., Miflin B.J.** (2004) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. Plant Physiology Biochemistry 41: 555–564.

**Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R., Halford N.G.** (2007) Asparagine in plants. Annals of Applied Biology 150:1–26.

**Lemoine R.** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochimica et Biophysica Acta 1465: 246-262.

**Lewandowski I., Clifton-Brown J.C., Scurlock J.M.O., Huisman W.** (2000) Miscanthus: European experience with a novel energy crop. Biomass and Bioenergy 19: 209-227.

**Lewandowski I., Clifton-Brown J.C., Andersson B., Basc, G., Christian D.G., Jørgensen U., Jones M.B., Riche A.B., Schwarz K.U., Tayebi K., Teixeira F.** (2003) Environment and harvest time affects the combustion qualities of Miscanthus genotypes. Agronomy Journal 95: 1274-1280.

**Lewandowski I., Schmidt U.** (2006) Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 112: 335-346.

**Li H.W., Weng T.S., Shang K.C., Yang P.C.** (1961) Cytological studies of sugarcane and its relatives. XVIII. Trigeneric hybrids of *Saccharum officinarum L.*, *Sclerostachya fusca A.* Camus, and *Miscanthus japonicus* Anderss. Botanical Bulletin of Academia Sinica 2: 1-9.

**Lightfoot D.A., Green N.K., Cullimore J.V.** (1988) The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris L.*: nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. Plant Molecular Biology 11: 191-202.

**Lillo C**. (2008) Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. Biochemistry Journal 415: 11-19.

**Linde-Laursen I.** (1993) Cytogenetic analysis of *Miscanthus 'Giganteus'* an interspecific hybrid. Hereditas 119: 297-300.

**Livingston D.P., Hincha D.K., Heyer A.G.** (2009) Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. Cellular Molecular Life Science 66: 2007–2023.

**Long S.P.** (1999) Environmental responses. In: Sage R.F. and Monson R.K. (eds.) C4 Plant Biology. Academic. Press, San Diego, USA, pp 215-249.

**Loulakakis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A.** (1990) Immunocharacterization of NADH –Glutamate Dehydrogenase from *Vitis vinifera L*. Plant Physiology 94: 109-113.

**Lunn J.E., Furbank R.T.** (1997) Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. Planta 202: 106-111.

**Luo R., Wei H., Ye L., Wang K., Chen F., Luo L., Liu L., Li Y., Crabbe M.J., Jin L., Li Y., Zhong Y.** (2009) Photosynthetic metabolism of C3 plants shows highly cooperative regulation under changing environments: a systems biological analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 847-852.

**Maathuis F.J.** (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. Current Opinion in Plant Biology 12: 250-258.

**Malaguti D., Millard P., Wendler R., Hepburn A., Tagliavini M.** (2001) Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and root uptake. Journal of Experimental Botany 52: 1665–1671.

**Marschner H.** (1995) Mineral nutrition of higher plants. London UK, Academic Press.

**Martin A., Lee J., Kichey T., Gerentes D., Zivy M., Tatout C., Dubois F., Balliau T., Valot B., Davanture M., Tercé-Laforgue T., Quilleré I., Coque M., Gallais A., Gonzalez-Moro M.B., Bethencourt L., Habash D.Z., Lea P.J., Charcosset A., Perez P., Murigneux A., Sakakibara H., Edwards K.J., Hirel B.** (2006) Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. Plant Cell 18: 3252–3274.

**Masclaux-Daubresse C., Valadier M.H., Brugière N., Morot-Gaudry J.F., Hirel B.** (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. Planta 211: 10-518.

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

**Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.H., Feraud M., Jouglet T., Suzuki A.** (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. Plant Physiology 140: 444-456.

**Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Orsel M.** (2008) Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. Plant Biology 10: 23-36.

**Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. (**2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Journal of Experimental Botany 62: 1375-1390.

**McKendry P.** (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology 83: 37-46.

**McNally S.F., Hirel B.** (1983) Glutamine synthetase isoforms in higher plants. Physiology Vegetal 21: 761-774.

**McNally S.F., Hirel B., Gadal P., Mann A.F., Stewart G.R.** (1983) Glutamine synthetases of higher plants. Plant Physiology 72: 22-25.

**Melo-Oliveira R., Oliveira I.C., Coruzzi G.M.** (1996) Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 4718-4723.

**Meuriot F., Avice J.C., Decau M.L., Simon J.C., Lainé P., Volenec J.J., Ourry A**. (2003) Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa L.*) are affected by mineral N availability. Plant Science 165: 709-718.

**Meyer C., Stitt M.** (2001) Nitrate reduction, dans Lea P.J. et Morot-Gaudry J.F. Ed., Plant Nitrogen, p. 37-60, Springer-Verlag, Berlin et INRA edition, Versailles, France.

**Miflin B.J., Lea P.J.** (1982) Ammonium assimilation and amino acid metabolism In, Boulter D., Parthier D. Eds. Encyclopedia of plant physiol, Vol. 14A, Springer Verlag, Berlin pp 5-64.

**Migge A., Meya G., Carrayol E., Hirel B., Becker T.W.** (1996) Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. Planta 200: 213-220.

**Millard P.** (1988) The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. Plant, Cell and Environment 11: 1-8.

**Millard P., Hester A., Wendler R., Baillie G.** (2001) Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. Functional Ecology 15: 535-543.

**Millard P., Wendler R., Grassi G., Grelet G.A., Tagliavini M.** (2006) Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. Environmental Microbiology 8: 247-257.

**Millard P., Sommerkorn M., Grelet G.A.** (2007) Environmental change and carbon limitation in trees: a biochemical, ecophysiological and ecosystem appraisal. New Phytologist 175: 11-28.

**Millard P., Grelet G.A.** (2010) Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. Tree Physiology 30: 1083 1095.

**Miller W.B.** (1992) A review of carbohydrate metabolism in geophytes. Acta Horticulturae 325: 239–249.

**Miller A.J., Cookson S.J., Smith S.J., Wells D.M.** (2001) The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. Journal of Experimental Botany 52: 541–549.

**Miyamoto T., Kawahar M., Minalisawa K.** (2004) Novel endophytic nitrogen-fixing Clostridia from grass *Miscanthus sinensis* as reveled by terminal restriction fragment lenght polymorphism analysis. Applied and Environmental Microbiology 70: 6580-6586.

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

**Moreno M.A., Gaudillère J.P., Moing A.** (1994) Protein and amino acid content in compatible and imcompatible peach/plum grafts. J. Hort. Sci. 68: 705-714.

**Morot-Gaudry J.F.** (1997) Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Edition INRA. 422p.

**Morot-Gaudry J.F., Job D., Lea P.J.** (2001) Amino acid metabolism. In, Morot-Gaudry J.F. Ed, Nitrogen Assimilation by Plants, Science Publishers Inc, Enfield, pp 167-211.

**Morot-Gaudry J.F., Orsel M., Diaz C., Daniel-Vedele F., Masclaux-Daubresse C.** (2006) Absorption et assimilation du nitrate et recyclage de l'azote organique chez les plantes: intérêt pour le colza. Oléagineux Corps gras Lipides 6: 393-402.

**Müntz K.** (1998) Deposition of storage proteins. Plant Molecular Biology 38: 77-99.

**Naidu S.L., Moose S.P., Al-Shoaibi A.K., Raines C.A., Long S.P.** (2003) Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus*: Adaptation in amounts and sequence of C4 photosynthetic enzymes. Plant Physiology 132: 1688-1697.

**Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K.** (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. Renewable Sustainable Energy Review 14: 578-597.

**Neilsen D., Millard P., Herbert L.C., Neilsen G.H., Hogue E.J., Parchomchuk P., Zebarth B.J.** (2001) Remobilization and uptake of N by newly planted apple (*Malus domestica*) trees in response to irrigation method and timing of N application. Tree Physiology 21: 513-21.

**Nogueira F.T.S., Schlogl P.S., Camargo S.R., Fernandez J.H., Rosa V.E., Pompermayer P., Arruda P.** (2005) SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. Plant Science 169: 93-106.

**Nonhebel S.** (2002) Energy yields in intensive and extensive biomass production systems. Biomass and Bioenergy 22: 159-167.

**Nordin A., Näsholm, T.** (1997) Nitrogen storage forms nitrogen storage forms in nine boreal understorey plant species. Oecologia 110: 487-492.

**Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Stitt M.** (2010) Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. Molecular Plant 3:973-996.

**Oaks A.** (1994) Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. Plant Physiology 106: 407-414.

**Okumoto S., Pilot G.** (2011) Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. Molecular Plant 4 :453-463.

**Oliveira I.C., Lam H.M., Coschigano K., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.** (1997) Molecular genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 35: 185-198.

**Oliveira I.C., Coruzzi G.M.** (1999) Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. Plant Physiology 121: 301-309.

**O'Neal D., Joy K.W.** (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. Archives of Biochemistry and Biophysics 159: 113-122.

**Orthen B.** (2001) Sprouting of the fructan- and starch-storing geophyte *Lachenalia minima*: Effects on carbohydrate and water content within the bulbs. Physiologia Plantarum 113: 308-314.

**Orthen B., Wehrmeyer A.** (2004) Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in bulbs and shoots of the geophyte *Galanthus nivalis*. Physiologia Plantarum 120: 529-536.

**Pate J.S.** (1971) Movements of nitrogenous solutes in plants. In Nitrogen-15 in Soil–Plant Studies. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, IAEA-P1-341/13, pp 165–187.

**Pate J.S.** (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. Annual Review of Plant Physiology 31: 313–340.

**Patterson K., Cakmak T., Cooper A., Lager I., Rasmusson A.G., Escobar M.A.** (2010) Distinct signaling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. Plant Cell Environment 33: 1486-1501.

**Peat L.J., Tobin A.K.** (1996) The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. Plant Physiology 111: 1109–1117.

**Peeters K.M.U., Van Laere A.J.** (1994) Amino acids metabolism associated with N metabolism from the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum L.*) during grain development. Plant Cell Environment 17: 131-141.

**Peoples M.B., Dalling M.S.** (1988) The interplay between proteolysis and amino acid metabolism during senescence and nitrogen reallocation. In LD Nodden, AC Leopold, eds, Senescence and Aging in Plants. Academic Press, New York, pp 182–217.

**Pereira S., Carvalho H., Sunkel C., Salema R.** (1992) Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum L*. Protoplasma 167: 66-73.

**Plaxton W.C., McManus M.T.** (2006) Control of primary metabolism in plants. Annals of Botany 98: 1331-1332.

**Pollock C.J.** (1986) Fructans and the metabolism 01: sucrose in vascular plants. New Phytologist 104: 1-24.

**Pollock C.J., Cairns A.J.** (1991) Fructan metabolism in grasses and cereals. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 77-101.

**Puncha-Arnon S., Puttanlek C., Rungsardthong V., Pathipanawat W., Uttapap D.** (2007) Changes in physicochemical properties and morphology of canna starches during rhizomal development. Carbohydrates polymers 70: 206-217.

**Purnell M.P., Skopelitis D.S., Roubelakis-Angelakis K.A., Botella J.R**. (2005) Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. Planta 222: 167-180.

**Ranwala A.P., Miller W.B.** (2008) Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. New Phytologist 180: 421-433.

**Ratcliffe R.G., Shachar-Hill Y.** (2001) Probing plant metabolism with NMR. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 499-526.

**Restivo F.M.** (2004) Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana plumbaginifolia*: structure analysis and regulation of their expression by physiological and stress conditions. Plant Science 166: 971-982.

**Richter G.M., Riche A.B., Dailey A.G., Gezan S.A., Powlson D.S.** (2008) Is UK biofuel supply from Miscanthus water-limited? Soil Use Management 24: 235-245.

**Ritsema T., Smeekens S.** (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. Current Opinion in Plant Biology 6: 223-230.

**Robinson S.A., Slade A.P., Fox G.G., Phillips R., Ratcliffe R.G., Stewart G.R.** (1991) The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiology 95: 509-516.

**Rosen H.** (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Archives of Biochemistry and Biophysics 67: 10-15.

**Rosnitschek-Schimmel I.** (1985) Seasonal dynamics of nitrogenous compounds in a nitrophilic weed II. The role of free amino acids and proteins as nitrogen store in *Urtica dioica.* Plant Cell Physiology 26: 177–183.

**Rouzé P., Caboche M.** (1992) Nitrate reduction in higher plants: molecular approaches to function and regulation In, Wray J.L., Ed. Inducible plant proteins: their biochemistry and molecular biology, Society for Experimental Biology Seminar Series 49, Cambridge University Press, Cambridge, pp 45-77.

**Sage R.F., Pearcy W.F, Seeman J.R. (**1987) The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. III. Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium album (L.)* and *Amaranthus retroflexus* (L). Plant Physiology 85: 355-359.

**Sage R.F., Wedin D.A., Li M.** (1999) The biogeography of C4 photosynthesis: patterns and controlling factors. In: C4 Plant Biology (eds R.F.Sage and R.K.Monson), Academic Press, San Diego, USA. pp 313-373.

**Sagisaka, S.** (1987) Amino acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth. Plant Cell Physiology 28: 171-178.

**Sanchez E.E., Righetti T.T., Sugar D., Lombard P.B.** (1991) Recycling of nitrogen in field-grown 'Comice' pear. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 66: 479-486.

**Sauter J.J., Van Cleve B.** (1992) Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of ''*Populus* × *canadensis*'' and its relation to protein body mobilization. Trees 7: 26-32.

**Schneider A., Kreazwieser J., Schums R., Sauter J.J., Rennenberg H.** (1994) Thiol and amino acid composition of the xylem sap of poplar trees. Canadian Journal of Botany 72: 347-351.

**Schwarz K.U, Murphy D.P.L., Schnug E.** (1994) Studies of the growth and yield of *Miscanthus* × *giganteu*s in Germany. Aspects of Applied Biology 40: 533-540.

**Sechley K.A., Yamaya T., Oaks A.** (1992) Compartimentation of nitrogen assimilation in higher plants. International Review of Cytology 134: 85-163.

**Shewry P.R.** (2007) Improving the protein content and composition of cereal grain. Journal of Cereal Science 46: 239-250.

**Shiomi N.** (1989) Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. Journal of Plant Physiology 134: 151-155.

**Slocum R.D.** (2005) Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. Plant Physiology and Biochemistry 43: 729–745.

**Smith A.M, Zeeman S.C., Smith S.M.** (2005) Starch Degradation. Annual Review Plant Biology 56: 73-98.

**Smith A.M., Zeeman S.C.** (2006). Quantification of starch in plant tissues. Nature Protocols 1: 1342-1345.

**Smith A.M., Stitt M.** (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. Plant Cell Environment 30: 1126-1149.

**Srivastava H.S., Singh R.P.** (1987) Role of regulation of l-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. Phytochemistry 26: 597-610.

**Staswick P.E.** (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 303-322.

**Stepien V., Sauter J.J., Martin F.** (1994) Vegetative storage proteins in woody plants. Plant Physiology and Biochemistry 32:185–192.

**Steponkus P.L.** (1984) Role of the plasmamembrane in freezing injury and cold acclimation. Annual Review of Plant Physiology 35: 543-584.

**Stewart G.R., Mann A.F., Fentem P.A.** (1980) Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase, dans Stumpf P.K., Conn E.E. et Miflin B.J. Ed., The Biochemistry of Plants, Vol. 5: Amino Acids and Derivatives, p. 271-327, Academic Press, New York.

**Stewart G.R., Pate J.S., Unkovich M.** (1993) Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean-type vegetation. Plant Cell Environment 16: 351-363.

**Stewart J.R., Toma Y., Fernandez F.G., Nishiwaki A., Yamada T., Bollero G.** (2009) The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. GCB Bioenergy 1: 126-153.

**Strullu L., Cadoux S., Preudhomme M., M-H. Jeuffroy M. H., Beaudoin N.** (2011) Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus×giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. Field Crops Research 121: 381-391.

**Suzuki A., Gadal P.** (1984) Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. Physiologie végétale 22: 471-486.

**Suzuki A., Knaff D.B.** (2005) Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. Photosynthetic Research 83: 191–217.

**Tabuchi M., Sugiyama K., Ishiyama K., Inoue E., Sato T., Takahashi H., Yamaya T.** (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. Plant Journal 42: 641-651.

**Taylor S.H., Hulme S.P., Rees M., Ripley B.S., Woodward F.I., Osborne C.P.** (2010) Ecophysiological traits in C3 and C4 grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. New Phytologist 185: 780–791.

**Tercé-Laforgue T., Mäck G., Hirel B. (2004)** New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. Physiologia Plantarum 120: 220-228.

**Tester R.F., Karkalas J., Qi X.** (2004) Starch-composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science 39: 151-165.

**Thorne G.N.** (1962) Survival of tillers and distribution of dry matter between ear and shoot of barley varieties. Annals of Botany 26: 37-54.

**Tobin A.K., Yamaya T.** (2001) Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. Journal of Experimental Botany 52: 591-604.

**Todd J., Screen S., Crowley J., Peng J., Andersen S., Brown T., Qi Q., Fabbri B., Duff S.M.G.** (2008) Identification and characterization of four distinct asparagine synthetase (AsnS) genes in maize (*Zea mays L.*). Plant Science 175: 799–808.

**Touraine B., Daniel-Vedele F., Forde B.G.** (2001) Nitrate uptake and its regulation, dans Lea P.J. et Morot-Gaudry J.F. Ed., Plant Nitrogen, p. 1-36, Springer-Verlag, Berlin et INRA edition, Versailles, France.

**Touchette B.W., Burkholder J.M.** (2000) Overview of the physiological ecology of carbon metabolism in seagrasses. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 250: 169-205.

**Turano F.J., Dashner R., Upadhyaya A., Caldwell C.R.** (1996) Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. Plant Physiology 112: 1357-1364.

**Turano F.J., Thakkar S.S., Fang T., Weisemann J.M.** (1997) Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in Arabidopsis. Plant Physiology 113: 1329-1341.

**Tylová E., Steinbachová L., Votrubová O., Lorenzen B.,Brix H.** (2008) Different sensitivity of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima* to high availability of ammonium-N. Aquatic Botany 88: 93–98.

**Valluru R., Van den Ende W. (**2008) Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. Journal of Experimental Botany 59: 2905-2916.

**Volenec J.J., Ourry A., Joern B.C.** (1996) A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. Physiologia Plantarum 97: 185-193.

**Wang M.,Wu M., Huo H.** (2007) Life- cycle energy and greenhouse gas emission impacts of differents corn ethanol plant types. Environmental Research Letters 2: 1-13.

**Weinbaum S., Van Kessel C.** (1998) Quantitative estimates of uptake and internal cycling of 14N-labeled fertilizer in mature walnut trees. Tree Physiology 18: 795-801.

**Winter H., Lohaus G., Heldt H.W.** (1992) Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. Plant Physiology 99: 996-1004.

**Witte C.P.** (2011) Urea metabolism in plants. Plant Science 180: 431-438.

**Woo K.C., Morot-Gaudry J.F., Summons R.E., Osmond C.B.** (1982) Evidence for the glutamine synthetase/glutamate synthase pathway during the photorespiratory nitrogen cycle in spinach leaves. Plant Physiology 70: 1514-1517.

**Wray J.L.** (1993) Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher plants. Physiologia Plantarum 89: 607-612.

**Yoneyama T.** (1991) Uptake, assimilation and translocation of nitrogen by crops. Japan Agricultural Research Quarterly 25: 75-82.

**Youssefi F., Brown P.H., Weinbaum S.A.** (2000) Relationship between tree nitrogen status, xylem and phloem sap amino acid concentrations, and apparent soil nitrogen uptake by almond trees (*Prunus dulcis*). Journal of Horticultural Science Biotechnology 75: 62-68.

**Yuan L., Loqué D., Kojima S., Rauch S., Ishiyama K., Inoue E., Takahashi H., von Wirén N.** (2007) The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. Plant Cell 19: 2636-2652.

**Zeeman S.C., Kossmann J., Smith A.M.** (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. Annual Review of Plant Biology 61: 209-234.

**Zhu X.G., Long S.P., Ort D.R.** (2008) What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? Trends in Biotechnology 19: 153-159.

**Zub H.W., Brancourt-Hulmel M.** (2010) Agronomic and physiological performances of different species of Miscanthus, a major energy crop. A review. Agronomy for Sustainable Development 30: 201-214.

**Zub H.W., Rambaud C., Béthencourt L., Brancourt-Hulmel M**. (2012) Late emergence and rapid growth maximize the plant development of miscanthus clones. Bioenerg. Res. DOI: 10.1007/s12155-012-9194-2.

**Résumé :**

Le Miscanthus est une plante pérenne rhizomateuse à métabolisme C4. Cette plante est une candidate idéale pour la production de biocarburants de deuxième génération car elle produit de grandes quantités de biomasse sans nécessiter d'apport d'azote. Une étude des métabolismes carboné et azoté a été réalisée sur des plantes cultivées sans apport d'azote. Pour cela nous avons déterminé les formes de stockage et de transports des glucides non structuraux et des molécules azotées sur l'ensemble des organes de la plante durant son cycle de développement. Afin d'expliquer les flux d'azote dans la plante, les principales enzymes responsables de l'assimilation et de la mobilisation de l'azote (NR, GS, GDH et AS) ont également été étudiées. Ces travaux nous ont permis de constater que le Miscanthus va stocker des glucides de réserves dans ces rhizomes pendant l'hiver principalement sous forme d'amidon et de saccharose. Entre le printemps et l'été, l'amidon va être hydrolysé et exporté sous forme de saccharose. Parallèlement au stockage et à la mobilisation de glucides, la plante va également stocker de l'azote dans ces rhizomes. Cet azote est stocké à 50% sous forme d'acides aminés libres dont les deux principaux sont l'arginine et l'asparagine. Entre le printemps et l'été, cet azote va être mobilisé sous forme de glutamine et d'asparagine et va représenter environ 80% de l'azote des parties aériennes en été. Ces acides aminés vont être la principale source d'azote pour la synthèse des protéines indispensables au métabolisme et à la croissance de la plante. Les études des plantes cultivées avec apport d'azote marqué ont permis de montrer que le Miscanthus est capable d'absorber du nitrate dans le sol, puis de le réduire et de l'assimiler dans ces feuilles. Une fois la croissance de la plante terminée, celle-ci va remobiliser les glucides issus de la photosynthèse vers les rhizomes et les stocker sous forme d'amidon. La sénescence des parties aériennes va engendrer une protéolyse qui va permettre la libération d'acides aminés et la remobilisation de ces acides aminés vers les rhizomes jusqu'en hiver.

Mots clés : Miscanthus, métabolisme azoté, mobilisation, stockage, glucides, acides aminés.

**Abstract :**

Miscanthus is a perennial and rhizomatous plant with C4 metabolism. This plant is an ideal candidate for the production of second-generation biofuel because it produces large amounts of biomass without nitrogen supply. A study of carbon and nitrogen metabolism was performed on plants grown without nitrogen supply. First, we defined transport and storage forms of nonstructural carbohydrates and nitrogen-containing molecules on all organs of the plant during its development cycle. To explain the flow of nitrogen in the plant, the main enzymes responsible of nitrogen assimilation and mobilization (NR, GS, GDH and AS) were also studied. This work allowed us to see that Miscanthus store carbohydrate reserves in its rhizomes during the winter mainly as starch and sucrose. Between spring and summer, starch is hydrolyzed and exported as sucrose. In parallel to the carbohydrates storage and mobilization, the plant will also store nitrogen in these rhizomes. This nitrogen is stored in 50% as free amino acids and mainly as arginine and asparagine. Between spring and summer, this nitrogen will be mobilized as glutamine and asparagine and will represent approximately 80% of the shoots nitrogen in summer. These amino acids will be the main source of nitrogen for the synthesis of proteins necessary for metabolism and growth of the plant. Studies of plants grown with a supply of labeled nitrogen have shown that Miscanthus is able to uptake nitrate in soil and to reduce and assimilate it in these leaves. Once growth of the plant is finished, shoots will remobilize carbohydrates produced by photosynthesis to the rhizomes and store it as starch. Shoots senescence will generate a proteolysis that triggers the release of amino acids and remobilization of these amino acids to the rhizomes until winter.

Keywords : Miscanthus, nitrogen metabolism, mobilization, storage, carbohydrates, amino acids.