



HAL
open science

Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composés azotés et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes : effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves

Luis Manuel Valenzuela Nunez

► **To cite this version:**

Luis Manuel Valenzuela Nunez. Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composés azotés et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes : effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2006. Français. NNT : 2006NAN10177 . tel-01748627

HAL Id: tel-01748627

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748627>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES



Institut National de la Recherche Agronomique

U.F.R Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Ressource Procédés, Produits, Environnement
D.F.D Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et Ecologie, Biotechnologies

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie Végétale et Forestière

par Luis Manuel VALENZUELA NUNEZ

**Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière
de composés azotés et carbonés
chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé
(*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.)
aux stades juvéniles et adultes ;
effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves.**

Soutenance publique le 31 Août 2006

Membres du Jury :

Rapporteurs :	Claire Damesin Jean François Morot-Gaudry	Professeur, Université de Paris XI Directeur de Recherche INRA-Versailles
Examineurs :	Marie Odile Jordan Pascale Maillard Nathalie Bréda Pierre Dizengremel	Chargée de Recherche INRA-Avignon Chargée de Recherche INRA-Champenoux Directrice de Recherche INRA-Champenoux Professeur, UHP-Nancy 1
Invitée :	Dominique Gérant	Maître de Conférences, UHP Nancy I Co-encadrante

IFR 110 - UMR Ecologie et Ecophysologie Forestières INRA-UHP
Centre INRA de Nancy F-54280 Champenoux
Faculté des Sciences & Techniques, BP 239 F-54506 Vandoeuvre lès Nancy

SOMMAIRE

Abréviations

Introduction générale	1
------------------------------	---

Chapitre 1. Dynamique saisonnière et distribution des protéines solubles totales dans les différents compartiments d'arbres adultes de chêne sessile (*Quercus petraea* L.) et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.).

Introduction	22
Matériels et méthodes	23
Résultats	29
Publication soumise à <i>Tree Physiology</i>	29
Résultats des cernes	54
Discussion	55

Chapitre 2. Caractérisation et compartimentation des réserves C et N dans l'aubier de chênes pédonculés adultes

Introduction	59
Matériels et méthodes	63
Résultats	71
Discussion	79

Chapitre 3. Effets de l'ombrage et d'une défoliation estivale sur la croissance et le statut carboné et azoté en fin de période hivernale et sur l'absorption d'azote lors de la croissance printanière suivante chez de chêne sessile (*Quercus petraea* L.) et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) au stade juvénile

Introduction	94
Matériels et méthodes	96
Résultats	107
Discussion	114

Discussion générale et perspectives	123
--	-----

Références bibliographiques	129
------------------------------------	-----

Annexes	141
----------------	-----

ABREVIATIONS

A%	Richesse en ¹⁵ N
AA	Acides aminés
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adénosine triphosphate
BA	Biomasse aérienne
BS	Biomasse souterraine
BS/BA	Rapport biomasse souterraine/biomasse aérienne
BSA	Bovine serum albumine
C	Carbone
C/N	Rapport carbone/azote
D.O.	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
E	Plein éclaircissement
E ND	Plein éclaircissement non défolié
E D	Plein éclaircissement défolié
Fructose6P	Fructose 6 phosphate.
Gluconate6P	Gluconate 6 phosphate
Glucose6P	Glucose 6 phosphate.
JJ	Jour Julien
kDa	(Kilo) Dalton
M	Molaire
MM	Masse moléculaire
MS	Masse Sèche
MW	Méthanol-Eau
N	Azote
NADP	Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
O	Ombre
O ND	Ombre non défolié
O D	Ombre non défolié
PM	Poids moléculaire.
RSA	Allocation relative spécifique
SAB	Sérum bovine albumine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine

INTRODUCTION GENERALE

Les causes des changements globaux comme les températures, les sécheresses, l'augmentation de la concentration de CO₂ sont liées clairement aux activités humaines. Les premiers signes de ces changements anthropiques sont les déboisements, l'intensification de la déforestation auxquels se sont additionnées les activités industrielles, l'utilisation de combustibles fossiles qui se traduisent par une augmentation de l'effet serre planétaire et d'un réchauffement climatique (Académie des Sciences 1990).

Les changements climatiques ainsi que la rapidité avec laquelle ils s'opèreraient aujourd'hui, pourraient avoir des conséquences sur les systèmes écologiques terrestres et aquatiques, les systèmes socioéconomiques tels que l'agriculture, l'exploitation forestière, les ressources en eau, ainsi que la santé humaine (Petit 1997).

Les arbres et les forêts occupent une place particulière du fait de l'importance de leur rôle dans le cycle du carbone (Ceulemans et Mousseau 1994, Roberntz et Linder 1999). Les espèces arborées, majoritairement associées sous forme de forêts, constituent 80% de la biomasse terrestre (Académie des Sciences 1990) et fixent via la photosynthèse, un bilan net de 1,5 Gt de carbone, soit 20% des émissions humaines de CO₂ (Mortier 1995). Les arbres, du fait de leur longévité, seront donc soumis à ces changements climatiques annoncés tout au long de leur existence, mettant ainsi à l'épreuve leurs capacités d'acclimatation. Cependant, bien que cette stratégie de longévité qui caractérise les ligneux ait nécessité durant l'évolution de fortes capacités d'acclimatation et d'adaptation aux conditions changeantes du milieu (Ceulemans et

Mousseau 1994, Saxe *et al* 1998), les évolutions climatiques prévues pourraient augmenter les risques d'inadaptation environnementale et de dépérissement (Chemillier 1997). Or le délai de rentabilité et la longue durée de vie des espèces forestières nécessitent une anticipation importante des évolutions climatiques et de leurs conséquences biologiques de manière à orienter la sylviculture (Bréda *et al* 2000, Lebourgeois *et al* 2001).

Les arbres sont des puits de carbone. C'est par la composition chimique de la biomasse des plantes que l'on a une bonne indication du devenir du carbone fixé. Elle a été déterminée chez un grand nombre de plantes herbacées et ligneuses et les résultats ont été regroupés par Poorter (1994), ils sont reportés dans le tableau i.I. Cette composition exprimée en concentration varie selon les espèces de manière quantitative, les différences étant d'origine génétique et phénotypique mais la nature des composés reste la même.

Tableau i.I. Composition de la biomasse des organes de plantes herbacées et ligneuses selon Penning de Vries *et al.* 1974, 1983 et Poorter, 1994).

	Concentrations en mg/g MS					
	Plantes herbacées			Plantes ligneuses		Graines/fruits
	feuilles	tiges	racines	feuilles	tiges	
Sucres non structuraux	70-260	80-315	200-330	40-255	10-135	150-880
(hémi)cellulose	130-530	180-620	170-310	40-300	45-605	
Lipides	15-70	15-40	10-25	20-100	20-75	15-460
Lignine	10-80	25-60	20-50	40-195	90-250	40-130
Protéines	100-350	40-250	45-230	50-220	30-140	70-370
Acides organiques	40-125	30-100	5-55	15-55	?	10-95
Eléments minéraux	85-205	60-185	40-190	30-120	0-70	20-65

Que ce soit chez les plantes herbacées ou ligneuses, les constituants de la biomasse tels que cellulose, hémicellulose et sucres non structuraux peuvent être en concentration particulièrement importante. Ils correspondent en fait aux deux grandes catégories de composés glucidiques :

Les composés carbonés non structuraux (TNC)

L'amidon est considéré comme le constituant de réserve le plus abondant. Ce composé peut être hydrolysé par des enzymes spécifiques. L'amidon est la forme privilégiée de stockage du carbone chez les plantes herbacées et les arbres (Nelson et Dickson 1981, Stassen *et al* 1981, Tromp 1983). Il s'agit d'un polysaccharide insoluble dans l'eau qui présente l'avantage d'être sous une forme métaboliquement inactive contrairement à des glucides de plus petite taille tels que les monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides, polyalcools, regroupés sous le terme de « sucres solubles ».

Les sucres solubles sont considérés comme les composés carbonés métaboliquement actifs, qui participent aux processus de biosynthèse et de maintenance des cellules/tissus. Ce sont les seules formes carbonées à pouvoir être transportées d'un organe à un autre dans la plante. Certains sucres solubles participent au stockage du carbone, mais dans une moindre mesure par rapport à l'amidon. Dans la plupart des cas, cette fraction soluble est constituée principalement du saccharose et secondairement par du glucose et du fructose (Kramer et Kozlowski 1979). Néanmoins chez certaines espèces, des formes solubles peuvent être prédominantes, comme le saccharose chez *Pinus strobus*, le raffinose chez le mûrier et ses polymères chez le marronnier, le stachyose chez le frêne ou certains pins, ou des polyalcools chez le pommier et certains conifères (Bory et Clair-Maczulajtys 1988).

Les composés carbonés structuraux

Ce sont des composés élaborés pour la structure même du végétal.

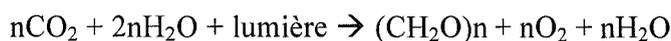
La cellulose est un composé majoritaire dans les plantes et si les concentrations sont équivalentes quelle que soit l'espèce, ce sont les arbres qui en accumulent la plus grande quantité (Kramer et Kozlowski 1979). Ce sont des chaînes linéaires de glucose qui s'associent en microfibrilles et forment le constituant de base des parois cellulaires.

Les hémicelluloses sont également des constituants de la paroi cellulaire et ce sont des polymères d'une grande variété de sucres. Pour certains auteurs, ces composés pourraient correspondre à des composés de réserve chez les arbres (Priestley 1977, Meyer et Splitstoesser 1971, Glerum et Balatinez 1980) mais cela est encore discuté à l'heure actuelle.

Enfin, *les pectines*, polymères de l'acide galacturonique, sont présentes dans les lamelles moyennes des parois formant un ciment intercellulaire qui apparemment ne peut être utilisé comme substance de réserve.

La photosynthèse permet la fixation du dioxyde de carbone et la biosynthèse de glucides

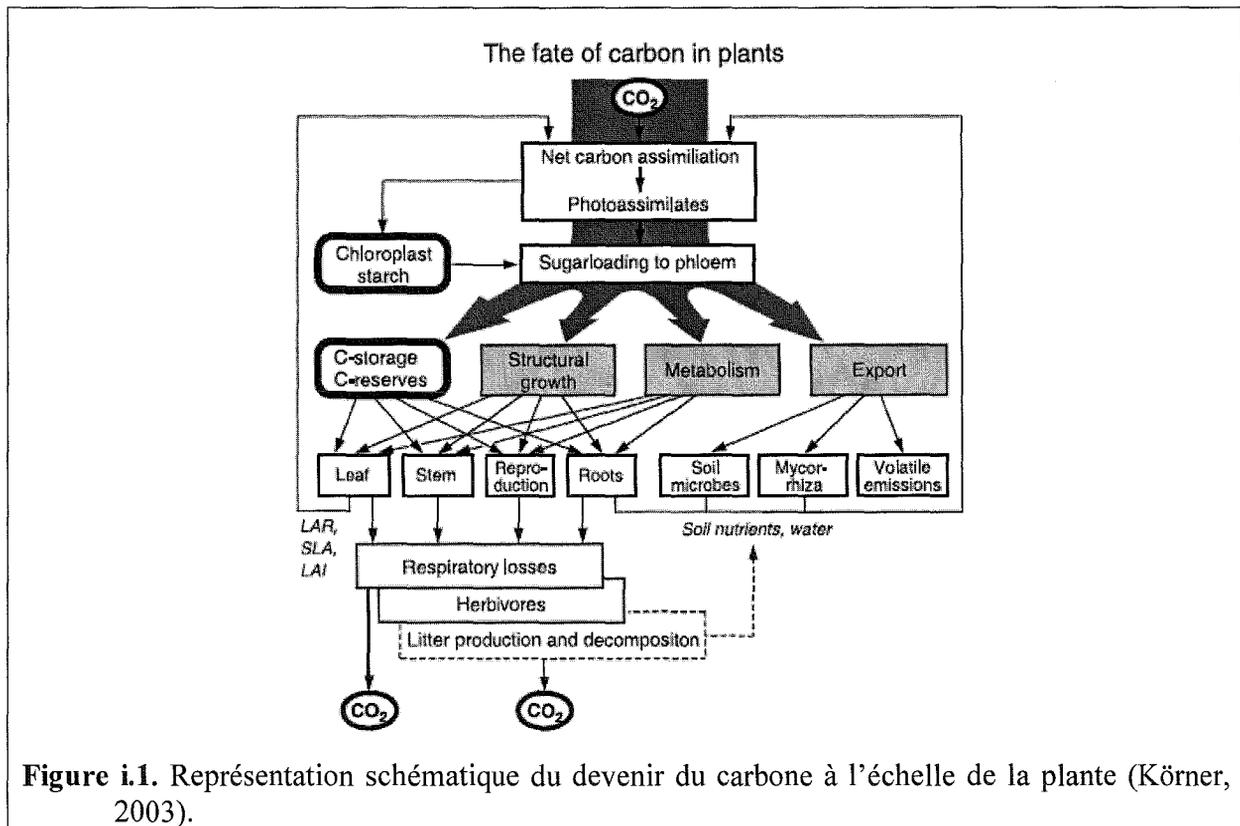
La photosynthèse, qui est activée par le rayonnement solaire, permet à une plante de fixer le CO₂ de l'atmosphère afin de synthétiser des glucides. La photosynthèse utilise la radiation solaire visible (400 nm à 700 nm) qui représente environ 50 % de la radiation solaire globale (Waring et Schlesinger, 1985). De cette fraction, environ 85 % de l'énergie solaire est absorbée par les feuilles mais cette valeur peut varier considérablement selon leur structure et leur âge. L'équation chimique qui décrit la photosynthèse est :



La majorité de la photosynthèse a lieu dans le feuillage mais il s'en produit aussi (très peu) dans les tiges, les branches (Waring et Schlesinger, 1985; Kozłowski *et al.*, 1991), l'écorce, les cotylédons, les bourgeons et les fruits (Kozłowski *et al.*, 1991). Le taux de photosynthèse varie selon les espèces et les provenances, les feuilles d'ombre et de lumière, le moment de la journée et dans la saison de croissance. Ces variations dépendent d'interactions entre des caractéristiques végétales comme l'âge, la structure et l'exposition des feuilles, le développement de la cime, le comportement des stomates, la quantité et l'activité de Rubisco (ribulose biphosphate carboxylaseoxygénase) et les facteurs environnementaux comme l'intensité de la lumière, la température, la disponibilité de l'eau, la concentration atmosphérique de CO₂ et des polluants atmosphériques et des conditions du sol (Kozłowski *et al.*, 1991). Nelson (1984) indique que les arbres ont des taux de photosynthèse nette qui sont semblables à ceux de plantes agricoles et de plantes herbacées.

La présence des constituants carbonés dans tous les organes de la plante, qu'ils soient photosynthétiques ou non, sous entend qu'il existe dans toute plante des mécanismes importants de transport du carbone fixé au niveau des organes photosynthétiques et les données de la littérature ont montré qu'il existait des priorités dans cette allocation du carbone. Ces priorités sont par ailleurs particulièrement importantes si l'on considère l'allocation du carbone aux

diverses structures d'un arbre (Waring et Schlesinger, 1985). Le devenir du carbone issu de la photosynthèse est résumé dans la figure i.1.



La respiration autotrophe conduit à la perte (sous forme de dioxyde de carbone) d'une partie du carbone fixé par contre, elle est essentielle au fonctionnement des plantes. Les plantes libèrent du CO_2 lors de la photorespiration et de la respiration. La photorespiration se déroule simultanément à la photosynthèse dans les feuilles, alors que la respiration suit les activités métaboliques diurnes et nocturnes des différents organes d'une plante.

La photorespiration

Dans les feuilles des plantes de type C_3 , la photorespiration provoque la libération de CO_2 dans l'atmosphère à cause des propriétés de l'enzyme Rubisco. Cette enzyme, qui fixe le CO_2 atmosphérique lors de la photosynthèse, peut également fixer l'oxygène (O_2) (Kozłowski *et al.*, 1991). Lorsque l' O_2 s'associe à l'enzyme au lieu du CO_2 , le carbone préalablement fixé est dirigé vers le cycle d'oxydation du carbone de la photorespiration qui mène à la libération de CO_2 (Jarvis, 1989; Kozłowski *et al.*, 1991). La photorespiration utilise de 30 % à 50 %

du carbone fixé lors de la photosynthèse (Kozlowski *et al.*, 1991). Une concentration atmosphérique de CO₂ élevée réduit la photorespiration, car l'augmentation du ratio CO₂/O₂ qui s'ensuit favorise la fixation du CO₂ par l'enzyme Rubisco au détriment de l'O₂ (Jarvis, 1989; Kozlowski *et al.*, 1991).

La respiration

La respiration est le processus métabolique qui permet à tout organe de libérer et d'utiliser l'énergie emmagasinée dans les glucides présents.

L'équation de la respiration est : $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{énergie}$

Il existe deux types de respiration: la respiration de construction et la respiration de maintenance.

La respiration est beaucoup plus intense dans les organes en croissance active que dans les tissus matures et elle est très lente dans les tissus en dormance (Kozlowski *et al.*, 1991).

La respiration de construction (ou de croissance) utilise l'énergie des glucides pour élaborer des structures végétales ou d'autres composés organiques. La respiration de construction démarre avec le début de la saison de croissance et demeure très active tant et aussi longtemps que la plante croît. La biosynthèse de nombreux constituants de la biomasse se fait effectivement à partir des glucides issus de la photosynthèse, elle se fait de manière simplifiée au travers des activités enzymatiques regroupées sous le terme de « glycolyse » et de « cycle de Krebs ». Ces voies métaboliques permettent de fabriquer des squelettes carbonés qui seront à la base de la structure de diverses molécules telles que celles indiquées dans le tableau i.I : protéines, lipides, etc...

Tableau i.II. Coûts de construction associés à la synthèse de quelques composés organiques (Poorter 1994).

Composé	Quantité de glucose nécessaire pour la synthèse d'un gramme de composé
Lipide	3.030
Lignine	2.119
Protéine	2.475
Polysaccharide	1.090

La synthèse de chacun de ces composés a un coût appelé « coût de construction » qui a été estimé par différents auteurs et exprimé en grammes de glucose par gramme de composé synthétisé. Par exemple (tableau i.II), il faut environ 2.5g de glucose pour élaborer 1g de protéine, 3g de glucose par g de lipide alors que la synthèse de composés tels que les TNC a un coût moins élevé, de l'ordre de 1.1 à 1.2g de glucose par g de TNC. Suivant le végétal, suivant l'organe et suivant la phénologie (tableau i.III), il y aura un investissement plus ou moins important pour ces biosynthèses ce qui se traduira par des « pertes » respiratoires plus ou moins importantes.

Tableau i.III. Coûts de construction associés à la synthèse de structures végétales (Poorter, 1994)

Arbre	Organe	Quantité de glucose nécessaire pour la synthèse d'un gramme d'organe
Pin	Aiguilles	1.57
	Branches	1.49
	Ecorce	1.60
	racine	1.47
Eucalyptus	phloème	1.45
	cambium	1.22
	aubier	1.36
	Bois de coeur	1.40

Quotidiennement, la production et l'utilisation de glucides sont influencées par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. La nuit, la respiration et l'absence de photosynthèse font en sorte que la plante émet du CO₂. La respiration nocturne utilise environ 50 % de la production de la photosynthèse nette et une augmentation de la température d'environ 3°C peut causer une augmentation significative de la respiration de maintenance (Kozłowski *et al.*, 1991). Dès les premières lueurs du jour, la photosynthèse débute et augmente jusqu'au point où le CO₂ absorbé par la photosynthèse équivaut au CO₂ libéré par la respiration (point de compensation). Le taux de photosynthèse augmente alors en relation avec l'intensité lumineuse jusqu'à un taux maximum (Waring et Schlesinger, 1985) qui est atteint lorsqu'un des nombreux autres facteurs biotiques et abiotiques, qui influencent la photosynthèse, en limitent le fonctionnement. Une fois le point de compensation dépassé, l'arbre capte plus de CO₂ qu'il en

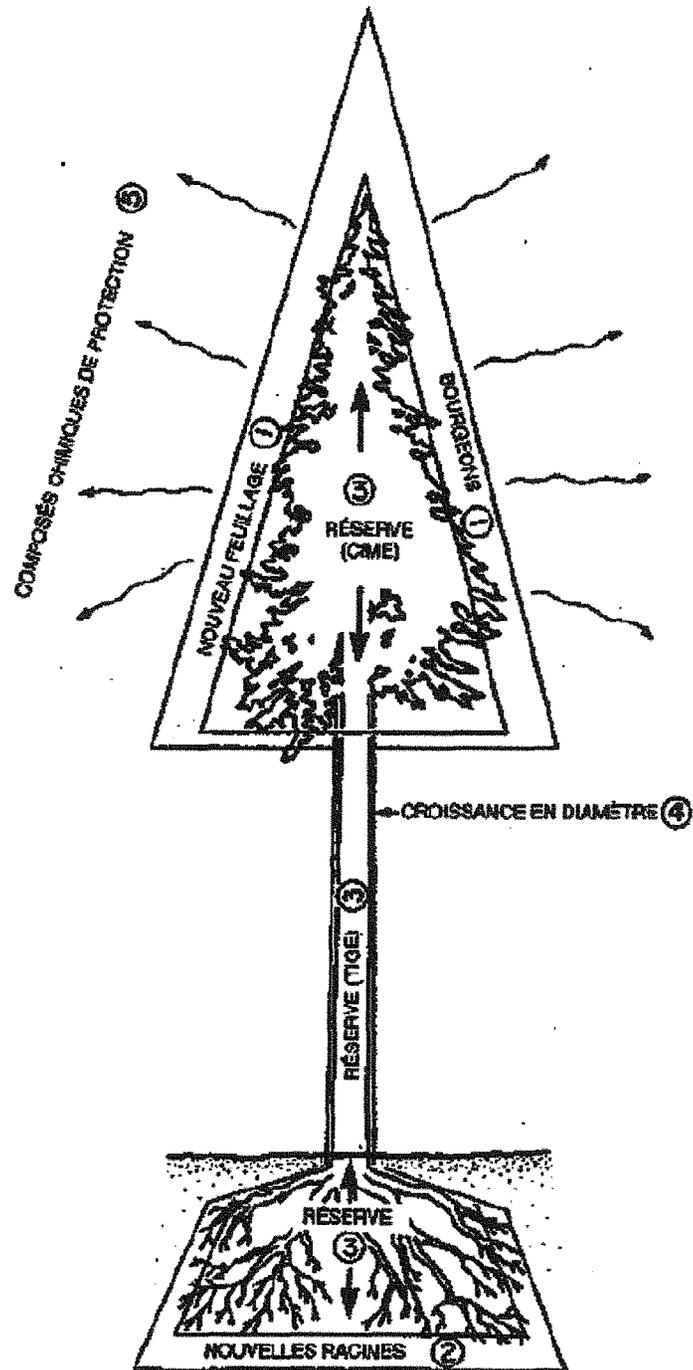


Figure 2. d'après Waring et Schlesinger, 1985

émet, ce qui se traduit par l'accumulation de glucides. Les glucides produits par la photosynthèse servent, entre autres, à construire, dans les arbres notamment, des feuilles ou des aiguilles, des branches, du bois de tronc, des racines et des organes reproducteurs (Waring et Schlesinger, 1985). Un équilibre existe quant à la proportion des diverses structures construites comme le feuillage, les tissus de support et de transport de la sève ainsi que les racines.

La respiration de maintenance sert à fournir l'énergie nécessaire aux multiples fonctions des cellules vivantes composant les diverses structures de la plante. Waring et Schlesinger (1985) indiquent que la respiration de maintenance double à toutes les augmentations de température de 10 °C. La quantité phénoménale de tissus qui servent au transport et à l'entreposage de substances dans un arbre fait en sorte que les dépenses en énergie sont particulièrement importantes chez ces espèces. Après le suivi des activités métaboliques d'un arbre dans une plantation au Japon, Paembona *et al.* (1992) indiquent que la respiration de construction et la respiration de maintenance représentent en moyenne, 21 % et 79 % de la respiration totale, d'où l'importance de la respiration de maintenance. Kozlowski *et al.* (1991) indiquent que le taux de respiration n'est pas fortement relié aux besoins énergétiques et des glucides peuvent être gaspillés lorsque les températures nocturnes sont élevées. La photorespiration, la respiration de construction et principalement la respiration de maintenance sont, pour les arbres, les processus métaboliques qui amènent une libération de CO₂ dans l'atmosphère.

La figure i.2 montre que le carbone disponible est d'abord utilisé pour former des bourgeons, le nouveau feuillage et les nouvelles racines. **S'il reste du carbone après cette étape, il est entreposé pour constituer des réserves.** Ce n'est qu'après ça que le carbone résiduel est consacré à la croissance en diamètre de la tige et à la synthèse de composés chimiques de protection. La croissance du bois de tronc représente souvent moins de 20 % de la production totale annuelle de matière sèche. Lorsque les arbres produisent des organes reproducteurs, la demande en carbone est telle qu'elle peut limiter la croissance des autres structures (Waring et Schlesinger, 1985). La production, l'utilisation et l'entreposage des glucides varient également selon les diverses périodes d'activités végétales durant la saison de croissance. En effet, durant la saison végétative se succèdent certaines activités métaboliques dominantes. Au printemps, le développement du feuillage nécessite des réserves, car les besoins énergétiques des jeunes

feuilles dépassent ce qu'elles produisent par la photosynthèse. Pour les feuillus, seules les réserves accumulées l'année précédente contribuent à ce processus alors que pour les résineux, les réserves et la photosynthèse des feuilles plus âgées servent à fournir l'énergie requise. Les réserves sont donc particulièrement importantes pour les feuillus dont les activités de croissance débutent avant le déploiement complet du feuillage (Kozłowski *et al.*, 1991).

En général, le taux de photosynthèse du nouveau feuillage augmente jusqu'à ce que ce dernier soit pleinement déployé (Kozłowski *et al.* 1991). Il y a par la suite une baisse graduelle du taux de photosynthèse. Le taux de photosynthèse dans les feuilles qui persistent plus d'un an diminue après la première année (Kozłowski *et al.* 1991). Le taux de croissance des espèces à feuilles persistantes est davantage relié à la quantité de nouvelles feuilles qu'à la quantité totale de feuillage (Kozłowski *et al.*, 1991). En plus de pourvoir aux besoins usuels des arbres, les glucides peuvent servir à soutenir des efforts ponctuels ou, à plus long terme, à répondre aux stress exercés par les divers facteurs environnementaux.

Pour résumer, les arbres sont des puits particulièrement importants de carbone. La biomasse qui les constitue est le reflet de séquences du métabolisme carboné multiples, complexes et équilibrées (figure i.3). La biomasse accumulée reflète le fonctionnement d'un cycle endogène du carbone commun dans son principe à toutes les espèces (Figure i.3) mais variable dans l'intensité de ses séquences et ses produits suivant l'espèce, le stade physiologique et les conditions de l'environnement. Ainsi, en plus de ces caractéristiques spécifiques, l'échelle de temps considérée est importante pour le métabolisme carboné et cette importance devient primordiale lorsqu'elle est pluriannuelle.

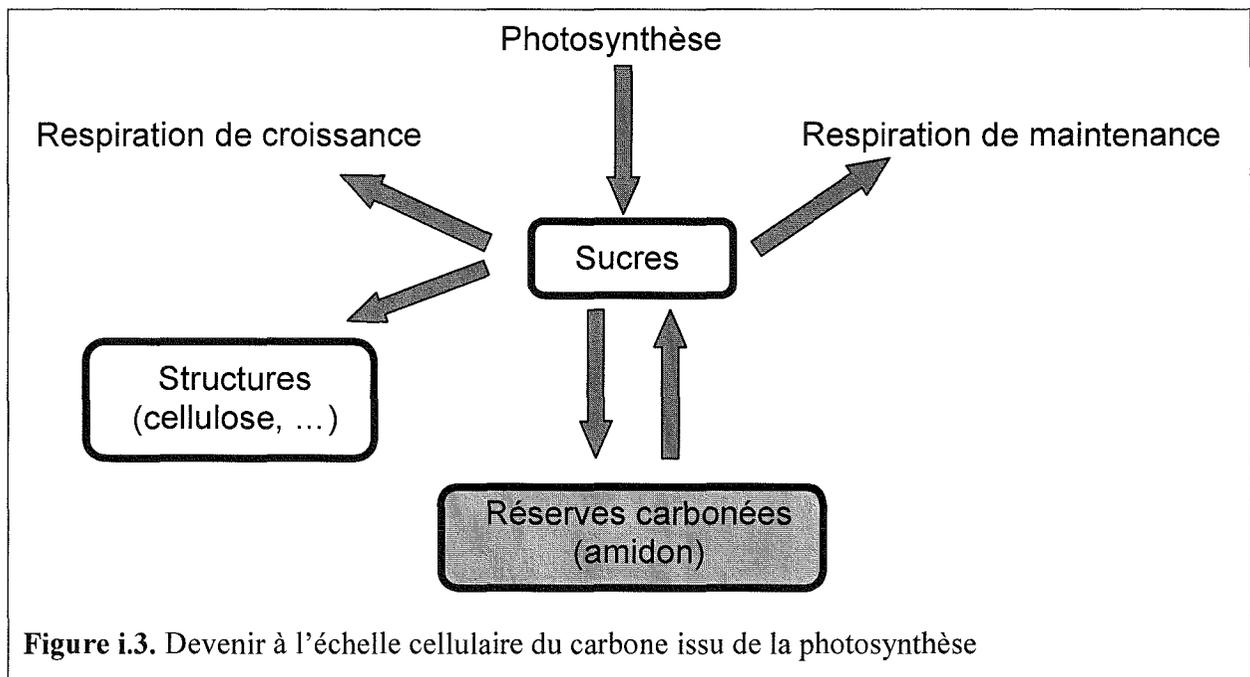


Figure i.3. Devenir à l'échelle cellulaire du carbone issu de la photosynthèse

La composition chimique de la biomasse des plantes (tableau i.I) montre que tous les organes sont constitués d'autres composés et notamment des composés azotés.

La présence de ces constituants révèle une participation active du métabolisme azoté à la constitution de la biomasse. De plus, la présence de carbone dans ces composés sous entend des interactions fortes entre métabolisme carboné et azoté.

Les sources d'azote.

Le nitrate (NO_3^-) est une source d'azote chez les espèces ligneuses. Une grande partie de ce nitrate absorbé devra être réduit en ammonium dans les racines et/ou dans les feuilles, pour entrer dans les voies de synthèse et donner les acides aminés précurseurs des protéines. Le nitrate absorbé est soit utilisé directement dans les racines, soit exporté vers les feuilles via le xylème pour être utilisé dans les organes aériens. Il peut être aussi stocké dans la vacuole des cellules des différents organes, ce stockage vacuolaire assure aux cellules racinaires une réserve de NO_3^- et participe au maintien de leur turgescence. Enfin, le nitrate peut être rapidement rejeté dans le milieu.

Lors du transport, le déversement du NO_3^- dans les vaisseaux du xylème est dû à des transporteurs de la membrane plasmique des cellules de la stèle, qui expulsent le nitrate dans

l'apoplasme, alors que les différenciations des parois de l'endoderme (cadre de Caspary) l'empêchent de retourner vers le cortex.

Le NO_3^- est absorbé activement par les racines et immédiatement réduit en NH_4^+ par l'action successive de la nitrate réductase (NR) puis de la nitrite réductase (NiR). L'abondance de la nitrate réductase dans les cellules racinaires favorise la réduction de NO_3^- au moment de l'absorption. L'assimilation de NO_3^- entre racines et parties aériennes est variable. Chez beaucoup d'espèces herbacées, la réduction de NO_3^- se fait surtout dans les feuilles, tandis qu'elle est racinaire chez de nombreuses espèces ligneuses (Gojon *et al.*, 1992). La plupart des espèces ligneuses, dont le chêne et le hêtre, ont une forte activité NR dans les racines et donc peu de NO_3^- est transporté vers les feuilles (Heller *et al.* 1991, Stepien 1992).

L'ammonium (NH_4^+) peut également être absorbé par les arbres ce qui pourrait être le fait d'une adaptation aux sols forestiers acides généralement pauvres en NO_3^- (Carrodus 1967, France et Reid 1979). L'ammonium peut être absorbé par les racines de façon active grâce à des systèmes adaptés (Lee et Stewart, 1978 cités dans Vivin 1995) ou de façon passive du fait d'un gradient électrochimique favorable (Salsac *et al.* 1987 cités dans Vivin 1995). Une fois dans la racine, l'ammonium (ion toxique pour les cellules) est rapidement combiné avec du glutamate par la glutamine synthétase (GS) pour former de la glutamine. Cette glutamine est elle même combinée à de l' α -cétoglutarate par la glutamate synthase ou glutamine α -cétoglutarate aminotransférase (GOGAT) pour former deux glutamates.

L'assimilation de l'ammonium (absorbé directement ou issu de la réduction du nitrate) est essentiellement assurée par l'association GS/GOGAT, mais une seconde voie minoritaire existe dans laquelle l'ammonium est directement combiné à α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH) pour fournir du glutamate.

Les composés organiques azotés présents dans la plante

Les *acides aminés* ont pour formule fondamentale $\text{R-CHNH}_2\text{-COOH}$ et ont des propriétés de bases et d'acides car chaque acide aminé possède un groupe amine (NH_2) et un groupe carboxyl (COOH). Dans l'acide aminé le plus simple, la glycine, R est représenté par un atome hydrogène. Dans d'autres, R peut être très complexe et peut contenir un groupe amine supplémentaire ou des

groupements carboxyl supplémentaires. On considère qu'environ 20 acides aminés sont des composantes de protéines végétales (Morot-Gaudry 1997).

Les premiers acides aminés synthétisés après l'intégration de l'ion ammonium aux squelettes carbonés par la voie GS/GOGAT sont la glutamine et le glutamate. Par transamination, leur azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés (acides α -cétoniques) pour former des nouveaux acides aminés (aspartate, α -alanine, glycine) eux mêmes précurseurs de tous les autres acides aminés. Les acides aminés synthétisés sont soit utilisés sur place soit exportés vers les cellules hétérotrophes pour l'azote *via* les tissus conducteurs. Le transport des acides aminés se fait à la fois à courte et longue distance. Le transport à courte distance implique le passage des composés de cellule à cellule, il s'effectue soit symplastiquement par l'intermédiaire des plasmodesmes, soit apoplastiquement dans les espaces intercellulaires ; le transport à longue distance (entre organes) implique, lui, l'entrée dans le système vasculaire de la plante : xylème ou phloème, le transport le long des vaisseaux puis la sortie au niveau de l'organe puits (Rochat 1997). Les acides aminés sont les précurseurs de nombreux composés organiques azotés tels que amides, protéines, acides nucléiques, des alcaloïdes et même les chlorophylles (dans les tissus chlorophylliens) et de composés organiques non azotés tels que les lignines (Figure i.4). Dans cette introduction, seules les protéines sont mentionnées, les autres composés seront évoqués dans le deuxième chapitre.

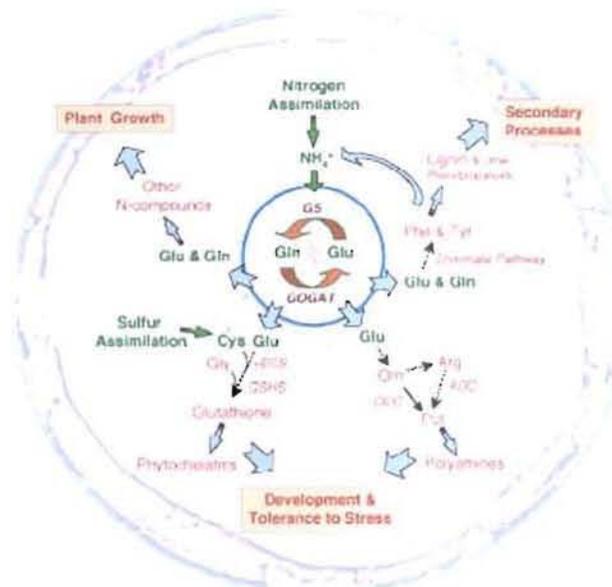


Figure i.4. Schéma indiquant les voies succinctes de produits du métabolisme azoté (Gallardo *et al.* 2003).

Les protéines font partie des principaux composants organiques du protoplasme. Ce sont des molécules azotées extrêmement complexes de haut poids moléculaire qui diffèrent l'une de l'autre par leur forme, leur taille, leurs propriétés de surface et même leur fonction. Elles ont en commun d'être formées à partir des aminoacides, elles sont amphotères et ont des propriétés colloïdales. Une partie de ces protéines dites insolubles sont totalement intégrées à différentes structures cellulaires, principalement aux membranes et aux parois des différents compartiments cellulaires. Sur l'ensemble des protéines des cellules vivantes, un peu moins de 30% correspondent à ces protéines structurelles (Sauter et Wellenkamp 1998). Cet azote structurel ne serait pas mobilisable (Terziev *et al.* 1997). Parmi les autres protéines, se retrouvent les protéines enzymatiques solubles jouant un rôle essentiel dans les séquences métaboliques et d'autre part, celles qui sont présentes dans des organes pérennes et qui, en assurant une fonction de stockage d'azote, jouent un rôle primordial au sein du rythme saisonnier.

Les protéines de réserve constituent un stock d'azote important chez de nombreuses plantes

Les protéines de réserve ont été d'abord décrites dans les graines (SSP pour Seed Storage Protein) pour leur rôle dans la fourniture de l'azote nécessaire aux plantules pour le démarrage de leur croissance. Depuis, des protéines spécifiques pouvant avoir un rôle analogue ont été mises en évidence dans les tissus végétatifs (Staswick 1994) et ont été appelées VSP (pour Vegetative Storage Protein) s'accumulant transitoirement en grande quantité dans les différents tissus végétatifs : feuilles, tiges, tubercules, racines, pivot et rhizomes dans les stolons de différentes espèces herbacées. De nombreuses espèces ligneuses présentent également des VSP essentiellement localisées au niveau du parenchyme du xylème ou du phloème. Ces protéines sont stockées de façon abondante au cours de l'automne et de l'hiver dans les organes pérennes puis disparaissent à la reprise de croissance au printemps.

Selon Staswick (1994), les critères de caractérisation des VSP sont les suivants :

- elles sont localisées dans de petites vacuoles déshydratées (corps protéiques)
- elles représentent au moins 5 % des protéines totales,
- elles sont stockées pour assurer les besoins nutritionnels requis pour un stade de développement ultérieur.

Les VSP constituent un moyen de stocker de l'azote de façon temporaire dans des tissus de réserves spécifiques et présentent un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres formes de stockage de l'azote (Millard 1988, Chapin *et al.* 1990, Heilmeier et Monson 1994). Ce stockage transitoire de l'azote sous forme protéique dans les vacuoles, même s'il est énergétiquement plus coûteux que d'autres formes de stockage, permet probablement de contribuer à l'homéostasie osmotique des tissus, l'accumulation sous forme de nitrate provoquant par exemple des déséquilibres osmotiques. De plus, Millard (1988) souligne que le processus de mise en réserve sous forme protéique au niveau foliaire permet à la feuille de continuer à réaliser la réduction du NO_3^- . Elles contribuent de manière significative à la fourniture d'azote nécessaire à des stades de développement où la croissance est particulièrement intense (édification de l'appareil reproducteur, réactivation des méristèmes en sortie de période hivernale, repousse après une coupe...).

Les métabolismes carbonés et azotés sont en étroite interaction.

Au cours des 20 à 50 dernières années, plusieurs séries d'études ont révélé une étroite interaction entre métabolisme carboné et azoté. La participation de molécules azotées comme les pigments photosynthétiques, la Rubisco et les enzymes du cycle de Calvin, est nécessaire à l'assimilation du carbone, et de son côté, l'assimilation de l'azote nécessite des squelettes carbonés, de l'énergie, du pouvoir réducteur qui sont fournis par le métabolisme du carbone par le biais de la photosynthèse et la respiration (Ferrario *et al* 2001). Si la capacité d'absorption ou d'assimilation d'un des deux composés est modifiée, un ajustement a lieu dans l'autre (Martins-Loução et Cruz 1999). Les assimilations du carbone et de l'azote sont co-régulées afin de maintenir un équilibre permettant le développement optimal du végétal (Ferrario *et al* 2001).

Pour résumer (Figure i.5), carbone et azote sont assimilés puis répartis au sein de la plante selon la force de puits de ses différents organes. Une fraction des assimilats carbonés et azotés n'est pas immédiatement utilisée, elle est alors stockée sous la forme de composés dits « de réserve » qui pourront être utilisés ultérieurement.

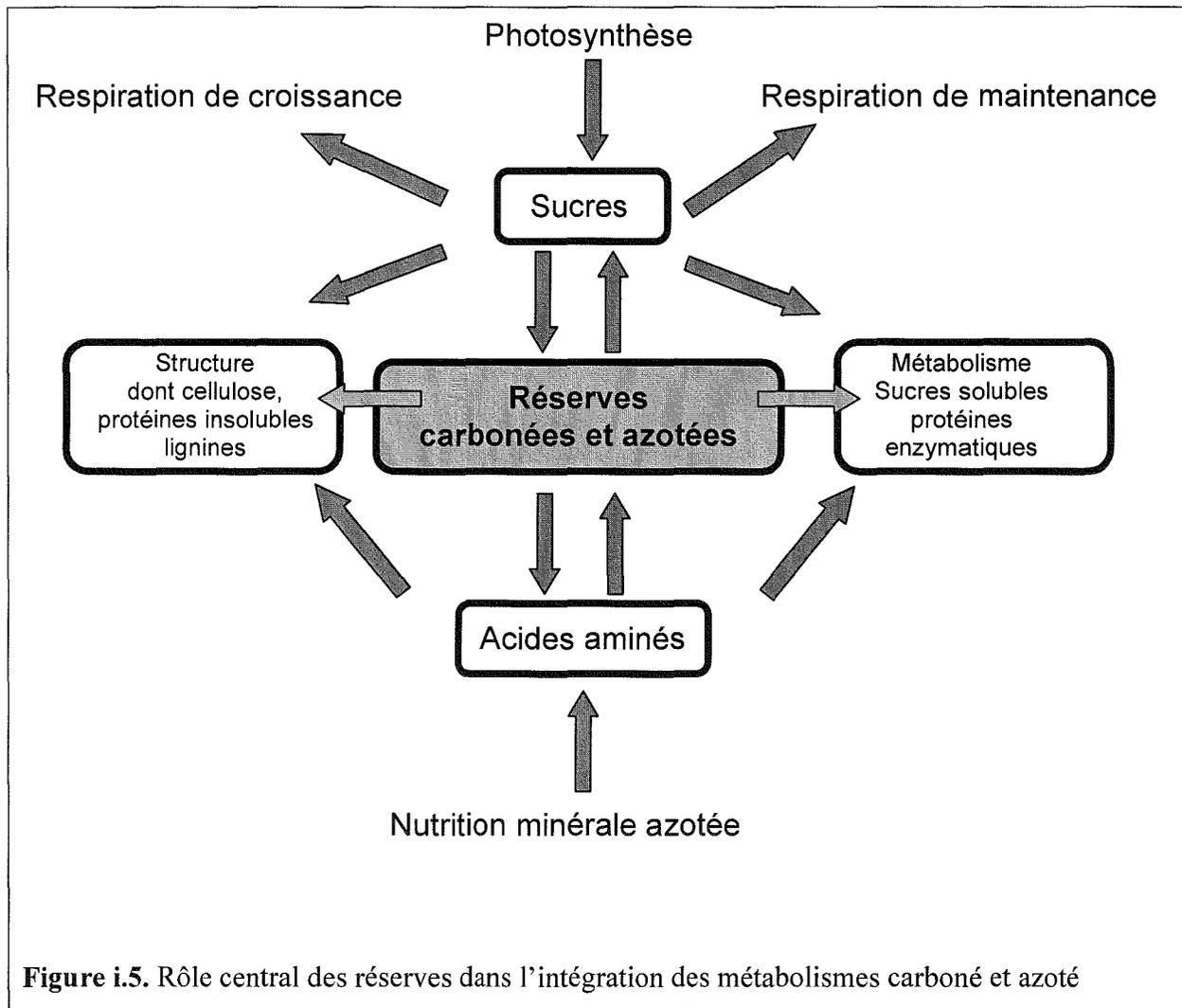


Figure i.5. Rôle central des réserves dans l'intégration des métabolismes carboné et azoté

La plupart des études sur les bilans carbonés et azotés ont été conduites et largement développées sur des espèces herbacées annuelles, les connaissances sont beaucoup plus rares ou incomplètes sur les espèces pérennes et plus particulièrement les arbres (Gallardo *et al* 2003).

Le progrès des études physiologiques et moléculaires dans les arbres sont souvent difficiles du fait de leur grande variabilité génomique, de la longueur de leur cycle de vie, des difficultés rencontrées pour la transformation génétique et la multiplication *in vitro* et enfin, du fait des problèmes techniques rencontrés lors des analyses moléculaires et biochimiques [présence de contaminants particulièrement abondants tels que les tannins et phénols]. Pourtant, les études sur les arbres sont de première importance pour différentes raisons :

- les arbres fournissent par leur biomasse une gamme de produits d'intérêt commercial, en incluant le bois, la pulpe, les produits du bois, et les métabolites secondaires importants.
- ce sont de grands atouts dans les programmes de l'environnement liés par exemple à la reforestation et à la protection des sols.
- les arbres sont aussi des composants essentiels du paysage naturel.
- enfin, comme indiqué précédemment, les écosystèmes forestiers jouent un rôle crucial dans la gestion globale du carbone, les réponses au changement climatique global, et la conservation de la diversité biologique.

Il est connu depuis des années que la pérennité des arbres peut s'expliquer par une gestion saisonnière et pluriannuelle de composés mis en réserve (Sauter et Van Cleve 1994). En effet, le stockage des réserves est une des fonctions majeures des arbres au même titre que l'acquisition, le transport, la croissance, la défense et la reproduction (Chapin *et al.* 1990). Cette fonction physiologique permet le découplage dans le temps entre l'acquisition des ressources et l'utilisation. Elle constitue un mécanisme adaptatif qui assure la pérennité des arbres face à un environnement aux conditions variables, en rendant possible le développement d'une stratégie permettant aux plantes d'optimiser la gestion de leur ressources au cours du temps.

Les arbres doivent régulièrement faire face à divers stress biotiques et abiotiques au cours desquels une partie de réserves va être consommée, par exemple quand un stress hydrique a lieu, il est fréquent d'observer une diminution de la concentration en amidon avec une augmentation de sucres solubles (Chaves 1991). Par ailleurs, si une attaque par un pathogène affaiblit la plante et affecte son fonctionnement, une partie des réserves peut être mobilisée pour la synthèse de composés de défense et pour maintenir le métabolisme. Les réserves stockées dans le restant de l'arbre lui permettent de reformer le feuillage (Vanderklein et Reich 1999, Cherbury *et al.* 2001), de survivre à des défoliations dans la même saison (Hoch *et al.* 2003). Le contenu en réserves peut aussi être utilisé pour évaluer l'état physiologique et présager la détérioration de la biomasse aérienne due à un stress (Carroll *et al.* 1983) ou à des facteurs biotiques (Wargo *et al.* 1972, Wargo 1978, Coffelt *et al.* 1993) ; les concentrations en composés de réserves et la croissance sont des indicateurs pertinents pour l'évaluation de l'état de santé d'un arbre (Renaud et Mauffette 1991).

Les réserves jouent également un rôle primordial au sein du rythme saisonnier chez les plantes pérennes. Pendant l'hiver, en climats tempérés, les arbres montrent un repos végétatif. Ainsi, pendant cette période, ils doivent assurer l'entretien de leurs organes et tissus alors que l'assimilation des ressources est ralentie ou absente. Les réserves stockées dans les tissus leur permettent d'assurer cette fonction (Kramer et Kozlowski 1979). Abaisant le point de congélation des tissus grâce à l'hydrolyse d'amidon en sucres solubles faisant fonction d'agents osmotiques, les réserves permettent également aux arbres de s'endurcir au froid et de résister aux gelées pendant l'hiver.

La maîtrise de la production passe par la connaissance précise du mécanisme d'accumulation de la biomasse : absorption des éléments indispensables, fonction (structure, réserves, reproduction) et répartition entre les organes constitutifs de l'arbre. Prévoir les quantités accumulées à l'automne afin de prédire les limitations possibles de la croissance au printemps suivant constitue donc un objectif important. Pourtant, à l'heure actuelle, les études concernant les réserves chez les arbres sont encore fragmentaires ou ne concernent qu'un nombre limité d'espèces fruitières et forestières.

Chez les espèces sempervirentes, la remobilisation des réserves pour le développement de la nouvelle pousse peut avoir une importance mineure du fait de la présence d'un appareil photosynthétique intact dans les feuilles des années précédentes. Chez *Pinus sylvestris*, la fourniture du carbone pour le débourrement et la croissance de la pousse est assurée exclusivement par les assimilats courants fournis par les aiguilles de 1 an. Le carbone stocké à l'automne dans le tronc et les racines, quant à lui, est utilisé pour la formation du bois initial et du phloème correspondant dans le tronc et les racines (Hansen et Beck 1990, Hansen et Beck 1994, Hansen *et al.* 1996).

Chez les espèces décidues, la perte de l'ensemble du feuillage, avant d'entrer en dormance hivernale, suppose que des réserves sont nécessaires au printemps pour le débourrement et la croissance des nouvelles feuilles, c'est à dire bien avant que l'appareil photosynthétique ne soit fonctionnel (Dougherty *et al.* 1979 ; Bréda et Granier, 1996). Les réserves carbonées de nature glucidique représentent environ 35% de la biomasse chez les jeunes plants feuillus (Dickson 1991) et plus particulièrement chez les jeunes plants de chêne (Vizoso 2004). Les réserves

Tableau i. IV. Caractéristiques générales sur les espèces étudiées (Rameau *et al* 1989)

	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	<i>Fagus sylvatica</i> L.
Noms communs	chêne blanc, chêne femelle, gravelin, chêne à grappes, châgne	chêne rouvre, chêne mâle, drille, drillard, durelin, chêne noir, chêne blanc	Foyard, fayard, fouteau, Fau, fouillard, favinier
Famille	Fagacées		
Biologie			
Dimensions	25 – 35 m	20 – 40 m	30 – 40 m
Longévité	500 – 1000 ans	500 – 1000 ans	150 – 300 ans
Phénologie	caducifoliée	Caducifoliée	caducifoliée
Capacité à rejeter de souche		Oui	mauvaise à l'étage collinéen, bonne à l'étage montagnard
Diagnostic			
Ecorce	Ecorce d'abord lisse et grisâtre, puis épaisse, profondément crevassée (fond rose) en long	d'abord lisse et verdâtre, mince, puis grisâtre, fissurée longitudinalement et peu profondément	jeune lisse et gris noirâtre, restant mince, lisse (parfois très légèrement fissurée et grise
Tronc	Tronc droit		
Branche	tourmentées	moins tourmentées que celles du <i>Q. robur</i>	branches redressées à 60°
Jeunes rameaux	glabres, gris brun, brillants	glabres bruns gris	alternes, lisses glabres, brun olive
Bourgeon	ovoïdes	ovoïdes pointus, bruns un peu poilus sur le bord des écailles, agglomérés aux extrémités des rameaux ;	bourgeons fusiformes pointus (piquants), longs (2 cm), bruns et brillants
Feuilles	alternes à très court pétiole (< 1 cm), ondulées, à lobes arrondis, pourvues d'oreillettes à la base	pétiolées, visibles une par une alternes, nettement pétiolées, planes, en coin à la base, à 7 – 12 lobes arrondis et à sinus peu profonds espèce monoïque	alternes, ovales aiguës (longues de 4 – 9 cm) à bord entier (cilié à l'état jeune), courtement pétiolées avec 6 – 8 paires de nervures
Fleurs	unisexuées régulières	fleurs unisexuées régulières floraison en mai au même temps que la feuillaison	
Fleurs mâles	en longs chatons pendants à la base des jeunes pousses	en long chatons pendants à la base de l'année	en chatons globuleux pendant à la base des jeunes rameaux
Fleurs femelles	presque invisibles, terminales, en petits bourgeons	minuscules, par 2 – 5 à l'aisselle des feuilles des pousses de l'année	groupées par 2 dans une capsule verdâtre, terminale
Fruit	glands par 1-5, sur un pédoncule long	glands sessiles, longs de 1 – 2 cm	cupules ligneuses hérissées à 3 ou 4 valves, contenant 3 ou 4 faînes trigones
Pollinisation	par les insectes		
Fructification	+/- régulière suivant les régions		
Distribution géographique	espèce eurasiatique subocéanique.	Espèce à tendance subatlantique.	espèce européenne à tendance subatlantique

Suite. Tableau IV au verso de la page suivante

carbonées représentent 10 % de la biomasse chez des arbres adultes (Barbaroux 2002) et sont essentiellement sous forme d'amidon. Le saccharose, moins abondant, représente 75% des sucres solubles (Kramer et Kozlowski 1979). Sous climats tempérés, le niveau maximum s'observe en octobre c'est-à-dire avant la chute des feuilles. Les réserves azotées sont également mises en place à l'automne mais représentent une fraction moins importante de la biomasse puisque l'azote en lui-même correspond à environ de 1% de la biomasse dans un arbre (Sauter *et al.* 1989) : l'azote foliaire (la Rubisco constituant 85% de cet azote) est recyclé avant l'abscission des feuilles et ce processus permettrait à l'arbre de sauvegarder jusqu'aux 2/3 de son contenu en azote (Shim *et al.* 1972). Les produits de l'hydrolyse, plus facilement transportables, sont stockés sous forme d'acides aminés et de protéines dans les parties pérennes de l'arbre (Dickson 1989, Titus et Kang 1982).

Les observations réalisées se limitent le plus souvent à la description des tendances générales des variations saisonnières, sans approfondir les mécanismes d'interactions entre croissance et gestion des réserves. Les différences interspécifiques, observées tant au niveau du timing que des quantités stockées, peuvent probablement être interprétées en termes d'équilibre sources puits. Pour le carbone, les formes de réserves, ainsi que les chaînes métaboliques qui aboutissent à leur formation (puis à leur dégradation), sont connues, ce qui n'est pas le cas pour l'azote. Les connaissances doivent être complétées par (i) une meilleure caractérisation des formes de réserves (acides aminés et protéines), (ii) une caractérisation de la dynamique d'évolution simultanée des réserves carbonées et azotées entre l'automne et le printemps, (iii) une estimation qualitative et quantitative des réserves azotées dans le bilan global de l'arbre, notamment forestier, particulièrement lors de la reprise de croissance.

Les modèles choisis pour répondre à ces besoins sont ceux pour lesquels la dynamique saisonnière des réserves carbonées en relation avec la croissance a été caractérisée pour des jeunes arbres (Vizoso 2004) et des arbres adultes (Barbaroux 2002) dans notre l'UMR INRA UHP Nancy I. Il s'agit des chênes et du hêtre qui sont des essences particulièrement abondantes dans les forêts françaises. Le tableau i.IV résume les caractéristiques des essences étudiées : le chêne pédonculé *Quercus robur* L, le chêne sessile *Quercus petraea* (Matt.) Liebl et le hêtre *Fagus sylvatica* L. Chez ces espèces, les connaissances sur la nature des réserves azotées sont

Tableau i. IV suite. Caractéristiques générales sur les espèces étudiées (Rameau *et al* 1989)

	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	<i>Fagus sylvatica</i> L.
	Commune partout en plaine, sauf en région méditerranéenne, où elle est devenue très rare, absente en Corse.	Commune partout en plaine, sauf dans le sud-ouest, où elle est devenue disséminée et dans la région méditerranéenne, où elle a été toujours rare.	Commune en plaine dans la moitié nord de la France et en montagne dans la moitié sud
Autécologie			
Tempérament	Pionnier	Post pionnier	Dryade
Amplitude écologie	neutralité à large amplitude	large amplitude (essence très plastique).	très large amplitude.
Etage altitudinal	distribution jusqu'à 1300 m : de l'étage collinéen à la base de l'étage montagnard	Distribution jusqu'à 1600 m, de l'étage collinéen à la base de l'étage montagnard, étage supra méditerranéen.	jusqu'à 1700 m : étages collinéen et montagnard.
Sol	sols profonds bien alimentés en eau	tolérant les sols à pseudogley	peu compétitive sur les sols les plus acides, supporte les sols peu profonds
Hydromorphie	mésophile à mésohygrophile		mésophile à xérophile
Enracinement	profond	profond	superficiel
Exigence trophique	héliophile	espèce de demi ombre	sciaphile
	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.	<i>Fagus sylvatica</i> L.
Exigence hydrique		craigne les fortes sécheresses estivales	précipitations annuelles supérieures à 750 mm, favorisée par une humidité atmosphérique élevée
Anatomie du bois	Bois à zone poreuse large	Bois à zone poreuse étroite	Bois à pores diffus
Utilisations du bois	Utilisation en décoration intérieure, tranchage, ébénisterie, menuiserie, parquet, escaliers, tournerie, sculpture, construction, charpente, traverses de chemin de fer, bois de mine, poteaux, piquets ; merrains (tonneaux pour vins et alcools) ; panneaux de fibres et de particules ; construction navale, pilotes, charpente monumentale, ponts, écluses, charronnage, jantes, roues, moyeux, pièces de machines, wagons.		Pâte à papier, panneaux de fibres et de particules, sciages pour la menuiserie et l'ébénisterie, parquets et lambris, objets ménagers (cure dents, pic à brochette, manche de casserole), manches d'outils, instruments de musique, contre-plaqués, bois imprégné, mobilier, traverses de chemin de fer, calage, patins de frein de métros à pneus, rames, avirons, pelles, instruments agricoles, jantes de roues, hélices d'avions, sommiers de pianos ; excellent bois et charbon très estimé
Usages divers	Les glands ont servi à la nourriture des porcs ; plante astringente et hémostatique		Les fânes sont comestibles et fournissent de l'huile ; écorce astringente et fébrifuge ; créosote antiseptique et désinfectante ; charbon bactéricide et antituberculeux, plante ornementale.

fragmentaires (Wetzel et Greenwood 1991), ou ne concernent qu'une des deux espèces (Rennenberg *et al.* 1994, Fotelli *et al.* 2002, Nahm *et al.* 2006) alors que des différences interspécifiques ont été montrées pour les réserves carbonées. Le chêne mobilise environ deux fois plus de TNC que le hêtre (Barbaroux 2002, Barbaroux et Bréda, 2002). Par ailleurs, les chênes, dont les gros vaisseaux sont très sensibles à l'embolie hivernale, sont incapables de dissoudre ces embolies vasculaires en sortie d'hiver et mobilisent au printemps une forte quantité de réserves pour mettre en place le bois initial du nouvel anneau de croissance avant l'apparition des feuilles (Bréda et Granier 1996). Au contraire, le hêtre, espèce à pores diffus de petite taille, est moins sensible à l'embolie hivernale et la croissance radiale débute un peu après le débourrement : la quantité de réserves mobilisées est plus faible puisque le système est plus rapidement autotrophe pour le carbone (Barbaroux *et al.* 2003).

Ainsi, les axes directeurs de la thèse porteront sur l'analyse comparée des dynamiques saisonnières des réserves azotées chez les chênes et le hêtre et une relation sera faite avec la gestion des réserves carbonées de ces deux espèces. Ma thèse se décompose en trois chapitres :

Le premier chapitre porte sur les dynamiques saisonnières des protéines solubles totales et leur distribution dans les différents compartiments d'arbres adultes de chêne sessile (*Quercus petraea* L.) et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.). L'expérience a été réalisée sur les mêmes échantillons que ceux utilisés par Barbaroux (2002) de manière à pouvoir dans un premier temps caractériser i) si la distribution des protéines au sein de l'arbre est comparable à celle des composés carbonés ii) s'il est possible de caractériser des compartiments de stockage et iii) s'il existe des différences interspécifiques. Dans un deuxième temps, les protéines représentant également un stock potentiel de carbone, nous avons cherché à savoir quelle était la contribution de ces composés dans le bilan de carbone et plus particulièrement dans le carbone investi lors de la reprise de la croissance. Enfin, une estimation de la contribution des protéines solubles à l'azote total a été réalisée.

Le deuxième chapitre porte sur la composition de la biomasse en réserves carbonées et azotées chez des arbres adultes de chêne pédonculé (*Quercus robur* L) de manière à compléter notre étude et à comparer le comportement du chêne sessile et du chêne pédonculé. En France, les deux espèces prédominent, elles présentent des différences (hauteur, longévité, etc... voir Tableau i.IV) mais les écophysologies des deux espèces sont difficiles à distinguer. Dans l'UMR,

d'autres recherches ont d'ailleurs été entreprises de longue date pour trouver des caractéristiques écophysiological (Bréda 1994, Ponton 2002) qui pourraient les distinguer. Par ailleurs, bien que Wetzell et Greenwood (1991) n'aient pas identifié de protéines de réserve (VSP) chez le chêne rouge (*Quercus rubra* L.), nous avons entrepris d'identifier de telles protéines chez le chêne pédonculé de manière à savoir quelle en était la proportion par rapport aux protéines totales chez cette espèce. Enfin, alors qu'il y a un certain consensus pour l'amidon, la nature de la forme azotée remobilisable est variable suivant les espèces. Ainsi pour le pêcher (Gomez et Faurobert 2002), les VSP et acides aminés représenteraient respectivement 3 et 40% de l'azote remobilisé au printemps. Par contre, chez le pommier, Kang et Titus (1980) montrent que 90% de l'azote remobilisé est de nature protéique contre 10% sous forme d'acides aminés. Ces composés ont donc été analysés de manière à caractériser la nature de la forme mobilisable chez le chêne pédonculé, ce qui n'avait pu être réalisé pour le chapitre 1.

Le troisième chapitre porte sur l'étude comparative des effets de la défoliation et l'effet lumière/ombre sur la croissance et le stockage des réserves chez de jeunes arbres de chêne sessile et de hêtre. Les objectifs de cette étude sont multiples :

1) la production des réserves aussi bien carbonées qu'azotées dépend de l'efficacité des prélèvements de CO₂ atmosphérique (feuilles) et d'azote (racines) pendant la saison végétative. Une étude préalable réalisée par Vizoso (2004) a montré qu'au terme d'une saison de végétation, la fertilisation contrôle non seulement l'accumulation de réserves azotées dans les parties pérennes de jeunes chênes mais qu'elle détermine également l'accumulation de carbone dans les organes pérennes et les nouveaux organes. Dans la même optique, afin d'étudier les interactions entre carbone et azote, nous avons entrepris de déterminer quel pouvait être, à l'inverse, l'impact d'une baisse de disponibilité en carbone sur l'accumulation des réserves carbonées et azotées. Pour cela, nous avons procédé, sur une partie des jeunes plants de chêne et de hêtre, à des défoliations et/ou des variations d'intensité lumineuse et nous avons analysé les réserves carbonées et azotées présentes dans les organes pérennes. Cette étude se justifie d'autant plus que des problèmes de dépérissement de chênes, en forêt lorraine, liés à une ou plusieurs années de défoliations se manifestent de manière croissante. Si la formation de nouvelles feuilles en remplacement des feuilles perdues est impossible la même année en cas de défoliation tardive, les réserves carbonées et azotées ne pourront se reconstituer à leur niveau habituel avant l'hiver, ce

qui peut s'avérer pénalisant, à la fois pour la survie hivernale et la nouvelle croissance au printemps.

2) sur une partie des plants défoliés ou non et/ou placé en pleine lumière ou à l'ombre, nous avons réalisé un marquage isotopique stable ^{15}N au printemps de manière à distinguer l'azote absorbé au moment de la reprise de la croissance de celui alloué avant l'hiver aux réserves azotées.

3) enfin, l'analyse des composés carbonés et azotés accumulés avant l'entrée en dormance hivernale et mobilisés au printemps a été évaluée sur les jeunes semis de chêne et de hêtre de manière à pouvoir tester, en comparaison avec les expériences précédentes, l'effet de l'âge sur la nature des composés de réserve impliqués.

**Dynamique saisonnière et distribution
des protéines solubles totales
dans les différents compartiments d'arbres adultes
de chêne sessile (*Quercus petraea* L.)
et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.).**

La thèse de Cécile Barbaroux (2002) portait pour une part sur l'analyse de la dynamique saisonnière des réserves glucidiques dans les différents compartiments (racines, tronc, branches,..) d'arbres adultes de chêne sessile et de hêtre. C. Barbaroux a pu définir que les mois d'Octobre et de Juin étaient les dates de stock maximal et minimal de ces réserves carbonées chez les deux espèces. Par ailleurs, suite à ce travail, Barbaroux *et al.* (2003) ont montré que le carbone des sucres totaux non structuraux (TNC) mis en réserve à l'automne et utilisé au cours de la reprise de la croissance assure une part importante du carbone qu'ils ont estimé comme étant nécessaire pour la maintenance hivernale des tissus et pour la reprise de la croissance. Cependant, leur bilan n'est pas totalement bouclé puisque le C mis en réserve dans les TNC apporterait 92% et 62% du coût total de carbone pour la maintenance et la reprise chez le chêne et le hêtre respectivement. Les auteurs ont alors suggéré la présence d'autres composés carbonés qui potentiellement pourraient participer au processus, un des candidats potentiel, au vu de la littérature étant les protéines de réserves qui sont également des composés carbonés.

De manière à pouvoir tester la contribution du carbone issu des protéines à la mobilisation du carbone total, les protéines solubles totales ont été extraites à partir des échantillons lyophilisés préparés et utilisés par C. Barbaroux lors de sa thèse (2002). Dans un premier temps, cette analyse avait pour but de caractériser les concentrations et quantités de protéines dans les différents compartiments pour chaque espèce, ce qui à notre connaissance n'avait pas encore été réalisé sur des arbres adultes de ces espèces forestières.

Nous avons ensuite estimé quelle était la contribution des protéines solubles à la fraction d'azote total de manière à savoir si les protéines solubles dosées faisaient partie des composants principaux de l'azote présent chez ces deux espèces.

Par ailleurs, l'échantillonnage ayant été réalisé aux deux dates (Octobre et Juin) correspondant aux stocks maximal et minimal de réserves glucidiques (Barbaroux 2002) nous avons cherché à savoir si des modifications se produisent également pour les teneurs en protéines solubles

Forêt de Champenoux (54)

Chênaie – 45 ans

Responsable scientifique Nathalie Bréda

Forêt de Hesse (57)

Hêtraie – 35 ans

Responsable scientifique André Granier



Photo 1.1 Les sites expérimentaux gérés par l'UMR Ecologie et Ecophysiologie Forestières sur lesquels ont été réalisés les abattages d'arbres et l'échantillonnage (Photos N. Bréda).

entre ces deux dates. Une telle approche avait pour but de définir si une proportion de ces protéines dosées pourrait correspondre à des protéines de réserve.

Les résultats de cette expérience ont été rédigés sous la forme d'un article qui a été soumis à *Tree Physiology*. Ce chapitre se composera donc d'un matériel et méthodes en français détaillant l'ensemble de l'expérience et sera suivi du manuscrit qui a été envoyé à l'éditeur. Enfin, nous avons complété cette analyse exhaustive dans tous les compartiments des arbres par l'analyse d'une cinétique des protéines solubles totales dans le tronc des chênes et des hêtres, afin de discuter des dynamiques couplées des glucides (carbone) et des protéines (azote).

Matériels et Méthodes

Les sites expérimentaux

Le site de Hesse (photo 1.1)

Le site expérimental est localisé dans la forêt domaniale de Hesse (300 ha) en Moselle (France, 48°40'27'' N, 7°03'53'' E, altitude 305 m, pente < 2%). Ce site fait partie du réseau européen CARBOEUROPE dont l'objectif est de mesurer les flux d'eau et de gaz carbonique au dessus de 17 couverts forestiers européens. Ce programme devrait également permettre d'estimer et de modéliser la capacité des forêts européennes à agir comme puits de carbone.

Le peuplement étudié est quasiment pur, composé à 90% de hêtre (*Fagus sylvatica* L.), les autres essences forestières étant le bouleau (*Betula alba*) et le charme (*Carpinus betulus*). L'âge des arbres varie entre 25 et 35 ans ; ils sont donc trop jeunes pour fructifier. En 1998, la densité du peuplement était de 3800 tiges/ha avec une surface terrière de 19.6 m²/ha. En moyenne, la hauteur et la circonférence à 1.30 m étaient de 12.7 m et 22.7 cm respectivement. Différentes classes de dominance ont été établies en fonction de la circonférence (C130) et de la hauteur des arbres, ce qui permet de caractériser le peuplement avec 19.8% de dominants (C130 de 30 à 65 cm) 28.3% de codominants (C130 de 20 à 29.9 cm), de dominés (C130 de 16 à 19.9 cm) et 30.9% de surcimés (C130 de 8 à 15.6 cm).

Le sol est de type luvisol (sol brun lessivé à pseudogley) avec un humus de type mull mésotrophe. On note un bon enracinement jusqu'à 35 cm où l'on observe les traces d'une nappe temporaire (pseudogley). Au-delà de 35 cm, l'enracinement est faible mais réparti de façon bien homogène jusqu'à 1.20 m de profondeur (Granier *et al.* 2001). Les analyses

chimiques du sol (Quentin 1999) et les relevés de la végétation spontanée (Sépulchre 2000) indiquent une forte richesse minérale.

Le climat est de type océanique à influence continentale. Les moyennes des précipitations et des températures annuelles sont de 820 mm et de 9.2°C respectivement. Le mois le plus froid est janvier avec une température moyenne minimale de -2°C et le mois le plus chaud est juillet avec une température moyenne maximale de 22°C (Kessler et Chambraud 1990).

Le site de Champenoux (photo 1.1)

La forêt domaniale de Champenoux, située à 15 km à l'est de Nancy (48°44'N, 6°14'E, altitude 237 m) est composée à 88% en volume de chênes. Les caractéristiques climatiques présentent des précipitations et des températures moyennes annuelles de 744 mm et de 9.2°C respectivement. Le mois le plus froid est janvier avec une température moyenne minimale de -2°C et les mois les plus chaudes sont juillet et août avec une température moyenne maximale de 23°C (Kessler et Chambraud 1990). Dans cette forêt, deux parcelles de chênes ont fait l'objet de mesures.

Le site expérimental situé en parcelle 52 a une superficie de 0.64 ha. Le peuplement est constitué essentiellement de chênes sessiles (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) et pédonculés (*Quercus robur* L.) adultes en mélange. En 1998, les chênes sont âgés de 45 ans en moyenne et ils fructifient rarement. En 1992, la moitié du peuplement a été éclaircie. La densité du peuplement est de 2531 tiges/ha avec une surface terrière de 23.67 m²/ha pour la partie éclaircie tandis que la partie témoin présente une densité de 2575 tiges/ha avec une surface terrière de 29.77 m²/ha. La hauteur dominante du peuplement est de 17 m. Le sol est brun lessivé à pseudogley. 85% de l'enracinement sont répartis dans les 70 premiers cm du sol, au dessus du pseudogley, tandis que les 15% restant sont distribués jusqu'à 2.20 m de profondeur (Bréda *et al* 1995). Les analyses foliaires ont montré une bonne fertilité de la station. D'après les relations hauteur-âge de la région Lorraine pour le chêne, le massif de Champenoux se trouve dans la meilleure classe de fertilité.

Les différents échantillonnages

Echantillonnage pour l'estimation des quantités totales de protéines solubles dans les différents compartiments de chêne sessile et de hêtre à deux dates

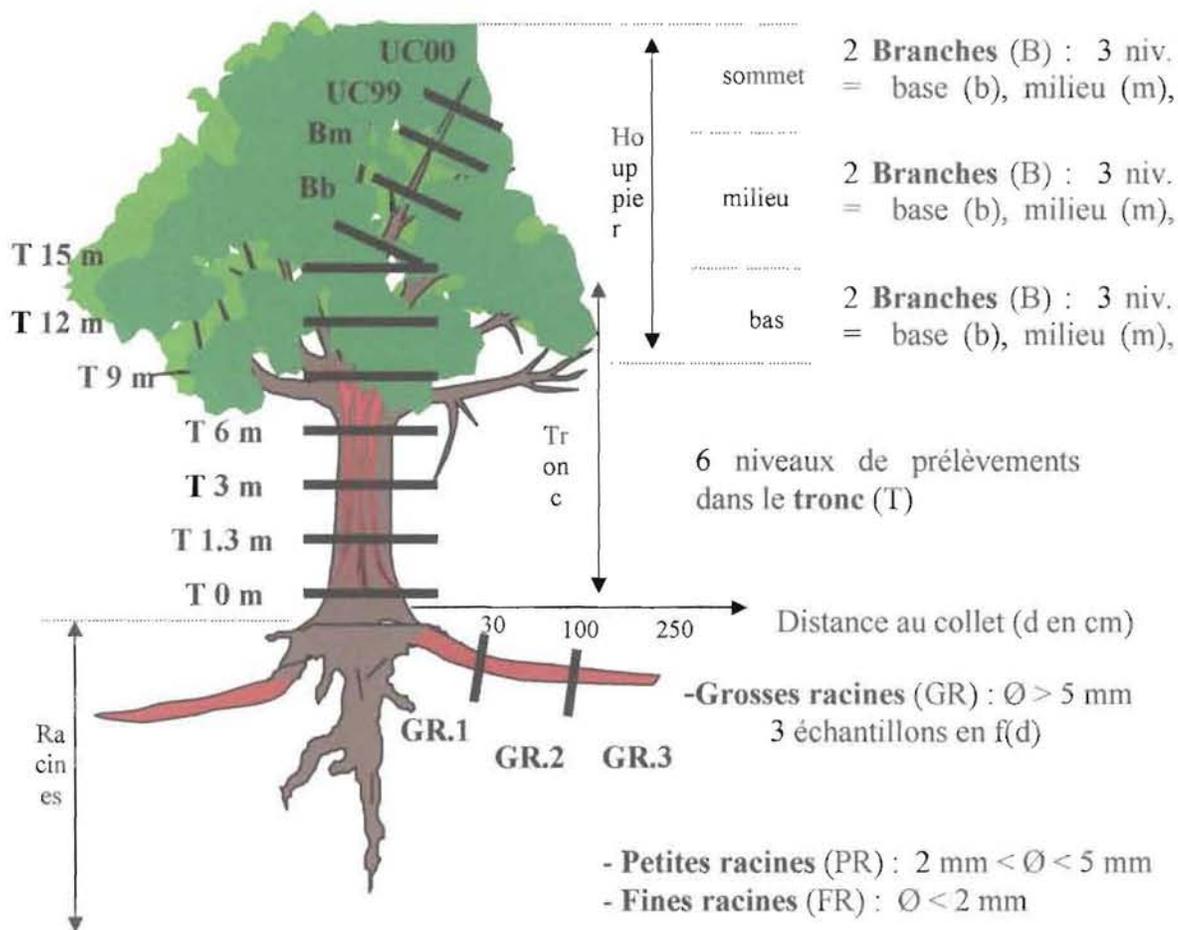


Schéma 1.1. Échantillonnage pour l'estimation des quantités totales de réserves dans l'arbre. Avec UC = unité de croissance. Barbaroux, 2002.

L'expérience a porté sur 6 arbres dominants de chaque espèce appareillés en couples (3 couples de hêtres et 3 couples de chênes) et étudiés par Barbaroux (2002) pour dosage des glucides totaux. Nous avons bénéficié des échantillons déjà préparés sous forme de poudre de bois. Cependant, nous reprenons ici le protocole de récolte et d'échantillonnage des arbres. Les arbres de chaque couple ont été choisis aussi semblables que possible, à proximité l'un de l'autre, de même circonférence avec un houppier équilibré et sans fourche, pour éviter les biais d'échantillonnage lors des deux campagnes de récolte. Leur circonférence à 1.30 m du tronc (C130) est d'environ 500 mm. Leur hauteur est de l'ordre de 15 m pour les hêtres et de 17 m pour les chênes. Les trois premiers chênes (C1 à C3) ont été abattus du 10 au 13 octobre 1999 et les hêtres (H1 à H3) du 02 au 04 novembre 1999. L'expérience a été renouvelée en 2000 du 29 mai au 7 juin, sur les individus restant de chaque couple (C4 à C6 pour les chênes, H4 à H6 pour les hêtres).

Après l'abattage des arbres, l'échantillonnage a été réalisé à différents niveaux dans les trois compartiments (tronc, branches et racines), comme indiqué dans le schéma 1.1. Dans le tronc, les 6 niveaux de hauteurs ont été répartis entre la base et l'extrémité de la façon suivante : 0 m, 1 m, 1.3 m, 3 m, 6 m, 9 m, 12 m, 15 m. Pour le chêne le niveau 3 m n'a pas été prélevé et pour le hêtre le niveau 15 m n'a pas été échantillonné (les arbres étant plus petits). La circonférence pour chacun des 6 niveaux de hauteur retenus a été mesurée (le 4^{ème} ou le 5^{ème} niveau devant correspondre à la base du houppier).

Deux racines principales d'orientations différentes ont été déterrées. Les prélèvements sont effectués dans 3 classes de diamètres : les fines racines inférieures à 2 mm de diamètre, les petites racines de 2 à 5 mm, et les grosses racines de diamètre supérieur à 5 mm. Les échantillons se présentaient sous la forme de 3 sections épaisses de 5 à 10 cm répartis le long de la grosse racine (distance au collet de 15-30 cm noté GR1, 70-100 cm noté GR2, 150-250 cm noté GR3) et de plusieurs racines choisies dans les classes des petites et des fines racines. Sur chaque racine étudiée, le diamètre et la distance au tronc ont été mesurés à chaque niveau de prélèvement.

Le houppier a été divisé en 3 parties horizontales, dans chacune d'elles deux branches insérées dans des orientations différentes ont été sélectionnées. Les branches ont été numérotées (la branche notée 1 étant à la base du houppier et celle notée 6 au sommet), leurs circonférences mesurées à la base d'insertion (par des mesures du plus grand diamètre et du diamètre pris perpendiculairement) ainsi que leurs longueurs. Ces branches ont ensuite été échantillonnées selon 4 niveaux : la base, le milieu et l'extrémité de la branche, en faisant la

distinction entre les 2 dernières unités de croissance (UC 1999 et 2000 pour le prélèvement de juin 2000 et UC 1998 et 1999 pour le prélèvement d'octobre 1999).

Tous les échantillons récoltés avaient été pesés à l'état frais, lyophilisés et pesés une fois sec. Le bois du cœur a été ôté dans le cas du tronc des chênes ; pour les hêtres, aucune distinction entre bois de cœur et aubier ne peut être vue sur les rondelles du tronc. Les quantités des bourgeons présents sur les dernières unités de croissance étant très hétérogènes, on les a enlevés pour ne pas biaiser les résultats des teneurs en protéines entre les différentes unités de croissance.

Après lyophilisation, les gros échantillons ont été prédécoupés à la scie à ruban puis tous les échantillons ont subi un double broyage (le premier donnant de la sciure et le deuxième au Cyclotec 1093 Sample Mill, Tecator, Höganäs, Sweden, donnant de la poudre). Cette préparation des échantillons avait été réalisée par Barbaroux. Nous avons réalisé le dosage des protéines solubles sur une aliquote de poudre de chacun des échantillons récoltés.

Les concentrations obtenues sur les échantillons ont été extrapolées à la biomasse de chaque organe considéré (tronc, petites et grosses racines, branches) en considérant les quantités obtenues par Barbaroux (2002).

Echantillonnage pour le suivi saisonnier des protéines solubles dans les branches de chêne sessile et de hêtre en rapport avec la phénologie

En 1998, trois arbres de chaque espèce appartenant aux deux sites expérimentaux adultes, ont fait l'objet d'un suivi saisonnier de leur contenu en protéines sur les branches et les cernes. Les échantillons ont été prélevés entre 11h le matin et 15h l'après-midi, sur les deux sites, pour tenir compte de possibles variations de teneurs en réserves dues aux fluctuations journalières. Sur le terrain, les échantillons ont été directement mis dans une glacière remplie de carboglace à -80°C, en attendant d'être stockés au congélateur à -20°C. Ils sont ensuite séchés au lyophilisateur (Dura-Top®, Dura-Dry® FTS Systems®, NY, USA).

Seules les fines branches représentées par les deux dernières unités de croissance ont été récoltées sur des branches tirées au fusil tous les mois à partir d'avril 1998 jusqu'à février 1999. A chaque date d'échantillonnage, deux fines branches par arbre sont échantillonnées. Les feuilles sont enlevées et n'ont pas été dosées car elles représentent un organe de stockage temporaire de l'ordre de la journée (Trethewey et Smith 2000). De même, les bourgeons ont été retirés car leurs nombres et leurs tailles étaient variables d'une branche à l'autre. Après

lyophilisation, les échantillons sont broyés au moyen d'un broyeur à billes (Mixer Mill MM200, Retsch).

Pour les cernes, l'échantillonnage a été réalisé par sondage à la tarière de Pressler dans le tronc à 1.30 m. L'échantillon de bois obtenu par cette méthode est communément appelé carotte et mesure environ 5 mm de diamètre et 10 cm de long au maximum. Chaque mois une carotte a été prélevée en se déplaçant autour du tronc à 1.30 m. Après extraction de la carotte tous les trous sont rebouchés sur toute leur longueur par un tourillon de hêtre traité au fongicide (mercurothilate de sodium). La plaie est ensuite protégée par une couche de mastic horticole. Après lyophilisation, chaque cerne est découpé au cutter pour être ensuite pesé puis broyé séparément au moyen d'un broyeur à billes (Mixer Mill MM200, Retsch). Avant le broyage, l'écorce (y compris le phloème) est enlevée de tous les échantillons sans être dosée. Le dosage des protéines totales solubles a été réalisé cerne par cerne sur les deux cernes les plus récents, élaborés en 1997 et 1998. En effet, les travaux de Barbaroux et Bréda (2002) avaient montré que les cernes les plus récents, donc les plus proches de l'écorce, présentaient la dynamique saisonnière d'amplitude la plus grande chez les deux espèces

Extraction et dosage des protéines solubles totales.

Le matériel végétal à analyser se présente sous la forme d'une poudre issue de matériel lyophilisé finement broyé, préalablement séché pendant 24 heures à 50°C. Un tampon phosphate ajusté a pH 7,38 a été préparé à partir de NaHPO₄ 0,1 M et KH₂PO₄ 0,1 M. Ce tampon contient les protecteurs suivants : PEG (0,3%, m/v), PVP (1,3% m/v) et DTT 5 mM ajouté en dernier moment, 10 mg de matière sèche sont mis en contact avec 2 mL de tampon phosphate. Après homogénéisation, les protéines sont extraites à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch MM 301, Gmbh & Co, Allemagne) pendant 45 secondes deux fois. Le broyeur à billes secoue à fréquence élevée les tubes, ce qui rompt les parois des cellules, libère les protéines solubles et homogénéise le mélange. Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant constitue l'extrait brut de protéines solubles totales. Une répétition d'extraction a été réalisée pour chaque échantillon.

Les protéines solubles ont été dosées selon la technique de Bradford (1976) ; cette méthode repose sur le fait que le pic maximal d'absorption du bleu de Coomassie se déplace de 465 à 595nm lorsqu'il se lie aux résidus basiques des protéines en milieu acide. A 80 µL d'extrait protéique sont ajoutés 720 µL d'eau distillée et 200 µL de réactif BIO RAD Protein Assay. Après incubation à température ambiante pendant 5 minutes, la teneur en protéines solubles

est déterminée en référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (gamme de 0 à 20 µg de SAB pour 800 µL dans du tampon phosphate) à partir d'une solution mère de 2 mg/mL. Une répétition du dosage est réalisée pour chaque extrait.

En tenant compte du fait que les protéines contiennent environ 22.6% of N (Yeoh et Wee, 1994) et des teneurs en azote total déterminées par Barbaroux *et al.* (2003) dans les différents organes, la contribution de l'azote protéique (N-Protein) à l'azote total a été calculée. La quantité totale de carbone protéique (C-protein) pour chaque arbre a aussi été calculée en prenant en compte la biomasse de chacun des compartiments de l'arbre et en tenant compte du fait que, pour les protéines, 3.15 g de carbone sont associés à chaque gramme d'azote (Gebbing *et al.* 1998).

Analyses statistiques

Les données ont été analysées par une ou deux voies avec l'analyse de la variance (ANOVA) (StatView ® 5, SAS Institute Inc.). De façon générale, les dates, les organes ou les différences d'espèces étaient considérés comme significatifs si $P < 0.05$.

Intra-tree distribution and seasonal dynamics of total soluble proteins in adult sessile oak (*Quercus petraea* L.) and common beech (*Fagus sylvatica* L.)

L. Valenzuela Nunez¹, D. Gérard¹, P. Maillard³ and N. J. J. Bréda^{2*}

IFR 111, UMR 1137 INRA UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, INRA,

¹ Equipe Ecophysiologie Cellulaire, F-54 500 Vandoeuvre les Nancy, France

² Equipe Phytoécologie, F-54 280 Champenoux, France

³ Equipe Bioclimatologie, F-54 280 Champenoux, France

*Author for correspondence:

N. J. J. Bréda

Tel: +33 3 83394048

Fax: + 33 3 83394022

breda@nancy.inra.fr

3 943 words, 2 tables, 3 figures

Abstract

- The exhaustive distribution of total soluble proteins was investigated in 40-year-old oak and beech trees, felled at two dates (October 1999 and June 2000), to estimate seasonal variations in protein content at the tree level.
- The concentration of total soluble proteins was on average twice as high in oak compared to beech ($0.75 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ Dry Mass vs. $0.42 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ Dry Mass, respectively) and 10 times lower than total non structural carbohydrates.
- Scaling from samples to total tree biomass, the contribution of C stored as total soluble proteins accounted in average for 500 gC in oak trees and only 250 gC in beech trees. Stem was the main storage tree compartment in both species.
- Soluble proteins were the main part of nitrogen in stem and roots of oak while in oak branches and in all beech organs other N compounds would be predominant.
- Soluble protein concentrations varied before any phenological event (bud break, stem growth) in oak and beech. The seasonal progression of total soluble proteins in twigs of both species showed opposite patterns, especially during spring, probably due to internal redistribution of proteins from upper stem and big branches. The dates of minimum and maximum concentrations were different for total soluble proteins and Total Non structural Carbohydrates.

Key words: *Fagus sylvatica* (beech), *Quercus petraea* (sessile oak), total soluble proteins, tree scaling, interspecific comparison.

Introduction

The storage of reserve is one of the major functions of trees with nutrient acquisition, transport, growth, defence and reproduction (Chapin *et al.*, 1990). The fundamental aspect of this function is the temporal uncoupling between acquisition and use of resources, especially for deciduous tree species (Vizoso, 2004). Trees perennity depends on a well ordered periodic accumulation of photosynthates and related compounds built up during favourable periods and mostly stored during winter before being mobilized again for growth and reproduction when the demand arises (Kramer and Kozlowski, 1979, Stepien *et al.*, 1994, Sauter and Witt, 1997, Terziev *et al.*, 1997). These compounds are stored as carbohydrates, fat and nitrogen compounds in the parenchymatous cells of living wood and bark (Kramer and Kozlowski, 1979, Magel *et al.*, 1997).

Carbohydrate storage takes place during growth season just after budburst and leaf expansion, and increases strongly in summer when growth ceased to reach a maximal level in autumn (Kramer and Kozlowski 1979). During winter, nitrogenous and carbon reserves are mobilized in trees from perennial organs to fuel maintenance respiration (Ögren, 2000), however, the main mobilization occurs at bud burst to supply spring growth needs. Seasonal variations in reserves have been investigated in a variety of fruit trees (Tromp and Ovaas, 1971, Gomez and Faurobert, 2002) and in poplar (Millard and Proe, 1991, Stepien and Martin, 1992, Sauter and Neumann, 1994, Cooke and Weih, 2005). Seasonal dynamics of carbon or nitrogen reserves were also investigated in adult temperate forest trees (Hoch *et al.*, 2003), adult sessile oak and common beech (Barbaroux and Bréda, 2002, Barbaroux *et al.*, 2003), and in young trees: cork oak (Cerasoli *et al.*, 2004a, b), common beech and pedunculate oak (Vizoso, 2004).

Non-structural carbohydrates (mainly starch and sucrose) are the main carbon reserves and represent 35% of dry matter (Kramer and Kozlowski, 1979, Dickson, 1991). For adult trees of *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*, total non-structural carbohydrate (TNC) content was higher in twigs and coarse roots than in other perennial organs (Barbaroux *et al.*, 2003). Similar distribution of TNC among tree compartments (roots, stem, and branches) was observed for both species and both during spring and autumn. According to literature (Merino *et al.*, 1984, Edwards et Hanson, 1996, Santa Regina *et al.*, 1997, Dyckmans *et al.*, 2000, Damesin *et al.*, 2002), carbon needs during winter maintenance respiration and leaf or leaf

plus earlywood in oak construction (1,410gC for beech and 2,622gC for oak), and to compare these C needs with their measured amounts of TNC used by beech (880gC) and oak (2,400gC) between leaf fall and bud-bursting. Concerning, the deficit of carbon deduced for both species, Barbaroux *et al.* (2003) did not exclude the possibility that other reserve materials might also be involved to refill the carbon sinks.

Hoch *et al.* (2003) showed in 100-year-old trees of a mixed forest stand (Switzerland) that non-structural carbohydrates in stem sapwood varied very little throughout the season and that the small reductions observed were not significant. In the absence of particular shortage in non-structural carbohydrates in any of the 10 mature temperate forest tree species throughout the growing season, these authors also mentioned the possibility for these trees to store other C compounds.

For this reason, the importance of other known storage C compounds such as proteins, amino acids, glycerol forms or fatty acids needed to be evaluated. Hemicelluloses, which can make up more than 35% of dry matter in the secondary xylem of some hardwood species (Garrote *et al.*, 1999), was also considered as a carbon reserve pool (Brinson and Dey, 1985).

Some tree species (e.g. *Pinus* and *Acer pseudoplatanus* and *Tilia cordata* Mill.) are additionally able to accumulate considerable amounts of neutral lipids in their woody tissue, with concentrations even exceeding those in TNC (Höll, 1997, Hoch, *et al.*, 2003). Sinnott (1918) classified these species as 'fat-trees', to separate them from those, in which TNC serves as the main carbon storage form ('starch-trees').

The last category of C compounds which has to be considered concerns storage proteins and amino acids. It has long been known that in trees, especially in deciduous trees, nitrogen containing compounds are stored annually in the bark at leaf fall and are subsequently mobilized for re-growth in spring (Kramer and Kozłowski, 1979). Generally, nitrogen is stored as both amino acids and proteins in perennial organs (Dickson, 1989). Amino acids may constitute forms of nitrogen immobilization especially those containing high N e.g. arginine, asparagine and proline (Dickson, 1989, Nabais *et al.*, 2005). Among soluble proteins, several can play a role in seasonal nitrogen cycling (Terziev *et al.*, 1997). These soluble proteins, specialized in storage of nitrogen in autumn and remobilised in spring, are named Vegetative Storage Proteins (VSP). In trees, VSP were first defined as a major component of the over wintering reserves in apple tree (Tromp and Ovaas, 1971); since then, the existence of VSP has been reported in several broadleaved woody species: *Populus* (Stepien, 1992, Sauter and Neuman, 1994, Black *et al.* 2001, Cooke and Weih, 2005), *Hevea*

brasiliensis (Tian *et al.*, 1998), *Swietenia macrophylla* (Tian *et al.*, 2003), *Prunus persica* (Gomez and Faurobert, 2002).

As nitrogen content represents less than 1 % of dry matter of a tree (Sauter *et al.*, 1989), nitrogenous reserves are generally considered to be of less importance in comparison with carbohydrate reserves. However, in our opinion, the C contained in nitrogenous reserves would be of importance in the carbon budget of the tree. We hypothesised that C in soluble proteins would contribute, with TNC, to the carbon pool needed for winter maintenance respiration and leaf construction. For this reason, the objectives of the present work were: (1) to characterize, by using the samples of Barbaroux *et al* (2003), the distribution of total soluble protein within adult oak and beech trees at the period of maximum and minimum TNC content, (2) to quantify soluble protein amounts at the tree level, (3) to compare soluble protein status between the two species and (4) to estimate their contribution to the carbon balance of the two species.

Materials and Methods

Sites and stands description

Beech and oak stands were pure stands located in two state-owned forests managed for natural regeneration, situated 60 kilometers away from each other. The beech stand was located in the forest of Hesse in Moselle, France (48°40'27'' N, 7°03'53'' E, altitude 305 m) while the oak stand was in the Champenoux forest, located in 15 km east of Nancy, France (48°44' N, 6°14' E, altitude 237 m). In 1999, common beech (*Fagus sylvatica* L.) stand was 35-year-old, while the oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) stand was of 45-year-old on average. Beech stand density was 3800 stems ha⁻¹, a basal area of 19.6 m² ha⁻¹. Height and circumference in 1.30 m from the soil were 12.7 m and 22.7 cm average, respectively. The oak stand density was 2531 stems ha⁻¹ with a basal area of 23.67 m² ha⁻¹. Oak dominant height was 17 m and averaged circumference in 1.30 m from the soil was 36.4 cm. Soil in both sites was luvisol (brown soil leached with pseudogley) with mull humus and high mineral fertility (see Bréda *et al.*, 1995 and Granier *et al.*, 2000 for more details). Climate is oceanic type with continental influence. Averages of rainfall were 820 mm and 744 mm in Hesse and Champenoux respectively, and annual temperatures of 9.2 °C for both sites.

Plant material

Study one: The aim of this study was to quantify total amount of soluble protein in adult trees of oaks and beeches. The six dominant trees per species were the ones previously harvested for carbohydrate estimations (see Barbaroux *et al.*, 2003 for individual tree parameters). Three trees were harvested in autumn during leaf fall (October 10 to 13, 1999 for oak and November 2 to 4, 1999 for beech) and the three remaining trees were felled the following spring after leaves were fully expanded (June 1 - 7, 2000). These dates correspond to maximum and minimum total carbohydrate reserve concentrations as determined in a previous non-destructive study in the same stands by Barbaroux and Bréda (2002). Tree samples were taken from various organs (stem, branches and twigs, coarse and fine roots) and at several positions in each organ. Disk-like samples (1 to 2 cm in longitudinal thickness) were taken from stem heights of 0, 1.3, 3, 6, 9, 12 and 15 m (for oak only). Additional samples were taken from six lateral branches at different heights in the crown. Three segments from each branch were analysed: near the insertion to the stem, at the extremity of the branches (twigs from the two last growing seasons, called later on twigs from the current year n of the previous year $n-1$) and midway between these two points. Furthermore, samples were collected from two lateral roots from each of the three diameter classes: fine roots ($\varnothing < 2$ mm), medium roots ($\varnothing = 2$ to 5 mm, for beech only) and coarse roots ($\varnothing > 5$ mm). Note that the medium root category is not sampled for oak as they were gathered with coarse roots for allometric relationship to compute below ground biomass.

For coarse roots, sample discs (5 to 10 cm in longitudinal thickness) were spread over three distances from the stump: 15 to 30 cm, 70 to 100 cm and 150 to 250 cm. To scale from wood sample to total tree, the biomass of each tree compartment was measured as described by Barbaroux *et al.* (2003). As the total amount of C stored in proteins highly depends on the total tree biomass, with bigger trees having the bigger total C reserve pools. For the interspecific comparison, the absolute amounts will be presented for the same tree biomass (e.g. gC from proteins per kg of trees biomass).

Study two: The aim of this monitoring was to compare seasonal dynamics of total soluble proteins and TNC reserves. Bud development was visually assessed every second day from the soil using binocular during spring 1998. A six stages scale (dormant winter buds, note = 0,

swollen buds, note = 3, broken buds, note = 4, just-unfolded leaves, note = 6, unfolded leaves, note=9, developed leaves with elongation of twigs, note = 10) was used to note the proportion of branches in each class for each tree. Observations were carried out on the upper part of the crown. Bud-burst index ranged from 0 to 10 and was computed as the average note of the 15 dominant trees (Bréda and Granier, 1996). Bud break was achieved when the average index for the stand ranked the note 8. Afterwards leaf expansion started. Leaf fall was dated from litter fall collection during autumn. Leaf fall was achieved when 90% of total stand leaf area index was collected, the remaining leaves staying on the tree up to the next spring. Seasonal monitoring of total soluble proteins was studied in fine branches represented by the two last annual twigs which were harvested on upper branches drawn by gun, each month, from April 1998 to February 1999. For each of the 9 sampling dates, two branch samples from upper crown were collected per tree. Three trees per species were sampled. Leaves and buds were removed from analysis because leaves represent an organ of temporary storage in the day (Trethewey and Smith, 2000). Sampling was carried-out between 11 h in the morning and 15 h in the afternoon on both sites as described in Barbaroux and Bréda (2002), to take into account possible variations of reserve contents caused by daily fluctuations.

For both sampling designs, tissue sections were weighed immediately after cutting (i.e. fresh weight), frozen and stored at -20°C , until freeze-drying. Dry weight was measured after freeze-drying for one week. For oaks, heartwood was removed from stem sections with a saw. Entire samples were cut in small pieces with a saw and grounded twice with a Cyclotec 1093 Sample Mill (Tecator, Höganäs, Sweden).

Extraction of total soluble proteins

Total soluble protein content ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$) was measured in each sample. Plant material powder (10 mg DM) was ground at 4°C with 2mL extraction buffer (Na_2HPO_4 , 0.1 M KH_2PO_4 , 5 mM DTT, 0.3% (m/v) PEG and 13 mg of PVP 20,000, pH 7.38 at 4°C) in an Eppendorf tube, using a ball crusher (Retsch MM 301, GmbH and Co, Germany) twice during 45 seconds. The mixture was centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C . The supernatant was collected. Total soluble proteins were quantified colorimetrically at 595 nm as described in the Bradford (1976) method, using the Coomassie Blue G 250 (Bio-Rad, 500-0006), with bovine serum albumin as standard.

Assuming that proteins contain about 22.6% of N (Yeoh and Wee, 1994) and according to the N content determined by Barbaroux *et al.* (2003) in the various organs, N-Protein contribution to total N was calculated. The total amount of C-protein for each tree was also calculated by taking into account the biomass of each tree compartment and using the assumption that, for protein and amino acids, 3.15 g of C were associated with each g of N (Gebbing *et al.*, 1998).

Statistical analyses

Data were analysed by one, two or three ways analysis of variance (ANOVA) (StatView® 5, SAS Institute Inc.). Unless otherwise mentioned, dates, organs or species differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results and discussion

Total soluble protein concentrations according to species, organs and dates

Differences in soluble protein concentrations among species/site (species and site are confounded) are significant whatever the considered organ (Table 1). Oak exhibited larger protein concentration than beech for all organs (Figure 1): soluble protein concentrations are twice in oak ($0.75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$) as compared to beech ($0.42 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$). Our values are comparable to results found by Sauter and van Cleve (1994): about $6 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ DM}$ in poplar wood, by Marmann *et al.* (1997): about $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$ in woody organs of *Fraxinus excelsior*, and by Gomez and Faurobert (2002): about $3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DM}$ in parenchyma of peach tree shoots. Such differences between oak and beech species were also reported for carbohydrate concentrations in all organs (Barbaroux and Bréda, 2002, Barbaroux *et al.*, 2003).

By contrast, Barbaroux *et al.* (2003) did not find differences between the two species for nitrogen content, except in branches where nitrogen content was twice in oak as compared to beech. Assuming that proteins contain about 22.6% of N (Yeoh and Wee, 1994) and according to the N content determined by Barbaroux *et al.* (2003) in the different organs, N-Protein contribution to total N was calculated. N-Protein represents the main part of total N (Table 2) especially for oak: in stem (91 and 69 % of total N in October 1999 and June 2000, respectively) and in roots (59% of total N). By contrast, in oak branches, N-Protein represents only 26-39 % of total N. In beech organs, the contribution of N-Protein to total N was also particularly low, about 29% in stem, 19% in roots and only 17% in branches, leading to the

hypothesis that other N-compounds contribute to total N in these organs. In a same way, in stem of oak, the lowest contribution of N-Protein into total N found in June compared with October, could result from an involvement of other N compounds during spring reactivation. According to the literature, N compounds differ with plant species, plant development stage and season of the year (Tromp and Ova, 1985). In perennial plants, nitrogen is stored both in protein and in soluble amino compounds. Ureides and amides with low carbon/nitrogen ratios are considered as efficient forms of storing and transporting nitrogen in respect to required carbon (Dickson, 1989). There is still controversy over whether amino compounds or proteins are more important. As in the case with oak stems in this study, Kang and Titus (1980) found about 90% of the nitrogen in protein and about 10% in amino compounds in bark tissues of apple. But the relative proportions of each compound vary with the season, the part of the tree and with fertilization (Dickson, 1989). More recently, Marmann *et al.* (1997) found that soluble protein N represents about 44% and 19% of total N concentration in the stem and fine roots, respectively, of three-year-old seedlings of *Fraxinus excelsior*.

The vertical distribution of soluble protein concentrations exhibits a similar pattern in oak and beech, with an increase in terminal parts of the tree, fine roots and annual twigs (Figure 1), whatever the date. The concentration is quite constant within the stem. Thus, younger parts of stem, twigs and fine roots exhibited higher total soluble protein concentrations than the older organs. When the distribution of proteins was investigated in stem, roots and branches of an 8-year-old poplar tree, the highest content was also found consistently in the youngest parts (Sauter *et al.*, 1989). Our result agrees with results obtained in the same samples for TNC distributions (Barbaroux *et al.*, 2003) and reflects the demand of both young shoots and roots for carbohydrates and soluble proteins necessary for growth (Lacointe *et al.*, 1993).

Surprisingly, only few differences are observed between October 1999 and June 2000 in samplings of both species (Figure 1 and Table 1) except that the youngest twigs are more concentrated in June than in October, probably reflecting the growth demand previously mentioned. As we found no change for soluble protein concentrations in perennial organs between the two dates, whereas TNC storage was found in the same samples to be maximal in October and minimal in June (Barbaroux *et al.*, 2003), we tested the hypothesis that the chosen sampling dates (October and June) for TNC did not correspond to the maximal and minimal dates of protein concentrations. This hypothesis was strengthened by the seasonal changes in protein content found in the literature (for poplar: Sauter and Witt, 1997, and

peach tree: Gomez and Faurobert, 2002). In these cases, there was no difference in protein content between June and October whereas February to March instead of October was the date for maximal protein concentrations. In our case, samples from oak and beech branches (where seasonal dynamics would be the highest) collected monthly along the year 1998 were used to determine more precisely seasonal variations of total soluble protein concentrations. Oak and beech exhibited an opposite pattern of total soluble protein concentration during spring (Figure 2). In beech branches, protein concentration increased gradually and significantly from April to June, while, in oak, it decreased continuously from maximal concentration in April until minimum concentration in August. Dates of minimum and maximum total soluble proteins concentrations were not similar to those for total non carbohydrate reserves (minimum in June and maximum in October). Total soluble proteins concentration changes, preceding that of TNC in spring, can be used as an early marker of spring reactivation (Gomez and Faurobert, 2002). These early qualitative changes could mainly result from redistribution inside the tree, with exchanges among tree compartments. They are, however, not sufficient to discriminate N used for spring growth resulting either from current uptake or remobilization from storage organs. The use of ^{15}N labeled fertilizer is necessary to investigate this distinction (Millard, 1996). However, such experiments have, for technical reason, been restricted to younger trees due to difficulties in ^{15}N labeling at the forest scale. In oak saplings, ^{15}N x ^{13}C labeling experiment at the end of the growing season clearly showed that about half of the ^{15}N stored is used for the growth of the new organs during the following spring whereas only 20% of ^{13}C stored is necessary (Vizoso, 2004).

Up to now, no particular Vegetative Storage Protein (VSP) was identified in both oak (*Quercus petraea*) and beech (*Fagus sylvatica*), while several proteins were observed for other tree species as nitrogen storage form (Wetzel and Greenwood, 1991). However, the contribution of VSP to the remobilization of stored N remains unclear (Gomez and Faurobert, 2002). Studies have shown considerable variability between species and dormant tissues. Indeed, the percentage of VSP among total protein varies between 15% in Douglas fir (Roberts *et al.*, 1991), 25% in poplar (Langheinrich and Tischner, 1991) and up to 70% in poplar wood (Sauter *et al.*, 1988). This study analysed the total soluble proteins only, which are not all vegetative storage proteins (VSP). The study we reported here could not give specific results about VSP as the sampling method (date selections, sample conservation, bark separation ...) did not allow a correct VSP characterisation. Such a study is in progress with other oak trees (Gérant *et al.*, in preparation).

Total soluble protein and C-Protein quantifications at tree level

Oak and beech concentrations in soluble proteins among tree compartments are presented in Figure 3a. Once again, concentrations are higher in oak than in beech, whatever the organ. The highest concentration is found in the fine roots of oak trees (1.8-1.9 g. 100g⁻¹ DM) and with the exception of medium roots of beech, there is no difference between October and June. The most differences among tree compartment were found in oak. Total soluble protein concentrations are 10 times lower than total non structural carbohydrates (10-16 g.100 g⁻¹ DM, Barbaroux *et al.*, 2003) confirming a higher contribution of non structural carbohydrate than that of soluble proteins to dry matter constitution.

The aim of the present work was to complete the carbon budget at tree level including other than carbohydrate reserve C storage pool. The total amount of C-proteins for each tree was calculated by taking into account the biomass of each tree compartment and using the assumption that, for protein and amino acids, 3.15 g of C was associated with each g of N (Gebbing *et al.*, 1998). In both species, C-Protein quantities appeared to be determined by organ biomass, the stem being the biggest storage compartment of C-proteins. About 500 g of C-Proteins were measured in oak whatever the date while only 250 g of C-Protein in beech (Figure 3b). Differences in biomass between the two species can only partly explain the differences in C-Protein quantities between oak and beech. Taking tree biomass into account, C-TNC corresponds to 15.3 gC per kg DM and C-proteins 0.48 gC per kg DM, while zero for beech (table 3). Looking for total tree carbon budget, the absolute amount of C stored as soluble proteins is not negligible as it represents 28% and 21% of TNC gC in beech and oak, respectively. The difference between October and June in C-Protein amounts which corresponds to the C-Protein reserves used between these two dates represents only 75g in oak and zero in beech (table 3) whereas non structural carbohydrate reserves were estimated to 2400gC and 880gC in oak and beech, respectively (Barbaroux *et al.*, 2003). Thus, in this study, the decrease in C-Proteins amount calculated between October and June in oak represent 2% of the deficit of carbon estimated by Barbaroux *et al.* (2003). As proposed before, dates of minimum and maximum total soluble proteins concentrations seem to be not similar to those for total non carbohydrate reserves (minimum in June and maximum in October) and this would explain the low values obtained. Sauter and Van Cleve (1990, 1994) already mentioned a seasonal pattern of proteins clearly different from starch in poplar. They reported a first, rapid and prominent decrease in spring, still parallels the mobilization of

starch during outgrowth of buds. Finally, the involvement for other C-reserve materials has to be investigated, especially for beech. Neither amino-acids nor amides have been included in our calculation here which may also contribute in a small extent to potential carbon source. For nitrogen needs in spring, amino-acids and amides are potential sources in competition with new nitrate uptake. Such a partitioning would be worse quantified using labeling experiment.

Conclusions

We investigated the distribution of total soluble proteins and TNC in oak and beech trees, and their role in the carbon budget. We conclude that the two species contained a similar intra-tree distribution of total soluble proteins. Furthermore, oak contained higher protein and carbohydrate concentrations than beech across all organs. In terms of an exhaustive assessment for all mobile fractions of a tree, the analysis of soluble N-compounds is very important because strongly coupled to carbon metabolism. Additionally, while ten times lower than the carbohydrate concentration, the protein concentration can contribute to the total tree carbon budget. One strength of our results lies in its novel assessment of soluble proteins as a component of the carbon budget. However, the significance of this compound class with respect to C-reserve storage may be arguable. Concentration in proteins are ten times lower than TNC, but the absolute amount of C stored as protein contributes significantly to total tree carbon budget. Anyway, soluble proteins are of key importance to nitrogen metabolism especially during spring flushing and budburst.

Acknowledgements

The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia from Mexico, Société Française d'Exportation des Ressources Educatives and Forest Department of INRA are gratefully acknowledged for their financial supports for the research conducted in France by L. Valenzuela Nunez. The authors also thank Hélène Revol from Henri Poincaré University - Nancy for her contribution to protein in branches analysis and Cécile Barbaroux who prepared large part of the wood samples we used in these studies.

References

- Barbaroux C, Bréda N, Dufrêne E. 2003.** Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* **157**: 605–615.
- Barbaroux C, Bréda N. 2002.** Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse porous beech trees. *Tree Physiology* **22**: 1201 – 1210.
- Black BL, Parmentier-Line CM, Fuchigami LH, Coleman GD. 2001.** Ecotypic and genetic variations in poplar bark storage protein gene expression and accumulation. *Tree Physiology* **21**: 1289–1297.
- Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**: 248-254.
- Bréda N, Granier A, Barataud F, Moyne C. 1995.** Soil water dynamics in an oak stand. Part I: Soil moisture, water potentials and water uptake by roots. *Plant and soil* **172**: 17-27.
- Bréda N, Granier A. 1996.** Intra- and interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak stand (*Quercus petraea*). *Annales des Sciences Forestières* **53**:521-536.
- Brinson K, Dey PM. 1985.** Polysaccharides containing xylose, arabinose and galactose in higher plants. In *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants* (eds. P.M. Dey and R.A. Dixon), pp. 349–371. Academic Press, London, UK.
- Cerasoli S, Maillard P, Scartazza A, Brugnoli E, Chaves MM, Pereira JS. 2004a.** Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-years-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. *Annals of Forest Science* **61**: 721-729.
- Cerasoli S, Scartazza A, Brugnoli E, Chaves MM, Pereira JS. 2004b.** Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. *Tree Physiology* **24**: 83–90.

Chapin FS, Schultze E-D, Mooney HA. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **21**: 423-447.

Cooke JEK, Weih M. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* **167**:19-30.

Damesin C, Ceschia E, Le Goff N, Ottorini JM, Dufrêne E. 2002. Stem and branch respiration of beech: from tree measurements to estimations at the stand level. *New Phytologist* **153**: 159-172.

Dickson RE. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. *Annales des Sciences Forestières* **46 suppl** 631s – 647s.

Dickson RE. 1991. Assimilate distribution and storage. *In* Physiology of trees. Eds. A. S. Raghavendra, J. Wiley and Sons, Inc. New York.

Dyckmans J, Flessa H, Polle A, Beese F. 2000. The effect of elevated [CO₂] on uptake and allocation of ¹³C and ¹⁵N in beech (*Fagus sylvatica* L;) during leafing. *Plant Biology* **2**: 113-120.

Edwards NT, Hanson PJ. 1996. Stem respiration in a closed-canopy upland oak forest. *Tree Physiology* **16**: 433-439.

Garrote G, Dominguez H, Parajo JC. 1999. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh-und Werkstoff* **57**: 191–202.

Gebbing T, Schnyder H, Kühbauch W. 1998. Carbon mobilization in shoot parts and roots of wheat during grain filling: assessment by ¹³C/¹²C steady-state labelling, growth analysis and balance sheets of reserves. *Plant, Cell and Environment* **21**: 301-313.

Gérant D., Valenzuela Nunez L, Maillard P, Bréda N. 2006 Protein / amino acid storage and remobilization in the sapwood of 10-years-old pedunculate oak (*Quercus robur* L.) (Submitted to *Journal of Experimental Botany*).

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* **379**: 2431-2439.

- Granier A, Biron P, Lemoine D. 2000.** Water balance, transpiration and canopy conductance in two beech stands. *Agricultural and Forest Meteorology* **100**: 291-308.
- Hoch G, Richter A, Korner C. 2003.** Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment* **26**:1067-1081.
- Höll W. 1997.** Storage and mobilization of carbohydrates and lipids. In: Rennenberg H, Eschrich W, Ziegler H, eds. *Trees – Contribution to modern tree physiology*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 197 – 211.
- Kang SM, Titus JS. 1980.** Qualitative and quantitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of apple. *Physiologia Plantarum* **50**: 285-290.
- Kramer PJ, Kozlowski TT. 1979.** *Physiology of woody plants*. Academic Press, London, 811 p.
- Lacointe A, Kajji A, Daudet FA, Archer P, Frossard JS. 1993.** Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. *Cambium, Production de Bois et Développement de L'arbre*. Colloque, Société Botanique de France, Paris, (FRA), 1992/04/02-03. *Acta Botanica Gallica* **140**: 435-441.
- Langheinrich U, Tischner R. 1991.** Vegetative storage proteins in poplar: Induction and characterization of a 32- and a 36-kilodalton polypeptide. *Plant Physiology* **97**: 1017-1025.
- Magel E, Hillinger C, Höll W, Ziegler H. 1997.** Biochemistry and physiology of heartwood formation: role of reserve substances. In: *Trees, Contributions to Modern Tree Physiology* edited by Heinz Rennenberg, Walter Eschrich, Hubert Ziegler. Backhuys Publishers. Leyden, The Netherlands. pp 477 – 506.
- Marmann P, Wendler R, Millard P., Heilmeier H. 1997.** Nitrogen storage and remobilization in ash (*Fraxinus excelsior*) under field and laboratory conditions. *Trees - Structure and Function* **11**: 298 – 305.
- Merino J, Field C, Mooney HA. 1984.** Construction and maintenance costs of Mediterranean-climate evergreen and deciduous leaves. *Acta Oecologica* **5**: 211-229.
- Millard P. 1996.** Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *J. Plant Nutrition and Soil Science* **159**: 1-10.

Millard P., Proe MF. 1991. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. *New Phytologist* **117**: 587 – 596.

Nabais C., Hagemeyer J., Freitas H. 2005. Nitrogen transport in the xylem sap of *Quercus ilex*: The role of ornithine. *Journal of Plant Physiology* **162**: 603 – 606.

Ögren E. 2000. Maintenance respiration correlates with sugar but not nitrogen concentration in dormant plants. *Physiol. Plant.* **108**: 295-299.

Poorter H. 1994. Construction costs and payback time of biomass: A whole plant perspective. *In: A Whole Plant Perspective of Carbon-Nitrogen Interactions.* SPB Academic Publishing, The Hague: 111-127

Roberts D. R., Toivonen P., McInnis S. M. 1991. Discrete proteins associated with overwintering of interior spruce and Douglas-fir seedlings. *Canadian Journal of Botany* **69**: 437-44.

Santa Regina I, Tarazona T, Calvo R. 1997. Aboveground biomass in a beech forest and a Scots pine plantation in the Sierra de la demanda area of northern Spain. *Annals of Forest Sciences* **54**: 261-269.

Sauter JJ, Neumann U. 1994. The accumulation of storage materials in ray cells of poplar wood (*Populus X canadensis* “robusta”): effect of ringing and defoliation. *Journal of Plant Physiology* **143**: 21–26.

Sauter JJ, Van Cleve B, Apel K. 1988. Protein bodies in ray cells of *Populus x canadensis* Moench ‘robusta’. *Planta* **173**: 31-34.

Sauter JJ, Van Cleve B. 1990. Biochemical, immunochemical and ultrastructural results on protein storage in poplar wood (*Populus x Canadensis* ‘robusta’). *Planta* **183**: 92-100.

Sauter JJ, Van Cleve B. 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* **8**: 297-304.

Sauter JJ, Van Cleve B. and Wellenkamp S. 1989. Ultrastructural and biochemical results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of other tree species. *Holzforschung* **43**: 1-6.

Sauter JJ, Witt W. 1997. Structure and function of rays: storage, mobilization, transport. In: *Trees, Contributions to Modern Tree Physiology* edited by Heinz Rennenberg, Walter Eschrich, Hubert Ziegler. Backhuys Publishers. Leyden, The Netherlands. pp 117–195.

Sinnott EW. 1918. Factors determining character and distribution of food reserves in woody plants. *Botanical Gazette* **66**, 162–175.

Stepien V, Martin F. 1992. Purification, characterization and localization of the bark storage proteins of poplar. *Plant Physiol. Biochem.* **30**: 399–407.

Stepien V, Sauter JJ, Martin F. 1994. Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiol. Biochem.* **32** 185 – 192.

Stepien V. 1992. Contribution à l'étude des protéines de réserve végétatives du peuplier (*Populus x euramericana*). Thèse de l'Université de Nancy 1. 147 pp.

Terziev N, Boutelje J, Larson K. 1997. Seasonal fluctuations of low-molecular-weight sugars, starch and nitrogen in sapwood of *Pinus sylvestris* L. *Scand J. For. Res.* **12**:216-224.

Tian WM, Han YQ, Wu JL, Hao BZ. 1998. Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in *Hevea brasiliensis*. *Trees* **12**: 153–159.

Tian WM, Wu JL, Hao BZ, Hu ZH. 2003. Vegetative storage proteins in the tropical tree *Swietenia macrophylla*: seasonal fluctuation in relation to a fundamental role in the regulation of tree growth. *Canadian Botanical Journal* **81**: 492 – 500.

Trethewey RN, Smith AM. 2000. Starch metabolism in leaves. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Advances in photosynthesis*. Vol. 9. Leegood R.C.; Sharkey, T.D.; von Caemmerer, S. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 205–231.

Tromp J, Ovaa JC. 1971. Phloem translocation of storage nitrogen in apple. *Physiologia Plantarum* **25**: 407 – 413.

Tromp J, Ovaa JC. 1985. Response of young apple trees to time of nitrogen fertilization with respect to the nitrogen, potassium, and calcium levels in xylem sap, new growth and the tree as a whole. *J. Plant Physiol.* **119**: 301-309.

Vizoso S. 2004. Effets combinés de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et du niveau de fertilisation azotée sur la gestion du carbone et de l'azote chez le chêne pédonculé (*Quercus robur*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*). Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy 1. 122p.

Wetzel S, Greenwood JS. 1991. The 32-kilodalton vegetative storage protein of *Salix microstachya* Turz. *Plant Physiology* **97**: 771-777.

Yeoh HH, Wee Y C. 1994. Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plant species. *Food Chemistry* **49**: 245-250.

Tables

Table 1. Three-way analysis of variance of the distribution of total soluble proteins concentration in branches, roots and stem of oak (*Quercus petraea*) and beech (*Fagus sylvatica*)

Variables	df	F value	P value
(Species-Site)	1	89.5	0.0001
Date	1	1.5	0.2198
(Species-Site) x Date	1	0.1	0.7418
Organs	12	29.1	0.0001
(Species-Site) x Organs	12	10.2	0.0001
Date x Organs	12	7.1	0.0001
(Species-site) x Dates x Organs	12	0.7	0.759
Total number of samples	469		

The effects of species (oak *vs.* beech, also confounded with site effect), date (October *vs.* June) and organs (coarse and fine roots, base and middle of branches, twigs from current and past years, stem section at 0, 1.3, 5, 6, 9, 12 m height) are shown. Sample numbers per organ were 295 branches, 137 for roots and 89 for stem.

Table 2. Contribution of N soluble proteins to the total nitrogen in branches, roots and stem of beech (*Fagus sylvatica*) and oak (*Quercus petraea*).

	Beech		Oak	
	October	June	October	June
<i>N soluble protein concentration % total N (g N-Protein / 100 g N)</i>				
Branches	15.85	19.55	26.26	39.15
Stem	30.95	27.45	91.36	68.87
Roots	20.71	18.08	60.73	58.37

Total soluble proteins concentrations were expressed in % of total nitrogen according to organ nitrogen content (Barbaroux *et al.*, 2003) and assuming that proteins contain about 23% nitrogen (Yeoh and Wee, 1994).

Table 3. Carbon costs during winter and spring (between October and June) according to Barbaroux *et al.*, 2003 and potential contribution of C-proteins to carbon balance.

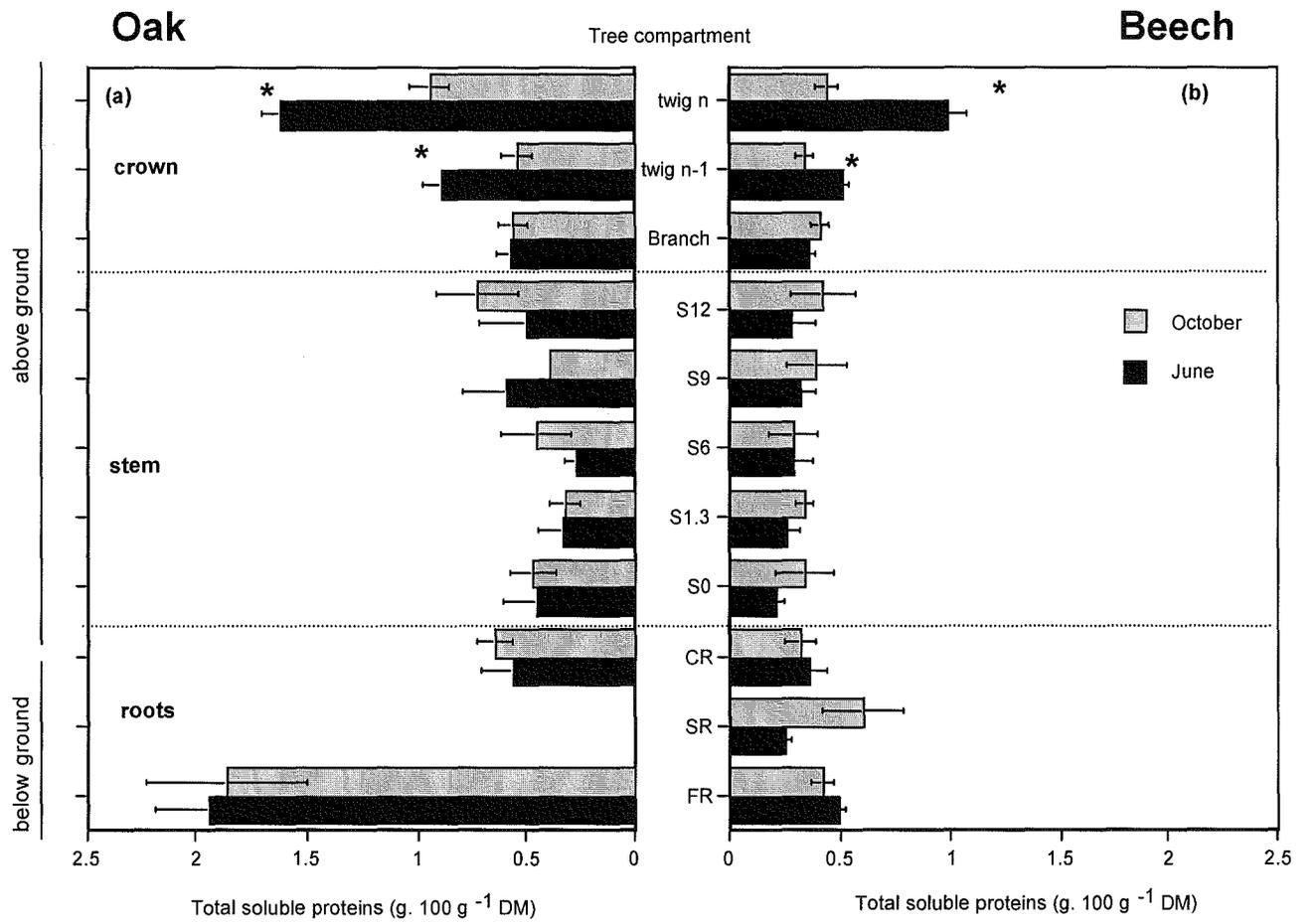
	Beech	Oak	Source
Tree biomass (kg)	125.5	156.5	
Carbon reserve needs (gC)	1410	2622	
(gC /kg dry mass)	11.2	16.8	Barbaroux <i>et al.</i> , 2003
Carbon from TNC used (gC)	880	2400	
(gC/kg dry mass)	7.0	15.3	
Proportion of C-TNC used to October C-TNC	50%	40%	
Carbon from total soluble proteins			
(gC-proteins)	250	500	
(gC/kg dry mass)	2	3.19	
Proportion of C-proteins to C from TNC (%)	28%	21%	Present study
Carbon from total soluble proteins used (gC)	0	75	
(gC/kg dry mass)	0	0.48	
Proportion of C-proteins used to October C-proteins	0%	14%	
Difference (C needs – C used)	38%	6%	

Figure captions

Figure 1 Distribution of total soluble protein concentrations among the different organs of oak (a) and beech (b) trees in October 1999 (grey) and in June (dark). Bars indicate SE on total soluble protein concentrations (n= 3 trees per species). FR, fine roots; SR, small roots (only for beech); CR, coarse roots (averaged among trees and root position, 15-30 cm, 70-100 cm and 150-250 cm length from the stump; S, stem (from 0 m (S0) to 12 m (S12) height); Branch; twigs of current (n) or previous year (n-1). Stars indicate the significant differences between dates.

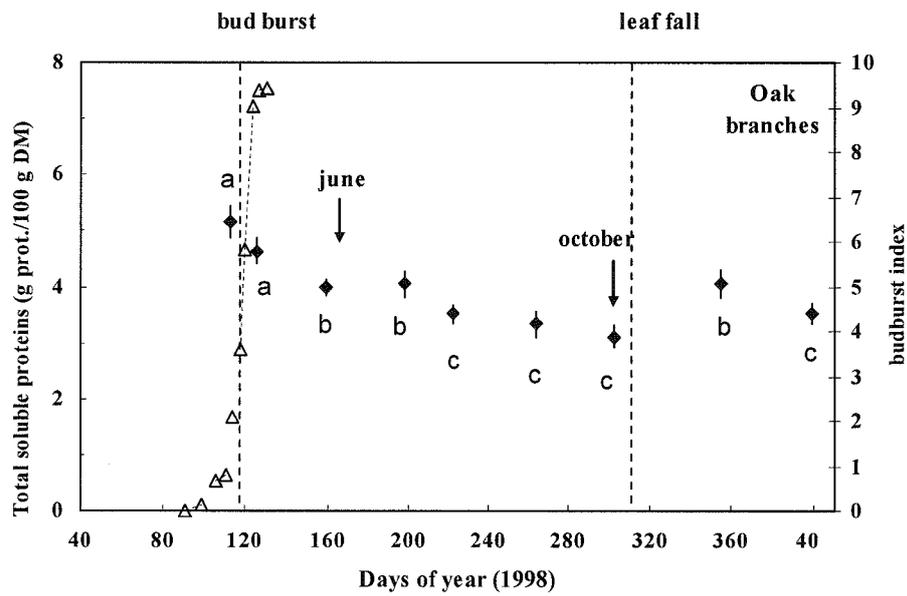
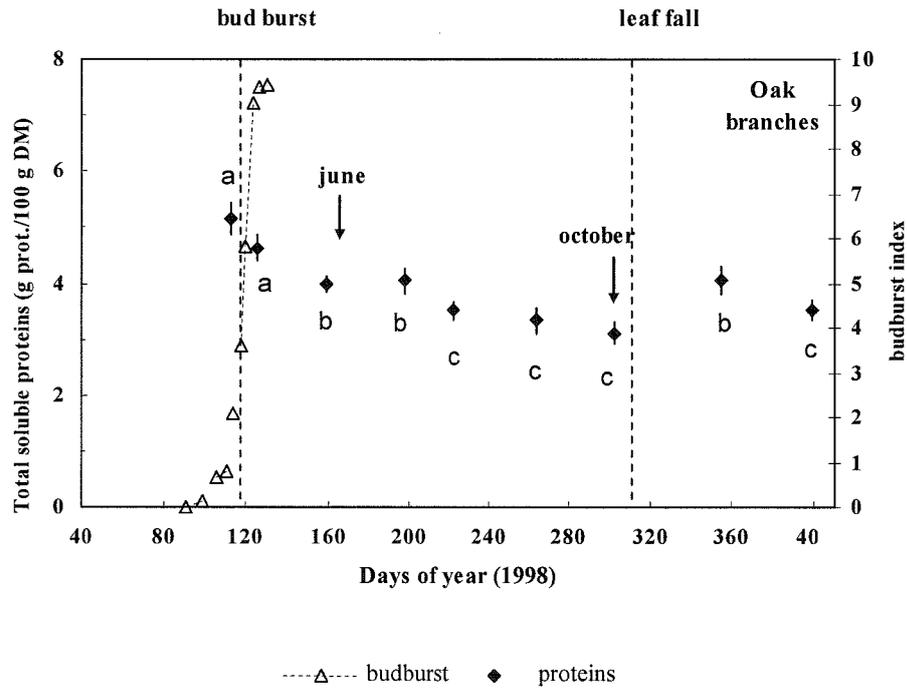
Figure 2 Seasonal progressions of total soluble proteins (black diamonds) expressed in g of proteins per 100 g dry matter in the branches of three oaks and three beeches during the 1998' growing season. Similar letters indicate non significant difference among dates (Anova, $p > 0.05$). Budburst (open triangles) is visually assessed on 30 trees from each species and calculated according to a six stages scale (see material and methods for more details).

Figure 3 Organ reserve distribution for oak and beech trees in October 1999 and June 2000. Results are expressed in mean concentrations (a) and in amounts of C-proteins (b). Vertical bars indicate standard error at tree level (n=3). Note that the medium root category is not sampled for oak as they were gathered with coarse roots for allometric relationship to compute below ground biomass.



Valenzuela et al., Figure 1

Valenzuela et al., Figure 2



Valenzuela et al., Figure 3

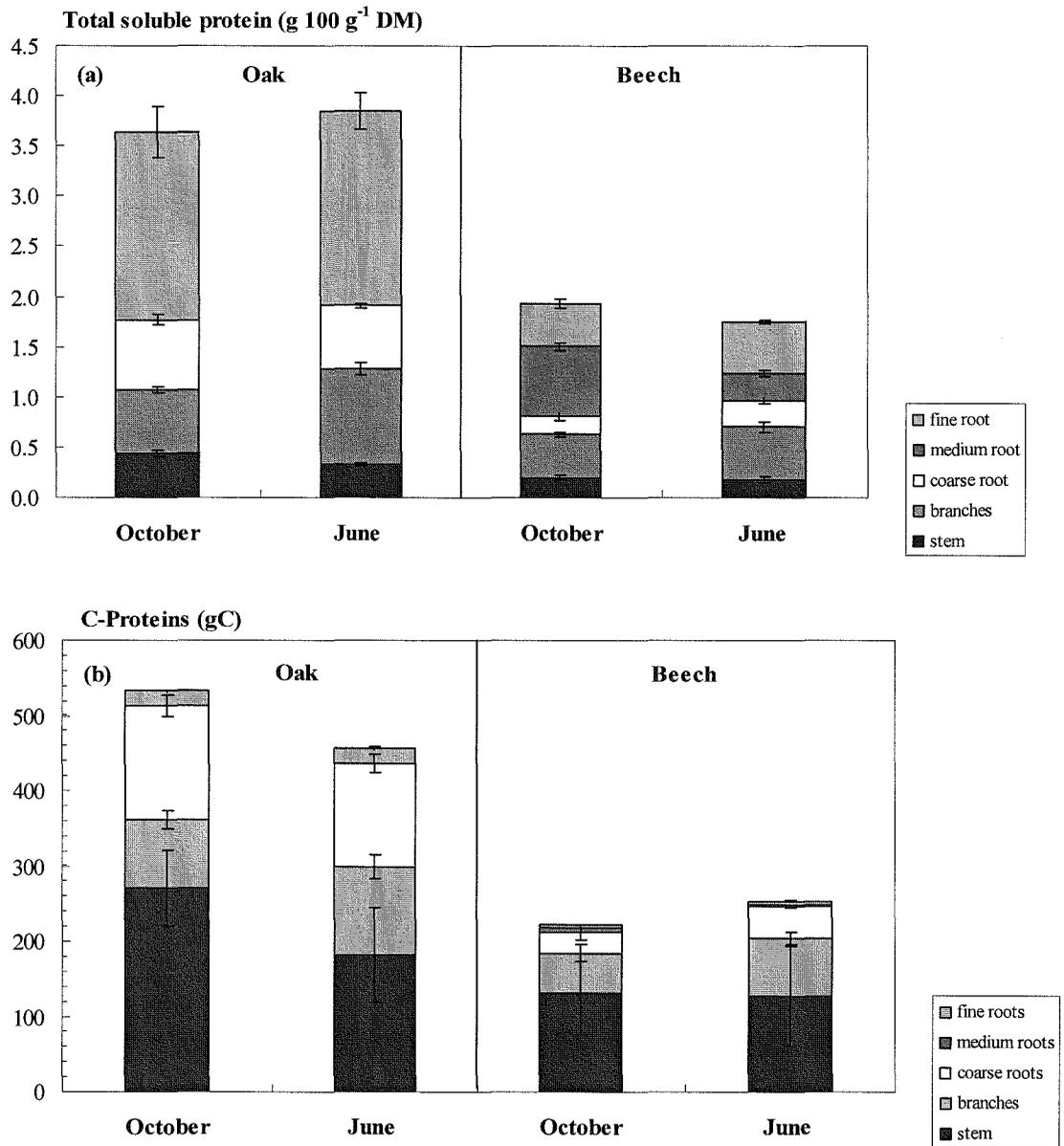
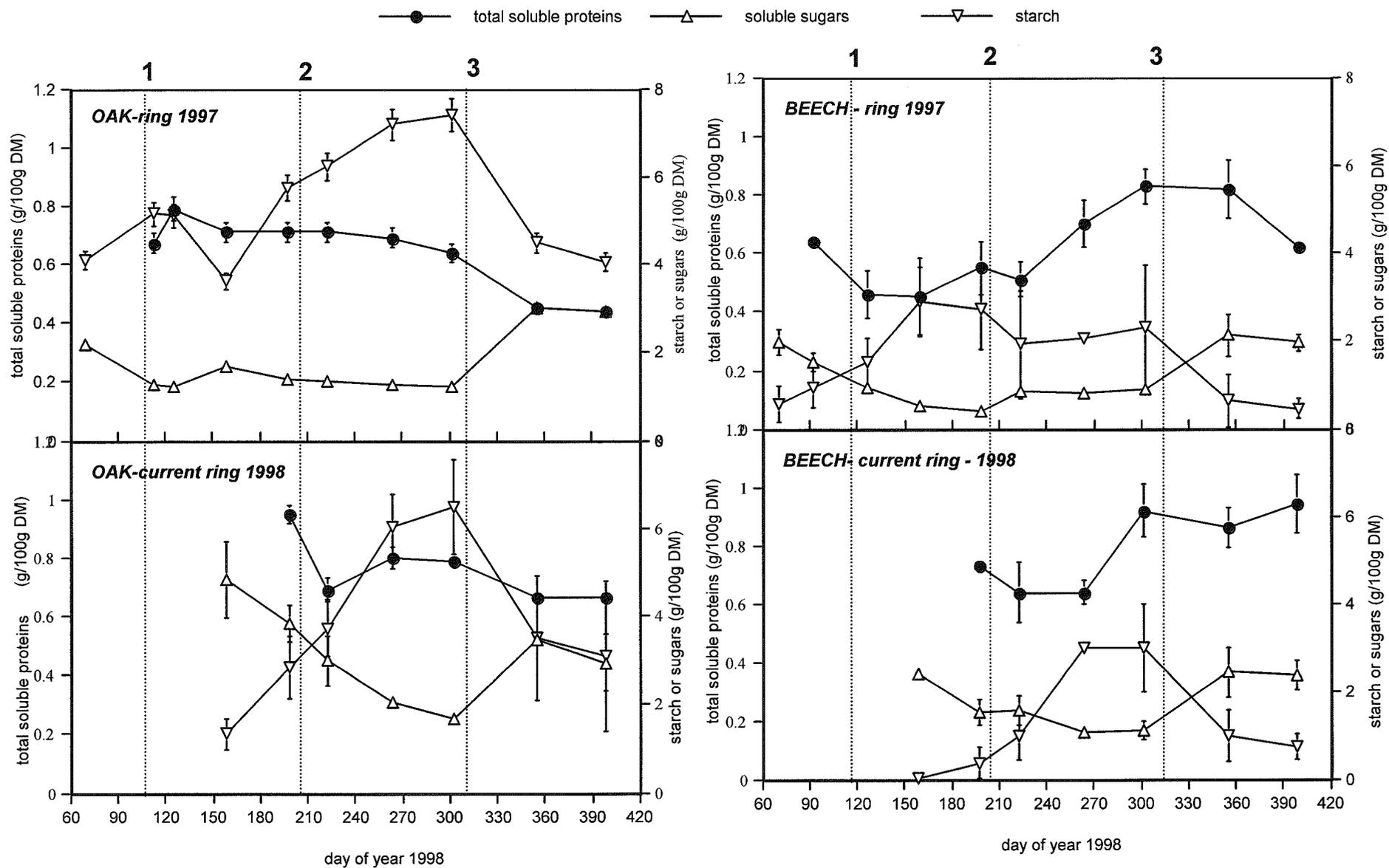


Figure 1.4. Evolution au cours de la saison 1998 des concentrations moyennes (3 arbres par espèces et par date) en amidon et sucres solubles et en protéines solubles totales dans les deux cerne les plus jeunes dans le tronc à 1.30 m. Les barres verticales sont les écart-types. Les traits pointillés verticaux correspondent aux dates phénologiques clés : 1 = débourrement, 2 = arrêt de la croissance radiale du tronc à 1.30 m, 3 = chute des feuilles.



Evolution saisonnière conjointe des réserves glucidiques et des protéines solubles totale dans les cernes des troncs

Cette analyse sur les deux cernes les plus jeunes (cerne élaboré en 1997 et cerne en formation) dans le tronc permet de localiser plus finement la mobilisation et le stockage des réserves au cours de la saison 1998.

La figure 1.4 présente les dynamiques saisonnières en 1998 des concentrations moyennes en protéines solubles totales, sucres solubles et amidon dans les cernes les plus jeunes (1997 et 1998) de hêtres et de chênes. Chaque point représente la moyenne de trois arbres différents par espèce. Le cerne 1998 correspond au cerne en formation, c'est pour cette raison qu'il n'apparaît dans les dosages qu'à partir de juin, lorsque la biomasse de bois formée devient suffisante pour les analyses biochimiques.

Les hêtres ont des teneurs en protéines quasiment identiques à celles des chênes. Il apparaît aussi que les différences de concentrations en protéines observées dans les deux cernes les plus récents, pour les deux espèces, sont peu importantes. La dynamique saisonnière d'accumulation des protéines solubles est marquée pour les hêtres, en particulier après l'arrêt de la croissance du tronc. Chez les deux espèces, le cerne en formation présente une diminution des teneurs en sucres solubles et une augmentation des teneurs en amidon, l'amidon devenant le composé glucidique majoritaire après l'arrêt de la croissance radiale. La même tendance, moins marquée, est retrouvée dans le cerne de l'année précédente.

A partir du jour 300 où se produit la chute des feuilles, pour les deux espèces, la teneur en protéines diminue. Ceci est particulièrement visible chez les cernes 1997 du hêtre. Les cernes de l'année 1998 semblent faire exception puisque leur concentration tend à augmenter ou à se stabiliser, correspondant au remplissage du cerne de l'année au cours de sa mise en place.

Un maximum dans les concentrations en protéines est observé en février (JJ 399) pour le hêtre et en juillet (JJ 198) pour le chêne.

Discussion

Les teneurs en protéines solubles que nous avons déterminées chez le chêne ($0.75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS) et le hêtre ($0.42 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS) sont comparables à celles déjà rapportées chez le peuplier ($4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS, Sauter et van Cleve, 1994), le frêne ($4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS, Marmann *et al.* 1997) ou encore le pêcher ($3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ MS, Gomez et Faurobert, 2002). Les concentrations plus importantes en protéines solubles chez le chêne que le hêtre vont dans le même sens que les différences déjà été rapportées pour les réserves glucidiques, dans tous les organes pérennes (Barbaroux et Bréda, 2002, Barbaroux *et al.* 2003). Inversement, Barbaroux *et al.* (2003) n'avaient pas trouvé de différences entre les deux espèces en teneur en azote total, excepté dans les branches où les teneurs en azotes étaient deux fois supérieures chez le chêne que chez le hêtre. En faisant l'hypothèse que les protéines contiennent en moyenne 6% de N (Yeoh et Wee, 1994) et d'après les teneurs en azote total déterminées par Barbaroux *et al.* (2003) dans les différents organes, la contribution de l'azote protéique à l'azote total a pu être calculée. L'azote protéique représente la majeure partie de l'azote total (Table 2 publication) surtout chez le chêne : dans les troncs (91 et 69 % de l'azote total en octobre 1999 et en juin 2000) et dans les racines (59% de l'azote total). A l'inverse dans les branches de chêne, l'azote protéique représente seulement 26-39 % de l'azote total. Dans les organes de hêtre, la contribution de l'azote protéique à l'azote total est également très faible, environ 29% dans le tronc, 19% dans les racines et seulement 17% dans les branches. Ceci permet d'émettre l'hypothèse que d'autres composés azotés contribuent à l'azote total dans ces organes. De la même manière, dans le tronc des chênes, la plus faible contribution de l'azote protéique à l'azote total a été observée en juin et non en octobre, ce qui laisse également penser que les autres composés azotés sont mobilisés lors de la réactivation printanière. D'après la littérature, la nature des composés azotés diffèrent selon les espèces, leur stade de développement et la saison (Tromp et Ova, 1985). Chez les espèces pérennes, l'azote est stocké à la fois sous forme de protéines et d'acides aminés. Les uréides et les amides, avec de faibles rapports C/N, sont considérés comme des formes efficaces de stockage et de transport de l'azote, en regard de la quantité de carbone nécessaire (Dickson, 1989). Il existe encore une controverse pour savoir si les composés aminés ou protéiques sont les plus importants. Comme dans le cas du chêne de notre étude, Kang et Titus (1980) ont trouvé environ 90% de l'azote sous forme protéique et 10% sous forme d'acides aminés dans l'écorce de tissus de pommier. Cependant, les proportions relatives de ces deux familles de composés varient en

cours de saison, entre les différents organes et avec la fertilité (Dickson, 1989). Plus récemment, Marmann *et al.* (1997) ont montré que les protéines solubles représentent environ 44% et 19% des concentrations en azote total respectivement dans le tronc et les racines, pour des semis de 3 ans de *Fraxinus excelsior*.

Nous avons retrouvé une distribution verticale des teneurs en protéines solubles totales comparable à celle des glucides mise en évidence dans les mêmes arbres par Barbaroux *et al.* (2003), à savoir : des concentrations plus élevées dans les parties terminales et jeunes (racines fines et pousses) et des concentrations assez constantes le long du tronc. Cette distribution est cohérente avec les observations de Sauter *et al.* (1989) sur de jeunes peupliers âgés de 8 ans. Lacoïnte *et al.* (1993) mentionnent que les tissus jeunes ont des demandes plus importantes en réserves pour assurer leur croissance.

De manière surprenante, nous avons trouvé peu de différences dans les concentrations en protéines solubles entre juin et octobre dans les deux espèces, alors que les concentrations en glucides étaient très différentes. Seules les plus jeunes pousses avaient des concentrations plus élevées en juin qu'en octobre, reflétant probablement la demande importante pour la croissance déjà mentionnée. D'autres auteurs et en particulier Sauter et Van Cleve, cités dans la récente synthèse de Sauter et Witt (1997) mentionnent des patterns franchement contrastés entre glucides et protéines : une décroissance rapide et majeure des protéines se produit au printemps, aussi bien en concentration qu'en modifications ultra structurales à l'échelle des corps protéiques ; une mobilisation parallèle entre protéines et glucides se produit ensuite au moment du débourrement. Contrairement à l'amidon, il ne semble plus y avoir de dépôt de protéines après que la croissance foliaire ait eu lieu chez le chêne, alors qu'un remplissage marqué est visible chez le hêtre, surtout dans le tronc.

Nous avons voulu vérifier si le choix des dates de minimum et maximum pour les glucides était inadéquat pour les concentrations minimale et maximale en protéines solubles. En effet, cette hypothèse pouvait être émise à partir des dynamiques saisonnières de protéines solubles déjà publiées chez le peuplier (Sauter et Witt, 1997) ou chez le pêcher (Gomez et Faurobert, 2002). En effet dans ces travaux, il n'y avait pas de différence de teneur en protéines entre juin et octobre, mais la date de teneur maximale serait plutôt comprise entre février et mars plutôt qu'en octobre.

Pour aborder cette question de choix de la date, nous avons analysé les variations mensuelles de concentrations en protéines solubles dans les pousses et dans les deux derniers cerne annuels de croissance du tronc à 1.30 m. Les chênes et les hêtres présentent des

dynamiques opposées de concentrations en protéines solubles totales au printemps. Dans les branches de hêtre, les concentrations en protéines augmentent graduellement et significativement d'avril à juin, alors qu'elles diminuent régulièrement chez le chêne, d'un maximum en avril jusqu'à un minimum en août. Les dates de minimum et de maximum des concentrations en protéines solubles totales sont donc différentes que celles des glucides. Ceci est retrouvé également dans les cernes les plus jeunes. Les protéines solubles totales semblent donc bouger plus précocement que les TNC, ce qui a fait dire à Gomez et Faurobert (2002) que ces protéines pourraient être utilisées comme marqueur précoce de réactivation printanière. Toutefois, ces modifications précoces pourraient résulter essentiellement de redistributions internes à l'arbre, avec des échanges entre compartiments. C'est le cas en outre dans le cerne en cours d'élaboration dont le remplissage semble en partie résulter du transfert du cerne élaboré l'année précédente. Cependant, cette étude ne nous permet pas d'aller plus loin et ne nous permet pas de distinguer si l'azote nécessaire à la croissance printanière provient de l'assimilation des nitrates ou de remobilisation à partir d'organes de stockage. L'utilisation de marquages à l'azote 15 serait nécessaire (Millard, 1996) mais cette technique reste difficile à mettre en œuvre sur le terrain et sur des arbres adultes. Nous utiliserons cet outil dans le chapitre trois, sur des plants chênes et de hêtres.

Jusqu'à présent, aucune protéine végétative de stockage (VSP) spécifique n'a été identifiée chez le chêne sessile (*Quercus petraea*) et chez le hêtre (*Fagus sylvatica*), alors que plusieurs protéines ont déjà été rapportées comme forme de stockage d'azote chez d'autres espèces d'arbres (Wetzel et Greenwood, 1991). La contribution des VSP à la remobilisation d'azote stocké demeure cependant peu claire à ce jour (Gomez et Faurobert, 2002). Les travaux montrent une variabilité considérable entre les espèces et les tissus dormants. La proportion de VSP dans l'azote total varie entre 15% chez le douglas (Roberts *et al.* 1991), 25% chez le peuplier (Langheinrich et Tischner, 1991) et plus de 70% dans le bois de peuplier (Sauter *et al.* 1988). Notre étude a analysé la fraction correspondant à toutes les protéines solubles, mais toutes ne sont pas des protéines de stockage. Nous présenterons au chapitre 2 une étude visant à identifier d'éventuelles VSP chez le chêne et à la quantifier (Gérant *et al.* en préparation).

La connaissance des biomasses de chaque arbre et de chaque compartiment dans l'arbre nous a permis de calculer les quantités de protéines solubles totales dans les arbres et de quantifier l'apport potentiel en carbone de ces protéines. Un des objectifs initiaux de ce travail était bien de quantifier la contribution potentielle des protéines au bilan de carbone de

l'arbre, en plus des apports du pool de réserves glucidiques. Nos calculs ont conduit à une estimation du C protéique d'environ 500 g de C pour le chêne et seulement 250 g C pour le hêtre. Rapportées aux quantités de C contenues dans les réserves glucidiques, ces protéines représentent une contribution potentielle non négligeable, respectivement de 28% et de 21% chez le hêtre et le chêne.

Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons décrit la distribution des protéines solubles totales par rapport à celle de réserves glucidiques dans des chênes et des hêtres adultes, et nous avons quantifié leur contribution potentielle au bilan carboné. Nous avons conclu à une répartition similaire des protéines solubles entre les espèces. Le chêne présente quant à lui des concentrations plus élevées en protéines et en glucides que le hêtre, et ceci quelque soit l'organe. Bien que dix fois moins concentrées que les réserves glucidiques, les protéines peuvent contribuer potentiellement au bilan de carbone total de l'arbre. Le fort couplage entre métabolisme carboné et azoté conforte l'intérêt de ces estimations conjointes de composés de réserves glucidiques et protéiques chez les arbres. Les protéines apportent une source importante d'azote au printemps, lorsque le débourrement se produit et qu'il faut remplir les feuilles. Nous ne pouvons ici pas dire si cet azote vient majoritairement des composés de réserves ou de l'assimilation de nouvel azote puisé dans le sol. Nous proposerons dans le chapitre 3 une expérience sur jeunes plants de chêne et de hêtre visant à répondre en outre à cette question.

Par ailleurs, nos calculs montrent encore un déficit de réserves par rapport aux besoins au printemps, ce qui suggère que d'autres composés de réserves interviendraient dans l'apport d'azote et de carbone aux espèces étudiées ici. Nous pensons en particulier aux acides aminés et aux amides qui sont les formes azotées les plus mobiles. Ces composés seront donc dosés dans la suite des expériences, afin d'établir un bilan plus complet.

Enfin, les protéines solubles totales ne comportent généralement qu'une très petite part de protéines végétatives de stockage. Dans le chapitre 2, nous proposons de révéler l'existence de telles protéines chez le chêne, et si elles existent, nous tenterons de les quantifier.

**Caractérisation et compartimentation
des réserves carbonées et azotées
dans l'aubier de chênes pédonculés *Quercus robur* L.
adultes**

Chez les arbres, les réserves carbonées sont stockées dans les différents organes majoritairement sous forme glucidique (Chapin *et al.* 1990). L'amidon est la forme privilégiée de stockage du carbone dans la plupart des arbres, et le chêne et le hêtre ne font pas exception (Barbaroux 2002). Il s'agit d'un polysaccharide insoluble dans l'eau. Il présente l'avantage d'être une forme métaboliquement inactive contrairement aux glucides de petite taille, tels que les monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides, polyalcools, regroupés sous le terme de sucres solubles. Certains sucres solubles participent aussi au stockage du carbone mais dans une moindre mesure par rapport à l'amidon. Dans la plupart des cas, cette fraction soluble est composée principalement de saccharose, et secondairement de glucose et fructose (Kramer et Kozlowski 1979).

Les réserves glucidiques sont majoritairement concentrées dans les racines. Cependant, si on raisonne en quantité, les parties aériennes (notamment le tronc) en contiennent plus que les parties racinaires. Les réserves contenues dans les fines racines sont dites « égoïstes » en raison de leur utilisation locale pour leur propre renouvellement rapide.

Certaines espèces telles que le pin sylvestre, le tilleul ou le platane peuvent aussi accumuler des lipides dans leur tissu ligneux tels que les triacylglycérols, les acides gras libres, les stérols ou les phospholipides (Höll, 1997). Quelquefois, leurs concentrations dépassent celle des glucides non structuraux. On appelle ces arbres des arbres gras ou « fat-trees » par opposition aux arbres accumulant de l'amidon « sugar-trees » selon la classification de Sinnott (1918). Mais cette forme de stockage du carbone semble dédiée à certaines graines ou fruits plutôt qu'aux organes végétatifs.

L'azote représente moins de 1% de la matière sèche d'un arbre, les feuilles étant l'organe le plus riche en azote (Bollmark *et al.* 1999). Les réserves azotées sont des composés du métabolisme beaucoup moins abondants que les réserves carbonées. En général, l'azote est stocké principalement sous forme d'acides aminés et de protéines chez les plantes pérennes (Dickson 1989). Ces deux formes peuvent servir ensemble de composés de stockage de l'azote chez les arbres mais parfois, l'un ou l'autre tend à dominer (Kang et Titus 1980,

Tableau 2.I. Taille et localisation des VSP trouvées chez différentes espèces par différents auteurs.

Espèce	Organe	Masse moléculaire (kDa)	Références
<i>Acacia auriculiformis</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Acacia catechu</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Acacia confusa</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Adenantha pavonina</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Aglaia odorata</i>	Branches	-	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Aglaia odorata</i>	Branches	-	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Albizia chinensis</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Albizia falcataria</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Albizia julibrissin</i>	Branches	17.3 - 19	Tian&Hu, 2004
<i>Acer saccharum</i>	Ecorce	16, 24	Wetzel <i>et al.</i> 1989
<i>Albizia odoratissima</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Bauhinia variegata</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Caesalpinia sepiaria</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Calliandra haematocephala</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Campilostropis macrocarpa</i>	Branches	31.3, 39, 41.4	Tian&Hu, 2004
<i>Chukrasia tabularis</i>	Branches	21, 30	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Chukrasia tabularis var velutina</i>	Branches	21, 30	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Cidapesa cinerascens</i>	Branches	-	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Erythrina indica</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Erythrina corallodendron</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Exochorda giraldii</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Ginkgo biloba</i>	Ecorce	40, 45	Shim and Titus 1985
<i>Gleditsia sinensis</i>	Branches	18, 21.6, 31.3, 32.7	Tian&Hu, 2004
<i>Hevea brasiliensis</i>	Tronc, feuilles, racines	67	Tian <i>et al.</i> , 1998
<i>Khaya senegalensis</i>	Branches	21, 18	Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Larix decidua</i>	Ecorce	25, 27, 32	Wetzel and Greenwood, 1989
<i>Lespedeza floribunsa</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Lespedeza formosa</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Leucaena leucocephala</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Malus domestica</i>	Ecorce	Diff. tailles	Tromp et Ovaas, 1973
<i>Melia azedarach</i>	Branches	19, 20	Tian&Hu, 2004
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	Bois	32, 34	Harms and Sauter 1991
<i>Mimosa sepiaria</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Myroxylon balsamum</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Peltophorum pterocarpum</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Picea</i>	bourgeons, tronc, racines	20, 27	Roberts <i>et al.</i> , 1991
<i>Pinus strobus</i>	Ecorce	15	Wetzel and Greenwood 1989
	Bois	32	Sauter&Van Cleve 1991; 1994

Wetzel et Greenwood 1989, Gomez et Faurobert 2002). Par exemple, chez de jeunes chênes pédonculés, les acides aminés représentent 61% de la fraction totale d'azote soluble lorsque les plants sont bien fertilisés (Vizoso 2004).

Certains acides aminés peuvent ainsi constituer des formes majeures d'immobilisation de l'azote. Ceux ayant le plus d'importance sont l'arginine, la glutamine, l'asparagine et la proline. Ainsi, chez de jeunes chênes pédonculés, l'asparagine est majoritaire lorsque les plants sont bien fertilisés (Vizoso *et al.* soumis). Les amides (glutamine et asparagine), riches en azote, ont une meilleure efficacité pour le stockage de celui-ci. La proline pourrait quant à elle traduire une importante fonction métabolique chez certains plants dormants autre que le stockage de l'azote (Dickson 1989).

L'étude du pool de protéines solubles et de ses variations saisonnières a permis de mettre en évidence, pour certaines espèces, l'accumulation de protéines spécialisées dans la fonction de stockage de l'azote dans les parties végétatives ; elles sont nommées VSPs (Vegetative Storage Proteins) pour protéines de réserves végétatives. En raison de leur forte variabilité interspécifique, il n'existe pas de méthode analytique précise permettant de les mettre en évidence, mis à part les critères généraux qui ont été choisis pour les identifier. D'après O'Kennedy et Titus (1979), puis Staswick (1994), une VSP est une protéine trouvée en quantité importante dans les tissus dormants et disparaissant à la reprise de la végétation. A ce titre, la rubisco, considérée comme une protéine de réserve (jusque 85% de l'azote foliaire) est à distinguer des VSP définies par Staswick (1994). En effet, il s'agit d'une réserve d'azote qui se constitue pendant la saison de croissance et qui est dégradée au moment de la chute des feuilles, son cycle est donc à l'inverse de celui des VSP.

Les VSP ont été bien étudiées chez des espèces à bois dur (Chapin et Kedrowski 1983, Harms et Sauter 1991), chez des espèces fruitiers (Tromp 1970, Tromp et Ovaas 1973, O'Kennedy et Titus 1979, Titus et Kang 1982, Arora *et al.* 1992, Arora et Wisniewski 1996, Gomez et Faurobert 2002, Tian et Hu, 2003), le peuplier (Stepien 1992, Tian *et al.* 2005, Cooke et Weih 2005) mais beaucoup moins chez les espèces de forêts tempérées (Wetzel et Greenwood 1991) ou de zones tropicales (*Hévéa* : Tian *et al.* 1998, *Swietenia* : Tian *et al.* 2003). Le Tableau 2.I regroupe l'ensemble des publications portant sur les VSP chez les arbres. Les protéines de réserve peuvent représenter plus de 50% des protéines solubles totales chez *Gingko biloba* (Shim et Titus 1985) et le pommier *Malus domestica* (Titus, 1989) et plus de 70% des protéines solubles chez le peuplier (Sauter *et al.* 1988). Les profils

Tableau 2.I suite.

Espèce	Organe	Masse moléculaire (kDa)	Références
<i>Populus sp</i>	Ecorce, Bois, racines	32, 36	Langheinrich and Tischner 1991
<i>Populus x euramericana</i>	Bois	32	Van Cleve <i>et al.</i> 1988
	Ecorce	32, 34, 36, 38	Stepien and Martin 1992
<i>Prunus persica</i>	Ecorce	16, 19	Arora&Wisniewski. 1996
	Bois	19	Arora <i>et al.</i> 1992
	Bois, bourgeons	16.5, 19	Gomez et Faurobert 2002
	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Prunus salicina</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Prunus tormentosa</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Pinus sylvestris</i>	Feuilles	17, 20, 25, 32	Kontunen-Soppela <i>et al.</i> , 2000
<i>Prunus yedoensis</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Prunus yedoensis var taizanfukus</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Bourgeons	30	Roberts <i>et al.</i> , 1991
<i>Pterocarpus indicus</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Pterocarpus marsupium</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Pterocarpus santalinus</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Quercus rubra</i>	Feuilles	Total proteins	Sundaram <i>et al.</i> , 1997
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Branches	30, 31.8	Tian&Hu, 2004
<i>Rosa xanthina</i>	Branches	-	Tian&Hu, 2003
<i>Salix x smithiana</i>	Ecorce	32	Wetzel <i>et al.</i> 1989
	Ecorce	32	Wetzel <i>et al.</i> 1989
	Ecorce	32, 34	Coleman <i>et al.</i> 1991
<i>Samanea saman</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Schizolobium excelsum</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Senna siamea</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Senna spectabilis</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Senna surattensis</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Sesbania grandiflora</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Styphnolobium japonicum</i>	Branches	15.6, 17.3, 19, 35	Tian&Hu, 2004
<i>Styphnolobium japonicum var pendula</i>	Branches	15.6, 19, 35	Tian&Hu, 2004
<i>Swietenia macrophylla</i>	Ecorce, racines, feuilles, tronc, bourgeons	18, 21	Tian <i>et al.</i> , 2002
			Tian <i>et al.</i> , 2003
<i>Swietenia mahogani</i>	Branches		Tian <i>et al.</i> , 2002
<i>Taxodium distichum</i>	Bois	35	Harms and Sauter 1991
<i>Tephrosia candida</i>	Branches	15 - 45	Tian&Hu, 2004
<i>Xalsura cochinchensis</i>	Branches	-	Tian <i>et al.</i> , 2002

électrophorétiques présentent, par ailleurs, une très grande diversité et révèlent une hétérogénéité de masse moléculaire. On observe ainsi un polypeptide majeur de 40 kDa dans l'écorce du *Gingo biloba* (Shim et Titus 1985) et deux polypeptides de plus petite taille (16,5 et 19 kDa) chez le pêcher (Gomez et Faurobert 2002). Chez le peuplier, les VSP des cellules du parenchyme proche du xylème ont une taille de 15 à 45 kDa (Stepien *et al.*, 1994), dans l'écorce, les 2 BSP (Bark Storage Protein) ont une taille de 32 et 36 kDa (Coleman *et al.* 1993, Beardmore *et al.* 1996, Tian *et al.* 2005). Chez le peuplier, l'accumulation des ARNm de BSP serait induite par des jours courts (Coleman *et al.* 1993). Plus récemment, Tian *et al.* (2005) ont montré que l'accumulation de la protéine de 32 kDa et l'expression du gène codant pour cette protéine seraient élevées dès le printemps, en conditions de température élevée et de jours longs, dans les nouvelles pousses mais pas dans l'écorce du tronc. Les auteurs mentionnent une participation, lors de la reprise de la croissance, de l'absorption d'azote racinaire dans cette accumulation de VSP dans les jeunes pousses.

Les VSP contribuent au fonctionnement même de la plante, en lui permettant de stocker les excès d'azote et de carbone assimilés, puis de les remobiliser afin d'assurer des besoins nutritionnels temporaires (Staswick, 1990). Dans le tronc de pêcher, bien que leur rendement de stockage (rapport des concentrations hivernale/estivale) soit bien plus élevé que pour le reste des composés azotés, les VSP ne fournissent que 5% de l'azote remobilisé au printemps pour la reprise de croissance, la plus grande partie (55%) provenant de la fraction non protéique, probablement constituée d'acides aminés (Gomez et Faurobert 2002). La mise en place des VSP ne caractérise pas les plantes pérennes puisqu'elle se déroule aussi chez les plantes herbacées annuelles comme la chicorée, le pissenlit ou le soja (Cyr et Bewley 1990, Staswick 1990 cités dans Stepien 1992, Goulas *et al.* 2001).

Dans ce chapitre, nous présentons une expérience dévolue spécifiquement à la recherche de protéines végétatives de réserve chez le chêne pédonculé adulte se développant en conditions naturelles. Le travail a été conduit en parallèle sur le bois d'aubier et sur l'écorce, mais seuls sont présentés les résultats acquis sur le bois d'aubier, quantitativement le plus gros volume de biomasse de l'arbre. Les objectifs de cette étude étaient de doser les composés azotés les plus courants (acides aminés, protéines et nitrates) et d'estimer leur contribution à l'azote total de l'arbre. En parallèle, les composés glucidiques ont été dosés afin de dresser un bilan carboné et azoté complet. Enfin la comparaison de tous ces composés à deux dates (Octobre et Juin), correspondant à deux stades phénologiques clés (juste avant chute des feuilles et

débourrement), devrait permettre d'estimer les quantités de réserves carbonées et azotées utilisées. Au niveau des protéines, la mise en évidence de protéines végétatives de stockage sera plus particulièrement recherchée chez le chêne pédonculé adulte. Si tel était le cas, la mobilisation printanière de telles protéines pourrait constituer un bon marqueur de réactivation de la croissance.

Tableau 2.II. Caractéristiques dendrométriques des arbres

Arbre	Echantillonnage automne "Octobre" (23/10/2001)				Echantillonnage printemps "Juin" (13/06/2002)			
	A1	A2	A3	A4	S1	S2	S3	S4
Diamètre (cm) sous l'écorce	6.35	7.34	8.23	7.75	6.73	6.00	8.23	7.75
épaisseur de l'aubier à 1.30m (cm)	1.59	1.83	4.12	1.95	1.68	1.50	2.06	1.94
Hauteur totale (m)	9.0	9.0	8.1	9.0	8.83	8.6	9.4	8.9
Hauteur de la couronne (m)	5.5	4.7	5.2	5.2	5	5.4	4.7	4.4

Matériel et méthodes

Site d'étude

Les arbres étudiés proviennent d'un peuplement équienne de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) âgé de 20 ans et de diamètres à 1,30 m compris entre 8 et 12 cm, issus de régénération naturelle en parcelle 7 de la forêt communale de Champenoux. Le massif est situé à 15 km à l'est de Nancy, dans le nord est de la France (48°44' N, 6°14' E, altitude 237 m). Les chênes constituent l'étage dominant et un sous étage de charme est présent. Le sol est homogène sur l'ensemble de la parcelle, il s'agit d'un sol limono argileux hydromorphe, avec un horizon carbonaté argileux apparaissant vers 30-45 cm de profondeur. L'humus est un mull eutrophe (pH 4,7). Le climat est de type océanique à influence continentale. Les précipitations moyennes annuelles sont de 744 mm et la température annuelle moyenne de 9,2 °C.

Echantillonnage destructif des chênes

Quatre couples de chênes de circonférence à 1,30 m comparable ont été sélectionnés en octobre 2001. Quatre chênes ont été abattus à la fin de la saison de croissance, à l'automne (23 octobre 2001). A cette date, aucun gel n'était intervenu. Les arbres ont été nommés A1 à A4 (A pour Automne). Les 4 autres chênes ont été abattus au printemps suivant, lorsque les feuilles ont été totalement déployées (13 juin 2002). Ils ont été nommés S1 à S4 (S pour Spring). D'après Barbaroux et Bréda (2002), ces deux périodes correspondent au maximum et au minimum des concentrations en glucides non structuraux de réserves. Après abattage, la hauteur totale et la hauteur à la base de la couronne ont été mesurées pour chaque arbre, ainsi que les circonférences à la souche, à 1,30 m, à 3 h et à la base de la couronne. Les caractéristiques dendrométriques de chaque arbre abattu sont données dans le Tableau 2. II.

Des échantillons de bois ont ensuite été prélevés dans différents organes (tronc, branches, pousses, grosses racines) et à différentes positions dans le tronc. Des rondelles de 1 à 2 cm d'épaisseur ont été récoltées à chaque hauteur dans le tronc, à 0m, 1,3 m, 3 m et à la base de la couronne. De plus, des échantillons ont été prélevés sur 3 branches latérales choisies à différentes hauteurs dans la couronne. Une section de bois a été prélevée au milieu de chaque branche. Les pousses des deux dernières unités de croissance ont aussi été échantillonnées dans trois niveaux de la couronne. Pour les échantillons de printemps, les feuilles ont aussi été récoltées sur les pousses alors qu'à l'automne, les feuilles ont été retirées car elles



Photo 2.1. Détail de l'échantillonnage après lyophilisation et avant broyage.
A. des troncs (avec séparation de l'écorce)
B. des branches
C. des racines

commençaient à jaunir. Enfin, des échantillons ont été prélevés sur trois grosses ($\varnothing > 2$ cm) racines latérales dégagées à la pioche.

Chaque échantillon de bois a été immédiatement plongé dans l'azote liquide. Les échantillons ont été rapportés rapidement au laboratoire proche du site (6 km) et stockés dans un congélateur à -80°C jusqu'à lyophilisation pendant une semaine (Dura-Top™, FTS Systems™, Stone Ridge, New York, USA). Une fois les échantillons lyophilisés, le bois de cœur a été découpé des rondelles de tronc à la scie. L'écorce, incluant à la fois le phloème, les tissus du périderme et le cambium, ont été séparés du bois de la partie interne des organes à l'aide d'un couteau (Photo 1). Les échantillons ont ensuite été découpés en petits morceaux à la scie pour ont été broyés deux fois à l'aide d'un broyeur Cyclotec 1093 Sample Mill (Tecator, Höganäs, Suède).

Echantillonnage supplémentaire de cernes

Des échantillonnages de cernes ont par ailleurs été réalisés sur des chênes sessiles (voir chapitre 1) par sondage à la tarière de Pressler dans le tronc à 1,30 m. Ces échantillons ont été utilisés pour caractériser une cinétique d'apparition de VSP dans les derniers cernes formés, ceci n'ayant pu être réalisé dans le cas du chêne pédonculé qui fait l'objet du chapitre 2. L'échantillon de bois obtenu par cette méthode est communément appelé carotte et mesure environ 5 mm de diamètre et 10 cm de long au maximum. Chaque mois une carotte a été prélevée en se déplaçant autour du tronc à 1,30 m. Après extraction de la carotte tous les trous sont rebouchés sur toute leur longueur par un tourillon de hêtre traité au fongicide (mercurothilate de sodium). La plaie est ensuite protégée par une couche de mastic horticoles. Après lyophilisation, chaque cerne est découpé au cutter pour être ensuite pesé puis broyé séparément au moyen d'un broyeur à billes (Mixer Mill MM200, Retsch). Avant le broyage, l'écorce (y compris le phloème) est enlevée de tous les échantillons sans être dosée. L'extraction des protéines totales solubles a été réalisée cerne par cerne sur les deux cernes les plus récents, élaborés en 1997 et 1998 puis les extraits seront soumis à une électrophorèse (SDS PAGE).

Estimation des biomasses d'aubier

Pour convertir les concentrations en protéines solubles de l'échantillon de bois (en g. 100 g^{-1} de matière sèche) à l'arbre entier, une estimation de la biomasse d'aubier de chaque

Tableau 2.III. Biomasse de l'aubier (exprimée en kg) pour chaque arbre et compartiment de l'arbre (tronc, branches et racines). Voir le texte pour les explications.

Arbres		Echantillonnage automne "Octobre" (23/10/2001)				Echantillonnage printemps "Juin" (13/06/2002)			
		A1	A2	A3	A4	S1	S2	S3	S4
Tronc	0 à 1.30 m	2.6	4.6	5.6	4.6	3.6	3.1	5.7	4.6
	1.30 à 3 m	1.4	1.9	3.0	2.4	1.3	1.3	2.0	2.3
	3 m à base houppier	2.4	2.9	2.0	3.8	1.8	2.2	3.3	3.1
	Couronne	1.6	3.4	1.0	2.4	2.0	1.5	4.9	4.7
Total tronc		7.9	12.7	11.6	13.1	8.7	8.0	15.8	14.8
Branches		2.3	3.2	4.2	3.7	2.6	2.0	3.7	3.7
Racines		2.4	3.8	5.2	4.4	2.9	2.0	4.4	4.4
Total arbre (kg)		12.6	19.7	21.0	21.2	14.2	12.0	23.9	22.8
Biomasse des feuilles (kg)						0.69	0.56	0.87	0.87

compartiment des arbres a été nécessaire. En effet, Barbaroux (2002) a montré que le bois de cœur ne contenait pas de réserves glucidiques, et nous faisons l'hypothèse qu'il en va de même des réserves protéiques. Si toutefois de telles protéines se trouvaient dans le bois de cœur, il y a de fortes chances qu'elles ne soient pas mobilisables. Les largeurs d'aubier ont été directement mesurées sur les rondelles de bois prélevées. L'aubier de chêne est reconnaissable visuellement par sa couleur plus claire et par l'absence de thylles dans les gros vaisseaux du bois initial. Pour les branches et les racines, aucune limite de duramen n'étant décelable, nous avons considéré que l'ensemble du bois était de l'aubier. Pour calculer le volume de chaque portion des arbres, chaque segment de tronc a été modélisé selon un tronc de cône dont le volume a été calculé à partir des mesures de circonférences et de longueurs de billons. Ces volumes ont été convertis en biomasse en utilisant les densités du bois déterminées de chêne et de hêtre par Barbaroux *et al.* (2003). Les biomasses de branches et de racines ont été calculées à l'aide de relations allométriques établies dans un peuplement voisin d'âge similaire. Les biomasses de grosses racines ont été déterminées selon Drexhage *et al.* (1999). Les biomasses de branches ont été estimées par différence entre la biomasse totale de l'arbre [1] et la biomasse de tronc [2] selon Brucciamacchie (1982) :

$$[1] \text{ biomasse totale de l'arbre (g)} = -484,7 * \text{Diam}_{1,30} + 414,4 * \text{Diam}_{1,30}^2$$

$$[2] \text{ biomasse du tronc (g)} = -320,9 * \text{Diam}_{1,30} + 332,2 * \text{Diam}_{1,30}^2$$

$$\text{biomasse de branches (g)} = [1] - [2]$$

avec $\text{Diam}_{1,30}$ le diamètre à 1,3 m exprimé en cm. Le Tableau 2. III résume les estimations de biomasse d'aubier de chaque compartiment de chaque arbre.

Estimation des biomasses de feuilles

La biomasse foliaire des arbres a été estimée à partir :

(1) d'une relation allométrique établissant la surface foliaire individuelle d'un arbre en m^2 à partir de sa surface d'aubier à 1,30 m en cm^2 (Bréda *et al.*, 1995)

$$\text{SF (m}^2\text{)} = 0,42 \times \text{SA (cm}^2\text{)} - 2,50$$

La surface d'aubier à 1,30 a été calculée à partir des largeurs d'aubier déterminées sur quatre rayons des rondelles de chaque arbre abattu.

(2) de la surface spécifique foliaire moyenne déterminée sur des branches d'ombre et de lumière de 60 arbres de cette parcelle permettant de convertir les surfaces foliaires en biomasses sèches (SLA = 75 g/m²)

Analyses biochimiques

Analyses du carbone et de l'azote total

Les teneurs en carbone et en azote total dans tous les échantillons ont été déterminées au pôle analytique de l'UMR 1137, Ecologie et Ecophysiologie Forestières à l'aide d'un analyseur élémentaire (NCS 2500, ThermoQuest, Milan, Italie).

Extraction et analyse des composés carbonés

Les sucres solubles et l'amidon ont été extraits à partir de 10mg d'aubier de chaque organe broyés dans 650µL d'un mélange méthanol : eau (7 : 3) à 4°C. Les broyats sont centrifugés à 17 000g pendant 10 minutes. L'extraction du culot est répétée 2 fois. Les surnageants sont regroupés et constituent l'extrait de sucres solubles qui seront dosés par colorimétrie. Le culot renferme l'amidon qui sera dosé par voie enzymatique. L'extraction a été répétée deux fois sur chaque échantillon.

Les sucres solubles ont été dosés par la méthode à l'antrone (van Handel, 1968): 100 µL of 30% KOH sont ajoutés à 100 µL d'extrait méthanolique, le mélange est porté à ébullition pendant 10 min, puis refroidi à la température ambiante. 1,5 mL de réactif à l'antrone (76 mL of H₂SO₄, 30 mL of H₂O et 150 mg d'antrone) sont ajoutés au mélange. La coloration se développe au cours de l'incubation à 37°C pendant 20 min. La concentration en saccharose est déterminée après mesure à 650 nm (spectrophotomètre UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) et en utilisant du glucose commercial (Sigma Aldrich) comme standard.

Après séchage des culots issus de l'extraction et renfermant l'amidon, 800µL de soude 0,2N sont ajoutés et les tubes sont placés à l'étuve à 50°C pendant une heure. Après refroidissement, la soude est neutralisée par 1mL d'acide citrique 0,1N. L'amidon solubilisé est hydrolysé par 4mg d'amyloglucosidase. Celle-ci est ajoutée par 200µL d'une solution à 20mg/mL préparée dans du tampon citrate de sodium 0,05M de pH 4,5. La préparation d'amyloglucosidase commerciale contient à peu près 22% d'amidon et de sucres. Pour éviter une absorbance élevée du blanc, l'enzyme est solubilisée dans le tampon citrate à 4°C. L'amidon et les sucres contaminants sont immédiatement éliminés de la solution d'enzyme par centrifugation au froid à 1100g pendant 10 minutes.

Les tubes contenant l'amidon et l'amyloglucosidase sont placés à 50°C pendant deux heures puis sont centrifugés à 17000g durant 5 minutes. Le culot est alors éliminé, le glucose se trouvant dans le surnageant.

Le glucose issu de l'hydrolyse de l'amidon est dosé sur 40µL de surnageant auxquels est ajouté 1mL de mélange glucose oxydase+peroxydase+O-dianisidine.

La réaction se déroule à l'étuve à 30°C pendant 10 minutes. Immédiatement après, 0,5mL d'acide chlorhydrique 6N est ajouté au mélange. L'absorbance est alors lue à 530nm (Ebell, 1969 et Haissig et Dickson, 1982). La concentration en glucose est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de glucose commercial (Sigma Aldrich).

Extraction des protéines solubles totales pour la quantification et les gels de polyacrylamide

Les échantillons d'aubier (10 mg de matière sèche) sont broyés à 4°C dans 2 mL of tampon d'extraction (Na₂ / KH₂PO₄ 0,1M pH 7,38, DTT 5mM, PEG 0,3% (m/v) et PVP 20,000.13% (m/v), leupeptine 1µM et pepstatin 1µM) à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM 301, GmbH & Co, Germany) pendant deux fois 45 secondes. Les broyats sont centrifugés deux fois à 12 000 × g à 4°C pendant 15 min et les surnageants sont utilisés pour un dosage colorimétrique.

Dosage colorimétrique des protéines solubles totales

Les protéines solubles ont été dosées selon la technique de Bradford (1976) ; cette méthode repose sur le fait que le pic maximal d'absorption du bleu de Coomassie se déplace de 465 à 595 nm lorsqu'il se lie aux résidus basiques des protéines en milieu acide. A 80 µL d'extrait protéique sont ajoutés 720 µL d'eau distillée et 200 µL de réactif BIO RAD Protein Assay. Après incubation à température ambiante pendant 5 minutes, la teneur en protéines solubles est déterminée en référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (gamme de 0 à 20 µg de SAB pour 800 µL dans du tampon phosphate) à partir d'une solution mère de 2 mg/mL. Une répétition du dosage est réalisée pour chaque échantillon.

Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les protéines contenues dans l'extrait sont utilisées pour les gels de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS-PAGE) avec un volume de tampon de Laemmli concentré 2 fois (Laemmli 1970) et ébullition pendant 5 min. L'électrophorèse a été réalisée à partir de gels constitués d'un gel de séparation à 14% de polyacrylamide avec SDS, et d'un gel de concentration à

4,5% avec SDS. Le tampon d'électrophorèse est un tampon Tris base (0,025 M), Glycine 0,192 M, et 0,1% SDS, pH8,3, et la migration s'est faite avec 20mA/gel. Les polypeptides ayant migré ont été colorés au nitrate d'argent selon Yan *et al.* (2000).

Analyse des images

Les gels ont été digitalisés avec le scanner BioRad GS 690 Imaging densitometer scanner. L'intégration de l'intensité des bandes de polypeptides a été mesurée à l'aide du logiciel BioRad Multi-Analyst software et chaque aire correspondant à une bande a été exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité totale des protéines de la piste. Les bandes présentes à l'automne et absentes au printemps ont été définies comme étant des VSP. En estimant que l'intensité de chaque bande est corrélée avec sa teneur en protéines, la contribution de chaque bande a été estimée par rapport aux protéines solubles totales (Langheinrich et Tischner, 1991; Noquet *et al.* 2001).

Dosage colorimétrique des acides aminés

Les acides aminés ont été extraits par broyage à 4°C de 10mg de poudre d'aubier de chaque organe dans 650µL d'un mélange éthanol : eau (MW : 7 : 3) pendant 10 min. Les extraits sont centrifugés 5 min à 17,000 g. Le surnageant est conservé, le culot est rincé deux fois 650µL de MW et centrifugé chaque fois pendant 5 min à 17,000 g. Les surnageants sont regroupés et constituent l'extrait d'acides aminés. La concentration en acides aminés est déterminée par colorimétrie à 570 nm (spectrophotomètre UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) selon la méthode à la ninhydrine de Yemm et Cocking (1955), avec la leucine comme standard.

Analyse individuelle des acides aminés

Pour déterminer la composition en acides aminés, les acides aminés ont été extraits comme indiqué précédemment puis ont été évaporés sous vide pendant la nuit (Maxi-Dry plus, Heto-model DW1, 0-110, Heto-Holten A/S Allerod, Denmark). Les résidus secs ont été dissous dans de l' HCl 0,1 N, et purifiés selon Chalot *et al.* (1994) sur une colonne Dowex 50 W 8X-400 (Sigma-Aldrich, USA), et élués avec 6mL d'ammoniaque 4,5 M. 50 µL of norleucine 10mM (Fluka) sont ajoutés, juste avant la purification, à chaque échantillon comme standard interne.

Les extraits purifiés sont déshydratés par évaporation sous vide (RC 10, Jouan, France) puis solubilisés dans 10µL de DMF et de 50µL MTBSTFA (Pierce, USA). Les échantillons sont

mélangés et mis à incuber à 80 °C pendant 25 min, les échantillons sont ensuite placés pendant 90 min à la température de la pièce avant injection dans un GC-MS (Hewlett Packard, USA, 5989 MS engine interfaced to a model 5890 GC and a model 7673 auto-sampler) selon Genenger *et al.* (2003). La concentration de chaque acide aminé identifié est exprimée en mg par gramme de matière sèche.

Analyse des nitrates

10mg de poudre d'aubier de chaque organe sont incubés 1 h à 45°C dans 1mL d'eau distillée. La suspension est centrifugée pendant 15 minutes à 5000g et la teneur en nitrate est déterminée dans le surnageant par la technique de Cataldo *et al.* (1975). L'absorbance est lue à 410 nm (spectrophotomètre UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA), une gamme étalon de KNO₃ permet d'exprimer les résultats en mg de NO₃ par g de matière sèche.

Facteurs de conversion

Les teneurs des différents composés azotés [exprimées en g de composé pour 100g de matière sèche] ont été converties en g N du composé pour 100g de matière sèche puis en **g N du composé pour 100g d'azote total** de manière à pouvoir estimer la contribution de chaque composé à l'azote total. Cette conversion est obtenue en tenant compte de différentes indications regroupées dans le Tableau 2. IV :

Tableau 2. IV. Facteurs permettant la conversion des teneurs des composés azotés (g/100gMS) en teneurs d'azote contenu dans ces composés (g N-Protéines/gMS).

composé	facteur de conversion	source
N Protéines	0,226 gN/g Prot	Yeoh et Wee, 1994
N AA	0,13 gN/g AA	MM moy. des AA : 110,40 et 1N / AA
N Amides	0,23 gN/g amides	MM moy des amides : 121,12 et 2N/amide
N NO ₃	0,23 gN/g NO ₃	MM du NO ₃ : 62 et 1N par NO ₃

MM = masse moléculaire

De même, les teneurs des différents composés carbonés [exprimées en g de composé pour 100g de matière sèche] ont été converties en g C du composé pour 100g de matière sèche puis en **g C du composé pour 100g de carbone total** de manière à pouvoir estimer la contribution de chaque composé au carbone total. Cette conversion est obtenue en tenant compte de différentes indications regroupées dans le Tableau 2. V :

Tableau 2. V. Facteurs permettant la conversion des teneurs des composés azotés (g/100gMS) en teneurs en carbone contenu dans ces composés (g C-Protéines/gMS).

composé	facteur de conversion	source
C Protéines	3,50 gC/g N Protéines	Gebbing <i>et al.</i> , 1998
C AA	0,54 gC/g AA	MM moy.: 110,40 et 5C / AA moy
C amidon	0,40 gC/g glucose	MM glucose : 180 et 6C / glucose
C sucres solubles	0,40 gC/g glucose	MM glucose : 180 et 6C / glucose

MM = masse moléculaire

Analyses statistiques.

Les données ont été analysées par une ou deux voies avec l'analyse de la variance (ANOVA) (StatView ® 5, SAS Institute Inc.). De façon générale, les dates, les organes ou les différences d'espèces étaient considéré significatif si $P < 0,05$

Tableau 2.VI. Composition de la biomasse en carbone total, en amidon, en sucres solubles et en azote total dans les différents compartiments de chênes pédonculés adultes récoltés en Octobre 2001 et en Juin 2002. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm les erreurs standards (SE) sont exprimées en g / 100 g de matière sèche. Pour une date donnée, une lettre identique indique que les valeurs entre organes ne sont significativement différentes au seuil de 5%. L'effet saison, pour un organe donné, est représenté par l'analyse de la variance de p et le seuil de signification (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Bh = base du houppier.

	Carbone total g/100g MS			Amidon g/100g MS			Sucres solubles g/100g MS		
	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>p</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>p</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>p</i>
Branches	46.54 \pm 0.61 a	46.39 \pm 0.17a	0.7890	9.93 \pm 1.60 a	3.16 \pm 0.36 a	0.0003*	1.64 \pm 0.08 a	1.8 \pm 0.07 b	0.1875
Tronc Bh	47.03 \pm 14 a	47.31 \pm 0.11 a	0.1406	8.96 \pm 1.71 a	5.55 \pm 1.09 b	0.1249	1.65 \pm 0.04 a	1.32 \pm 0.07 a	0.0100*
Tronc 3 m	47.21 \pm 0.57 a	46.60 \pm 0.26 a	0.3580	9.92 \pm 0.64 a	4.21 \pm 0.76 b	0.0002*	1.62 \pm 0.14 a	1.42 \pm 0.25 a	0.4940
Tronc 1.30 m	46.91 \pm 0.13 a	46.66 \pm 0.25 a	0.4160	9.62 \pm 0.75 a	5.25 \pm 0.67 b	0.0146*	1.62 \pm 0.05 a	1.19 \pm 0.06 a	0.0079*
Tronc 0 m	46.05 \pm 0.36 a	46.22 \pm 1.71 a	0.9380	14.22 \pm 1.28 a	8.39 \pm 1.11 b	0.016*	1.64 \pm 0.08 a	1.13 \pm 0.05 a	0.0004*
Racines	45.11 \pm 0.64 b	45.59 \pm 0.17 a	0.3012	23.55 \pm 4.38 b	14.23 \pm 1.43 c	0.0172*	2.47 \pm 0.52 b	2.67 \pm 0.15 c	0.6162
Feuilles		47.55 \pm 0.08 b	-		Non dosé			Non dosé	

	Azote total g/100g MS		
	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>p</i>
Branches	0.26 \pm 0.02 b	0.22 \pm 0.01 b	0.1513
Tronc Bh	0.17 \pm 0.02 a	0.13 \pm 0.02 a	0.2276
Tronc 3 m	0.15 \pm 0.03 a	0.11 \pm 0.02 a	0.3175
Tronc 1.30 m	0.16 \pm 0.03 a	0.14 \pm 0.02 a	0.5633
Tronc 0 m	0.13 \pm 0.01 a	0.14 \pm 0.01 a	0.6880
Racines	0.19 \pm 0.02 a	0.26 \pm 0.03 b	0.1679
Feuilles		2.30 \pm 0.06 c	-

Résultats

Comparaison de croissance des arbres étudiés

Caractéristiques dendrométriques des arbres et biomasse de l'aubier de tous les compartiments et de l'arbre entier (Tableaux 2. II et 2. III)

Les arbres échantillonnés à l'automne et au printemps ne diffèrent ni par leur diamètre sous écorce ($7,3 \text{ cm} \pm 0,3$, $p=0,77$) ni par leur surface d'aubier ($2,1 \text{ cm} \pm 0,3$, $p=0,37$), ni par leur hauteur ($8,9 \text{ m} \pm 0,1$, $p=0,42$). De même, les biomasses totales d'aubier ($18,6 \text{ kg} \pm 1,7$, $p=0,98$) et des différents compartiments sont comparables entre les deux dates d'abattage. L'aubier du tronc présente en moyenne une biomasse de $11,5 \text{ kg} (\pm 1,1)$ soit 62% de la biomasse totale d'aubier, les branches de l'ordre de $3,2 \text{ kg} (\pm 0,3)$ soit 17% de la biomasse d'aubier totale, les grosses racines environ $3,8 \text{ kg} (\pm 0,4)$ soit 20% de la biomasse totale d'aubier. La biomasse des feuilles en juin est de $750 \text{ g} (\pm 80)$. Le rapport des biomasses racinaires (fines + grosses) sur partie aérienne (totale, aubier + duramen du tronc + branches), est de 0,21.

Contribution des composés carbonés et azotés à la biomasse de l'aubier des arbres étudiés

Teneurs des composés carbonés et azotés dans l'aubier des différents organes de chênes pédonculés adultes (Tableaux 2. VI et VII)

Le carbone total (Tableau 2. VI) constitue plus de 45% de la biomasse totale dans tous organes pérennes confondus, la teneur en carbone est légèrement plus importante dans les feuilles en Juin (47,55%). En Octobre, la teneur en carbone total de l'aubier des racines est significativement la plus faible (45,11% de la masse de matière sèche) par rapport aux autres compartiments (46,05 à 47,03% de la masse de matière sèche dans l'aubier des troncs au collet et à la base du houppier, respectivement). En juin, il n'y a pas de différence entre les organes, les teneurs sont comprises entre 45,59% et 47,31% de la masse de matière sèche pour les racines et le tronc à la base du houppier, respectivement.

L'amidon (Tableau 2. VI) représente des teneurs comprises entre 3,16% et 23,55% de la masse de matière sèche dans les branches en Juin et dans les racines en Octobre, respectivement. La teneur moyenne (tous organes confondus) est de 12,99% en Octobre et de 7,43% en Juin. En Octobre, les racines ont la teneur en amidon significativement la plus importante (23,55% de la masse de matière sèche) par rapport aux autres compartiments (8,96 à 14,22% de la masse de matière sèche dans les troncs à la base du houppier et au collet,

Tableau 2.VII. Composition de la biomasse en nitrate, acides aminés et protéines solubles totales dans les différents compartiments de chênes pédonculés adultes récoltés en Octobre 2001 et en Juin 2002. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm les erreurs standards (SE) sont exprimées en g / 100 g de matière sèche. Pour une date donnée, une lettre identique indique que les valeurs entre organes ne sont significativement différentes au seuil de 5%. L'effet saison, pour un organe donné, est représenté par l'analyse de la variance de p et le seuil de signification (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Bh = base du houppier.

	Nitrate g/100g MS			Acides aminés g/100g MS			Protéines solubles totales g/100g MS		
	<i>October</i>	<i>June</i>	<i>p</i>	<i>October</i>	<i>June</i>	<i>p</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>p</i>
Branches	0.09 \pm 0.01 b	0.08 \pm 0.01 a	0.0082*	0.11 \pm 0.02 a	0.12 \pm 0.01 b	0.7595	0.20 \pm 0.02 a	0.14 \pm 0.01 b	0.0038*
Tronc Bh	0.07 \pm 0.01 a	0.06 \pm 0.01 a	0.4840	0.09 \pm 0.02 a	0.07 \pm 0.01 a	0.2379	0.30 \pm 0.04 c	0.12 \pm 0.03 b	0.0005*
Tronc 3 m	0.08 \pm 0.01 a	0.06 \pm 0.02 bc	0.3469	0.10 \pm 0.01 a	0.04 \pm 0.003 a	0.0001*	0.37 \pm 0.02 c	0.08 \pm 0.01 a	0.0001*
Tronc 1.30 m	0.07 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.01 c	0.0925	0.08 \pm 0.02 a	0.02 \pm 0.002 a	0.0007*	0.23 \pm 0.02 b	0.08 \pm 0.01 a	0.0001*
Tronc 0 m	0.09 \pm 0.01 a	0.07 \pm 0.01 c	0.4129	0.10 \pm 0.01 a	0.06 \pm 0.07 a	0.0026*	0.25 \pm 0.03 b	0.12 \pm 0.03b	0.0081*
Racines	0.15 \pm 0.01 c	0.15 \pm 0.01 d	0.1443	0.15 \pm 0.02 b	0.18 \pm 0.02 c	0.3814	0.24 \pm 0.02 b	0.16 \pm 0.01 b	0.0034*
Feuilles		Non dosé			Non dosé			2.30 \pm 0.04 c	-

respectivement). En juin, les racines ont la teneur en amidon significativement la plus importante (14,23% de la masse de matière sèche) par rapport aux autres compartiments (3,16 à 8,39% de la masse de matière sèche dans les branches et le tronc au collet, respectivement). Quelle que soit la saison, au niveau du tronc, les teneurs en amidon sont les mêmes entre le collet et la base du houppier.

Les teneurs en sucres solubles (Tableau 2. VI) sont 2 à 10 fois plus faibles que celles de l'amidon. Elles sont comprises entre 1,13 à 2,67% de la masse de matière sèche dans les troncs à la base du houppier en Juin et dans les racines en Octobre, respectivement. La teneur moyenne (tous organes confondus) est de 2,53% en Octobre et de 1,28% en Juin. En Octobre, les racines ont la teneur en sucres solubles significativement la plus importante (2,47% de la masse de matière sèche) par rapport aux autres compartiments (1,60% de la masse de matière sèche en moyenne). En juin, les sucres solubles sont significativement plus concentrés dans la biomasse racinaire (2,67% de la masse de matière sèche) que dans celle des branches (en moyenne 1,80% de la masse de matière sèche), cette teneur en sucres solubles dans les branches étant elle-même significativement plus importante que celle des différentes hauteurs de tronc (1,26% en moyenne). Quelle que soit la saison, au niveau du tronc, les teneurs en sucres solubles sont les mêmes entre le collet et la base du houppier.

L'azote total (Tableau 2. VI) constitue une faible proportion de la biomasse totale dans tous organes pérennes : la teneur moyenne (tous organes pérennes confondus) est de 0,19% de la masse de matière sèche en Octobre et en Juin, elle est plus importante dans les feuilles en Juin (2,30%). En Octobre, la teneur en azote total est significativement plus élevée dans les branches (0,26% de la masse de matière sèche) que dans les autres organes (0,16% de la masse de matière sèche en moyenne). En juin, l'azote total est presque deux fois plus concentré dans les branches et les racines (respectivement 0,22 et 0,26% de la masse de matière sèche) que dans le tronc (0,15% de la masse de matière sèche en moyenne). Quelle que soit la saison, au niveau du tronc, les teneurs en azote total sont les mêmes entre le collet et la base du houppier.

Le nitrate (Tableau 2. VII) constitue la plus faible proportion de la biomasse totale dans tous organes pérennes : la teneur moyenne (tous organes pérennes confondus) est de 0,09% de la masse de matière sèche en Octobre et en Juin. En octobre, au niveau du tronc, les teneurs en nitrate sont les mêmes entre le collet et la base du houppier. Par contre, en juin, les teneurs en nitrates sont plus faibles à la base de la couronne et à 3 m qu'au collet.

Tableau 2.VIII. Analyse de la variance (p) pour le carbone total (g/100g MS) et le carbone des composés carbonés dosés (g/100g C) pour tous les organes confondus. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. C SS = C sucres solubles, C Prot = C Protéines, C AA = N acides aminés, C dosé correspond à la somme (C amidon + C sucres solubles + C Protéines + C acides aminés). n = nombre de valeurs. Seuil de signification (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

saison	n	C total (g/100gMS)	C amidon (g/100gC)	C SS (g/100gC)	C Prot (g/100gC)	C AA (g/100gC)	C dosé (g/100gC)
Octobre 2001	28	46.37± 0.27	10.85 ± 1.25	1.60 ± 0.10	0.39 ± 0.03	0.12 ± 0.01	12.83 ± 1.33
Juin 2002	39	46.44 ± 0.33	6.43 ± 0.79	1.62 ± 0.10	0.20 ± 0.02	0.14 ± 0.02	7.78 ± 0.88
<i>différence</i>		<i>p = .8706</i>	<i>p = .0025*</i>	<i>p = .8871</i>	<i>p = .0001**</i>	<i>p = .6357</i>	<i>p = .0017**</i>

Tableau 2.IX. Analyse de la variance (p) pour l'azote total (g/100g MS) et l'azote des composés azotés (g/100g N) pour tous les organes confondus. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. N AA = N acides aminés, N Prot = N Protéines, N dosé correspond à la somme (N Protéines + N acides aminés + N NO₃). n = nombre de valeurs. Seuil de signification (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

saison	n	N total (g/100gMS)	N NO3 (g/100gN)	N AA (g/100 gN)	Nprot (g/100gN)	N dosé (g/100gN)
Octobre 2001	28	0.19 ± 0.02	12.23 ± 1.34	6.35 ± 0.61	35.60 ± 3.97	52.40 ± 5.17
Juin 2002	39	0.20 ± 0.02	13.10 ± 1.05	7.49 ± 0.62	16.55 ± 1.58	38.06 ± 2.01
<i>différence</i>		<i>p = .8466</i>	<i>p = .6111</i>	<i>p = .2108</i>	<i>p=0.0001***</i>	<i>p = .005*</i>

Les acides aminés (Tableau 2. VII) constituent également une faible fraction de la biomasse totale (en moyenne de 0,09% de la masse de matière sèche) qui est d'ailleurs comparable à celle du nitrate. En Octobre et en Juin, la concentration est presque deux fois plus élevée dans les racines (0,15 et 0,18% de masse de matière sèche respectivement) que dans les autres organes (0,08% de la masse de matière sèche en moyenne). En Juin, la teneur en acides aminés est presque deux et quatre fois plus importante dans les branches et les racines (respectivement 0,12 et 0,18% de la masse de matière sèche) que dans le tronc (0,05% de la masse de matière sèche en moyenne). Quelle que soit la saison, les teneurs en azote total sont les mêmes sur toute la hauteur du tronc.

Les teneurs en *protéines solubles totales* (Tableau 2. VII) sont 2 à 4 fois plus importantes que celles des acides aminés et du nitrate. Leur teneur est en moyenne de 0,25% et de 0,13% de la masse de matière sèche en Octobre et Juin respectivement. En octobre, les teneurs les plus élevées en protéines solubles sont dans le tronc à la base du houppier et à 3m (0,30 et 0,37% respectivement). Dans les racines et le tronc à la base et à 1,30m, elles sont de l'ordre de 0,24% et c'est dans les branches que la teneur est la plus faible (0,20%). En juin, les teneurs dans le tronc à 1,30m et à 3m sont de 0,08% de la masse de matière sèche alors que dans les autres organes pérennes, elles sont de l'ordre de 0,15%. C'est dans les feuilles que les concentrations sont les plus importantes (2,30% de la masse de matière sèche).

Effet de la saison sur la teneur des différents constituants analysés

Les concentrations d'azote total et de carbone total, exprimées en g de C ou d'N pour 100g de matière sèche, ne varient pas entre juin et octobre quelque soit le compartiment de l'arbre (Tableaux 2. VIII et 2.IX). En revanche pour l'amidon, les concentrations (gC/100g MS) sont systématiquement plus faibles en juin qu'en octobre, les différences étant significatives pour tous les compartiments excepté la base de la couronne. De même, les sucres solubles sont plus faibles en juin à la base du houppier, à 1,30m et au collet. En ce qui concerne les composés azotés (Tableau 2. VII), les teneurs en nitrate (gN/100g MS) sont plus faibles en juin dans les branches, les teneurs en acides aminés (gN/100g MS) sont plus faibles en juin dans le tronc de 0 à 3m et les protéines solubles totales sont moins concentrées en juin quelque soit l'organe.

Tableau 2.X. Quantités totales de C-Amidon, C-SS (sucres solubles), C-Protéines et C-AA (acides aminés) dans les différents compartiments de chênes pédonculés adultes récoltés en Octobre 2001 et en Juin 2002. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm les erreurs standards (SE) sont exprimées en g de carbone. Pour une date donnée, une lettre identique indique que les valeurs entre organes ne sont significativement différentes au seuil de 5%.

	C Amidon (g C)		C-SS (g C)		C-Prot (g C)		C-AA (g C)		C-dosé (g C)	
	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>
Branches	144 \pm 30 b	42 \pm 5 b	22 \pm 4 c	21 \pm 3 b	6 \pm 1 b	3 \pm 0.3 b	2 \pm 0.8 b	2 \pm 0.4 a	171 \pm 35 b	68 \pm 9 b
Tronc	390 \pm 105 a	288 \pm 60 a	59 \pm 12a	58 \pm 10 a	25 \pm 5 a	10 \pm 4 a	5 \pm 1 a	3 \pm 0.7 a	471 \pm 85 a	298 \pm 59 a
Racines	400 \pm 109 a	198 \pm 40 a	36 \pm 2 b	37 \pm 8 a	7 \pm 1 b	5 \pm 1 b	3 \pm 0.9 b	3 \pm 0.6 a	446 \pm 113 a	243 \pm 49 a

Tableau 2.XI. Analyse de la variance (p) pour les quantités de carbone des composés carbonés dosés (g C) pour tous les organes confondus. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. C SS = C sucres solubles, C Prot = C Protéines, C AA = C acides aminés, C dosé correspond à la somme (C amidon + C sucres solubles + C Protéines + C acides aminés). n = nombre de valeurs. Les effets saison et organes sont représentés par l'analyse de la variance de p et le seuil de signification (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

saison	n	C total (g)	C amidon (g)	C SS (g)	C Prot (g)	C AA (g)	C dosé (g)
Octobre 2001	28	8242 \pm 1206	736 \pm 248	108 \pm 18	38 \pm 10	9 \pm 3	879 \pm 272
Juin 2002	39	8483 \pm 1449	528 \pm 105	116 \pm 21	17 \pm 5	7 \pm 1	570 \pm 103
<i>p (saison)</i>	-	-	0.0029**	0.9097	0.0305*	0.0306*	0.0016**

Quantités des différents constituants carbonés à l'échelle de l'aubier des organes et de l'arbre entier.

Quantités des différents constituants carbonés à l'échelle de l'aubier des organes

Les teneurs des différents composés (Tableaux 2.VI et VII) ont été converties en quantités de carbone en tenant compte des facteurs de conversion (Tableaux 2.IV et 2.V) et de la biomasse des organes (Tableau 2.III). Ces quantités sont représentées dans le Tableau 2.X pour les trois compartiments (branches, racines et tronc) et aux deux dates de prélèvement. Les quantités de C de chaque composé carboné ont également été représentées à l'échelle de l'arbre entier (Tableau 2. XI).

D'une manière générale, quel que soit le composé, le tronc, du fait de sa biomasse, est le compartiment dans lequel les composés carbonés sont les plus abondants (Tableau 2.XI).

Le carbone sous forme d'amidon (C-Amidon) est le plus abondant des composés. Le C-Protéines ne représente que 6,6% du C-Amidon en Octobre. Les quantités de carbone sous forme d'amidon (C-Amidon) des racines sont équivalentes à celles mesurées dans le tronc. Les biomasses de ces deux compartiments sont différentes mais les teneurs en amidon sont plus importantes dans les racines que dans le tronc (Tableau 2.III).

Les quantités de carbone sous forme protéique (C-Protéines) sont plus faibles que celles du C-Amidon. La quantité de C-Protéines est plus importante dans le tronc est due à la biomasse plus importante. Dans les racines et les branches, les quantités de C-Protéines sont équivalentes. Ceci s'explique par des teneurs (Tableau 2.VII) et des biomasses (Tableau 2.III) comparables dans ces deux organes.

Les quantités de carbone sous forme d'acides aminés (C-AA) sont très faibles, comme c'était le cas pour les concentrations.

Quantités des différents constituants carbonés à l'échelle de l'arbre entier et effet de la saison

En ce qui concerne les quantités à l'échelle de l'arbre (Tableau 2.XI), le C-Amidon représente la plus grande quantité de carbone dosé mais reste faible par rapport à celle du carbone total incluant le carbone structural, en octobre, le C-Amidon représente en effet seulement 8,6 % du C total. Dans ce tableau, on peut observer que les quantités de C-Amidon, de C-Protéines et de C-AA sont significativement plus faibles au printemps, alors qu'il n'y a pas de différences pour le carbone total. Ces quantités vont nous permettre par la suite de caractériser la quantité de réserves qui seront présentées ci- dessous.

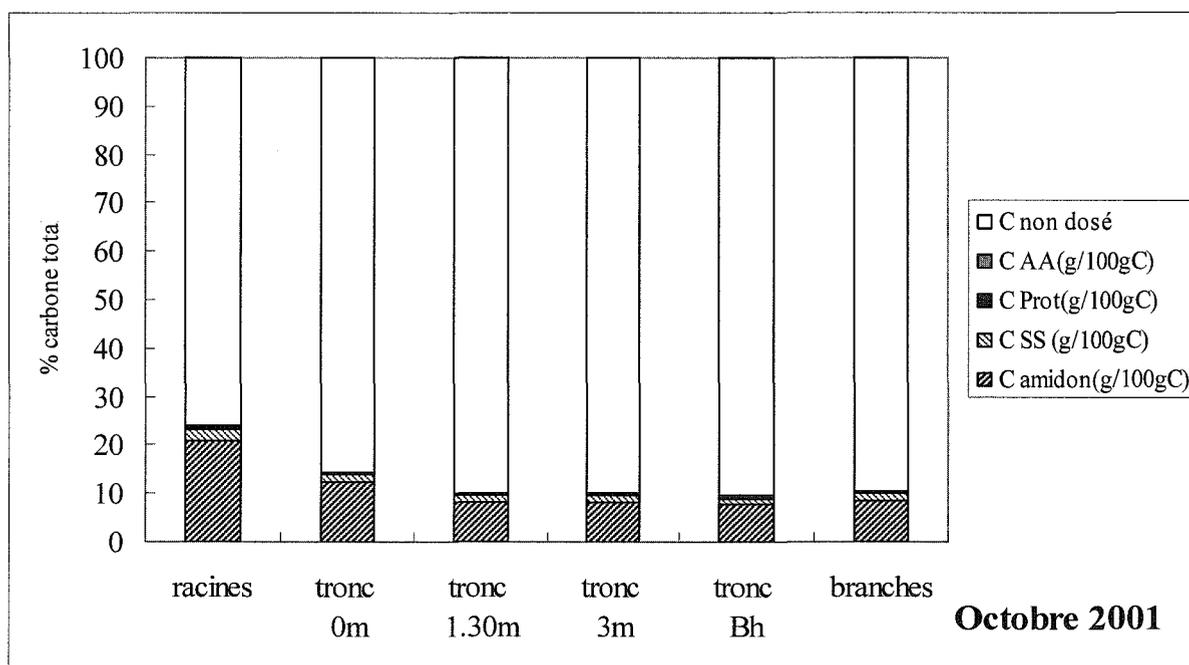
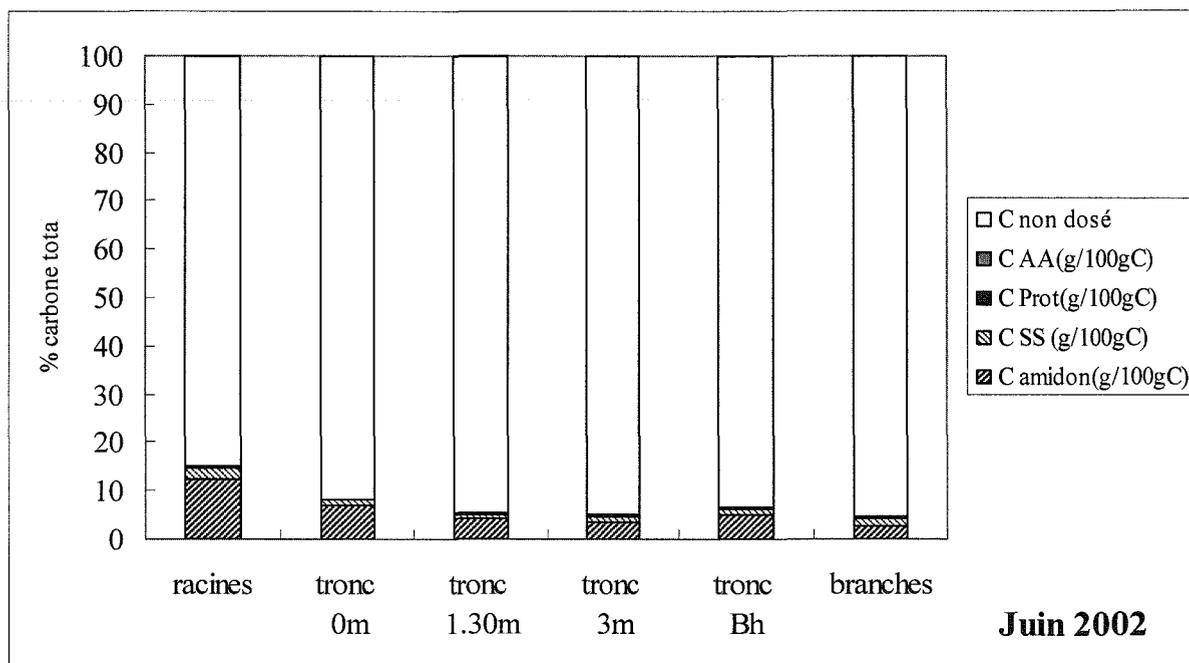


Figure 2.1. Contribution du carbone des composés dosés : amidon (C-Amidon), sucres solubles (C-SS), protéines solubles totales (C Prot) et acides aminés (C AA).au carbone total chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans et récolté en Octobre 2001 et Juin 2002. La différence de : $100 - [\text{somme (C-Amidon \% C total + C-SS \% C total + C-Protéines \% C total + C-AA \% C total)}]$ a été nommée C non dosé (C non dosé).Les valeurs sont exprimées en % du carbone total et ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. Bh = base du houppier

Contribution du C dosé au C total (Figure 2.1)

Le C-Amidon ne représentant qu'une faible part du carbone total et ayant des effets saisons marqués à l'échelle de l'arbre, nous avons déterminé la contribution de l'amidon, des sucres solubles, des acides aminés et des protéines solubles au carbone total, à partir des quantités en carbone de chacun des composés (en g C) et du carbone total. Cette contribution est exprimée en pourcentage du carbone total. La figure 2.1 montre que le carbone dosé (C-Amidon + C-SS + C-Protéines + C-AA) en juin est significativement plus faible que celui dosé en octobre (7,8% contre 12.8%, Tableau 2. VIII). La plus forte contribution en octobre est due à des contributions plus importantes des protéines solubles et de l'amidon au carbone total (Tableau 2. VIII). Les différences de contribution en carbone varient peu entre les organes, bien qu'on retrouve aux deux dates une contribution plus forte dans les racines. Il est à souligner à nouveau que les réserves glucidiques représentent la plus grande partie du carbone dosé.

Quantités des différents constituants azotés à l'échelle de l'aubier des organes et de l'arbre entier

Quantités des différents constituants azotés dans l'aubier à l'échelle des organes

Les quantités de chacun des composés azotés dosés (protéines, acides aminés et nitrate) ont été calculées suivant le même principe que pour les quantités des composés carbonés. Ces quantités sont représentées dans le Tableau 2.XII pour les trois compartiments (branches, racines et tronc) et aux deux dates de prélèvement. Les quantités d'N de chaque composé ont également été représentées à l'échelle de l'arbre entier (Tableau 2. XIII). D'une manière générale, quel que soit le composé, le tronc, du fait de sa biomasse, est le compartiment dans lequel les composés azotés sont les plus abondants (Tableau 2.XI). Dans les racines les quantités d'azote, quel que soit le composé, sont supérieures à celles observées dans les branches. Ceci s'explique par des teneurs plus élevées dans les racines (Tableau 2.VII) et des biomasses (Tableau 2.III) comparables dans ces deux organes.

Enfin, on peut noter que les quantités d'azote sous forme de protéines solubles (N-Protéines) sont plus abondantes que celles des autres composés dosés.

Quantités des différents constituants azotés à l'échelle de l'arbre entier et effet de la saison

En ce qui concerne les quantités à l'échelle de l'arbre (Tableau 2.XIII), l'N-Protéines représente la plus grande quantité d'azote dosé mais reste faible par rapport à celle de l'azote total, en octobre, l'N-Protéines représente seulement 34 % de l'N total. Dans ce tableau, on

Tableau 2.XII. Quantités totales de N-Protéines, N-AA (acides aminés) et N-NO₃ dans les différents compartiments de chênes pédonculés adultes récoltés en Octobre 2001 et en Juin 2002. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. Les valeurs correspondent aux moyennes ± les erreurs standards (SE) et sont exprimées en g d'azote. Pour une date donnée, une lettre identique indique que les valeurs entre organes ne sont significativement différentes au seuil de 5%.

	N-Prot (g N)		N-AA (g N)		N NO ₃ (g N)		N dosé (g N)	
	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>	<i>Octobre</i>	<i>Juin</i>
Branches	1.62 ± 0.31 b	0.92 ± 0.07 b	0.58 ± 0.21	0.48 ± 0.10	0.74 ± 0.14	0.52 ± 0.07	2.94 ± 0.62 b	1.92 ± 0.24 b
Tronc	7.27 ± 1.43 a	2.77 ± 1.17 ab	1.23 ± 0.27	0.68 ± 0.17	1.64 ± 0.20	1.95 ± 0.50	7.88 ± 1.01 a	4.41 ± 1.00 a
Racines	2.08 ± 0.41 b	1.30 ± 0.26 b	0.77 ± 0.21	0.76 ± 0.15	1.41 ± 0.19	1.14 ± 0.19	4.26 ± 0.80 b	3.20 ± 0.57 b

Tableau 2.XIII. Analyse de la variance (p) pour les quantités d'azote des composés dosés N- Prot (N-Protéines), N-AA (N-acides aminés), N-NO₃ (N-nitrate) pour tous les organes confondus. Les valeurs ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. Elles correspondent aux moyennes ± les erreurs standards (SE) et sont exprimées en g d'azote. N dosé correspond à la somme (N-Protéines + N-AA + N-NO₃). n = nombre de valeurs. Les effets saison et organes sont représentés par l'analyse de la variance de p et le seuil de signification (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

saison	n	N total (g N)	N-Prot (g N)	N-AA (g N)	N-NO ₃ (g N)	N-dosé (g N)
Octobre 2001	28	32.29 ± 7.96	10.96 ± 2.11	2.29 ± 0.85	3.29 ± 0.58	12.79 ± 2.13
Juin 2002	39	29.59 ± 3.04	4.99 ± 1.29	1.70 ± 0.25	3.46 ± 0.69	8.97 ± 1.56
<i>p (saison)</i>			0.0001***	0.0306*	0.6743	0.0001***

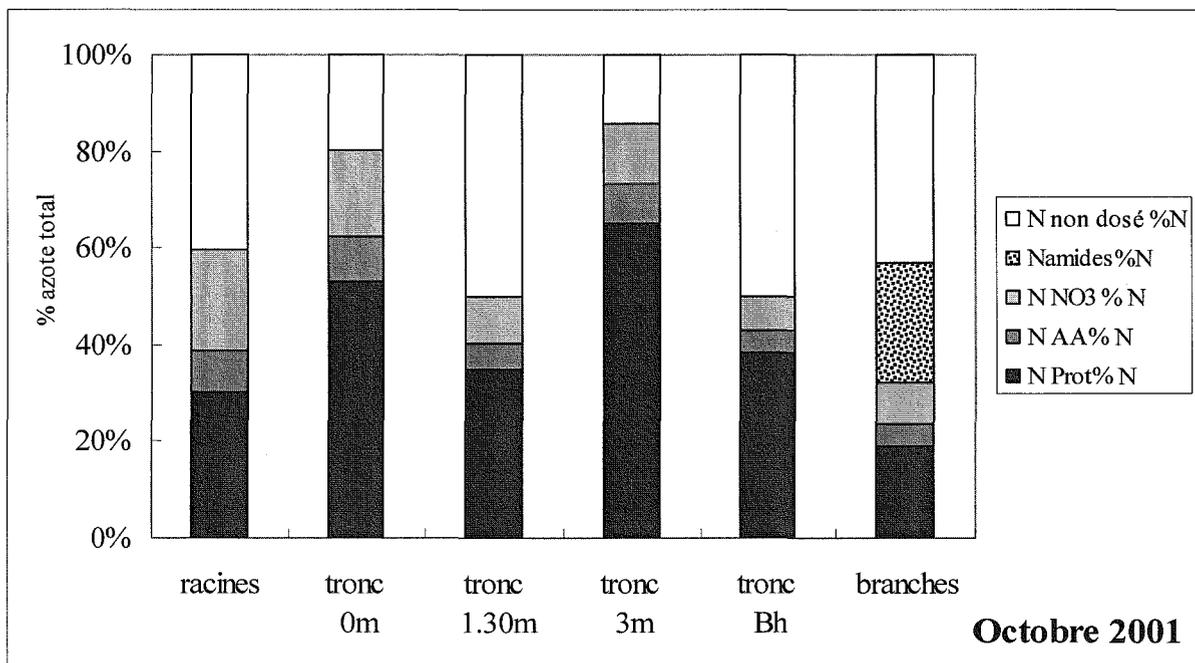
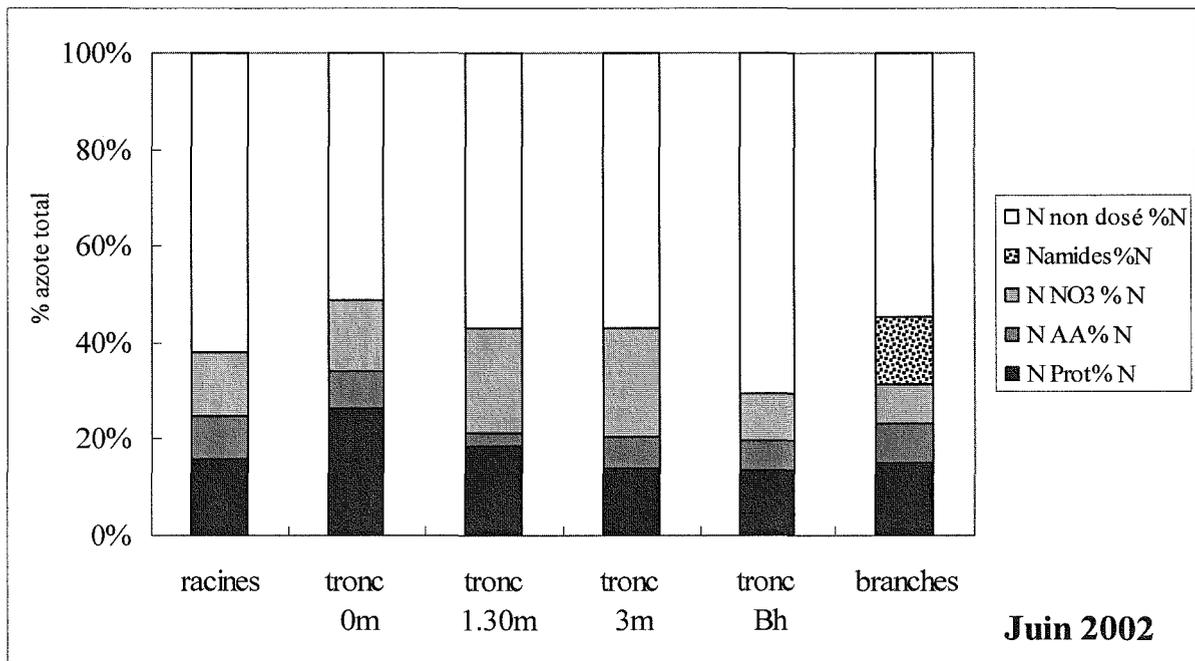


Figure 2.2. Contribution de l'azote des composés dosés : protéines solubles totales (N Prot), acides aminés (N-AA), nitrate (N-NO₃) et amides (N-amides) à l'azote total chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans et récolté en Octobre 2001 et Juin 2002. La différence de : $100 - [\text{somme} (\text{N NO}_3 \% \text{Nt} + \text{N AA} \% \text{Nt} + \text{N Protéines} \% \text{Nt})]$ a été nommée N non dosé (N non dosé). Les valeurs sont exprimées en % de l'azote total et ont été calculées à partir des facteurs de conversion donnés dans le Matériel et méthodes. Bh = base du houppier. L'azote des amides n'a été estimé que dans les branches.

peut observer que les quantités de N-Protéines, de N-AA et de N-NO₃ sont significativement plus faibles au printemps, alors qu'il n'y a pas de différences pour l'azote total. Ces quantités vont nous permettre par la suite de caractériser la quantité de réserves qui seront présentées ci-dessous.

Contribution de l'N dosé à l'azote total (Figure 2.2)

L'N dosé ne représentant qu'une faible part de l'azote total et ayant des effets saisons marqués à l'échelle de l'arbre, nous avons déterminé la contribution des protéines solubles, des acides aminés et nitrate à l'azote total, à partir des quantités en azote de chacun des composés et de l'azote total, dans chacun des organes, et exprimée en pourcentage de l'azote total.

En octobre, cette contribution de l'azote dosé (N-Protéines + N-AA + N NO₃) est comprise entre 60 et 90% de l'azote total (Figure 2.2) avec des variations fortes entre les organes. En revanche, en juin, la contribution des nitrates, acides aminés et protéines solubles à l'azote total (Figure 2.2) est significativement diminuée (de l'ordre de 38% quel que soit l'organe). C'est en particulier la fraction protéique qui diminue très nettement entre les deux dates (Figure 2.2).

A ce jour, les amides (asparagine et glutamine) n'ont pu être analysés en GC MS que dans l'aubier de branches pour les arbres abattus en octobre et en juin (Tableau 2.XIV). C'est la raison pour laquelle ces composés n'ont pas été présentés dans les bilans précédents. Les analyses montrent qu'en octobre, les amides sont 3 fois plus concentrés que les acides aminés dosés. L'asparagine est le plus abondant des deux amides. La concentration en acides aminés et les quantités N-AA dans les branches sont comparables à celles observées (Tableau 2. VII) et les résultats confirment l'absence dans ces organes de différence entre juin et octobre.

Cette analyse montre également que, dans l'aubier des branches, l'azote incorporé dans l'asparagine représente 25% de l'azote total en Octobre et cette contribution est plus faible en juin (14% de l'azote total). De manière intéressante, la quantité d'azote présente sous forme d'asparagine (N-ASN) diminue entre octobre et juin (2,3 et 0,91 g N, respectivement). A l'échelle de cet organe, ceci pourrait correspondre à une forme de réserve azotée non négligeable.

Tableau 2. XIV. Composition des principaux acides aminés et des amides (mg/g MS) dans l'aubier des branches de chêne pédonculé âgé de 20 ans et abattus en Octobre 2001 et Juin 202. Les valeurs représentent les moyennes \pm erreur standard (SE). Quantités (en g N) et contribution à l'azote total (en % N total) de l'N incorporé dans les acides aminés (Total – Amides = N AA) et l'asparagine (N ASN). n = 4.

	Octobre	Juin
<i>Teneurs (mg/gMS)</i>		
Alanine	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
Asparagine	2.96 \pm 0.64	1.32 \pm 0.70
Aspartate	0.37 \pm 0.06	0.41 \pm 0.09
Glutamate	0.44 \pm 0.07	0.56 \pm 0.14
Glutamine	0.04 \pm 0.001	0.05 \pm 0.01
Isoleucine	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
Proline	0.02 \pm 0.001	0.03 \pm 0.01
Sérine	0.11 \pm 0.02	0.09 \pm 0.02
Valine	0.07 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
Total	4.06 \pm 0.73	2.52 \pm 0.80
Total – Amides (= AA)	1.06 \pm 0.16	1.15 \pm 0.26
<i>Quantités (g N)</i>		
N AA	0.50	0.48
N ASN	2.30	0.91
<i>Contribution à l'azote total (% N)</i>		
N AA % N total	5.3	7.3
N ASN % N total	24.7	13.9

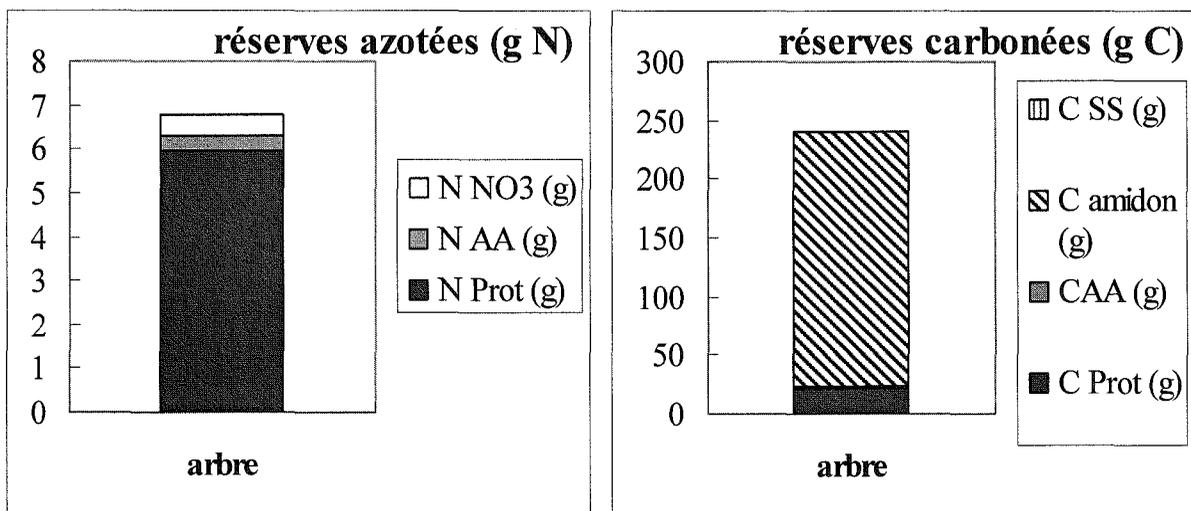


Figure 2.3. Quantités totales (g N) de réserves azotées (différence des quantités entre octobre et juin) sous forme de N-Protéines, N-AA (acides aminés), N-NO3 et quantités (g C) de réserves carbonées (différence des quantités entre octobre et juin) sous forme de C-Protéines, C-AA (acides aminés), C-amidon et C-SS (sucres solubles) dans l'aubier de l'arbre de chêne pédonculé adulte.

Caractérisation et quantification de réserves carbonées et azotées

Comme indiqué précédemment, les quantités de carbone et d'azote incorporées dans les composés sont différentes, dans la plupart des cas, entre organes mais surtout entre les deux dates d'abattage qui correspondent à deux stades phénologiques clés (juste avant chute des feuilles et débourrement). A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que la différence entre les quantités mesurées en Octobre et celles mesurées en Juin pouvaient être considérées comme étant des réserves.

Les quantités totales de réserves carbonées (en g de C) et azotées (en g d'N) ont été représentées dans la figure 2.3, elles ont été déterminées à l'échelle de l'aubier des arbres en tenant en compte les quantités de chaque composant dans chacun des organes. A l'échelle de l'aubier de l'arbre, les réserves carbonées dosées correspondent au total à 238g de C et sont pour 91% sous forme d'amidon (216 g C-Amidon) et pour environ 8 à 9 % sous forme de protéines (21 g C-Protéines). Les sucres solubles et les acides aminés ne sont que faiblement présents puisqu'ils représentent le restant.

Dans l'aubier de l'arbre, les réserves azotées totales dosées correspondent à 7g d'N et sont pour 90% sous forme de protéines (6 g N-Protéines). Les acides aminés et le nitrate ne sont que faiblement présents puisqu'ils représentent les 10% restants.

A ce jour, seuls des échantillons de branches ont été analysés en GC MS. Ces analyses montrent peu de glutamine et une forte teneur en asparagine surtout en octobre. Par contre, on ne retrouve pas de différence dans les acides aminés (Tableau 2. VII) entre juin et octobre, comme c'était le cas lors de la détermination des acides aminés totaux par la technique à la ninhydrine.

Caractérisation et quantification d'une réserve carbonée protéique (VSP)

Les protéines étant le composé azoté le plus abondant dans les réserves azotées et représentant 10% des réserves carbonées, nous avons cherché à caractériser la présence d'une protéine de réserve sur gel d'électrophorèse. Pour cela, des extraits de protéines solubles issus des aubiers des différentes sections de tronc (entre 0 et la base du houppier) et récoltés aux deux dates, ont été déposés sur gel de polyacrylamide et soumis à une électrophorèse en milieu dénaturant en prenant la précaution de mettre une quantité équivalente de protéines.

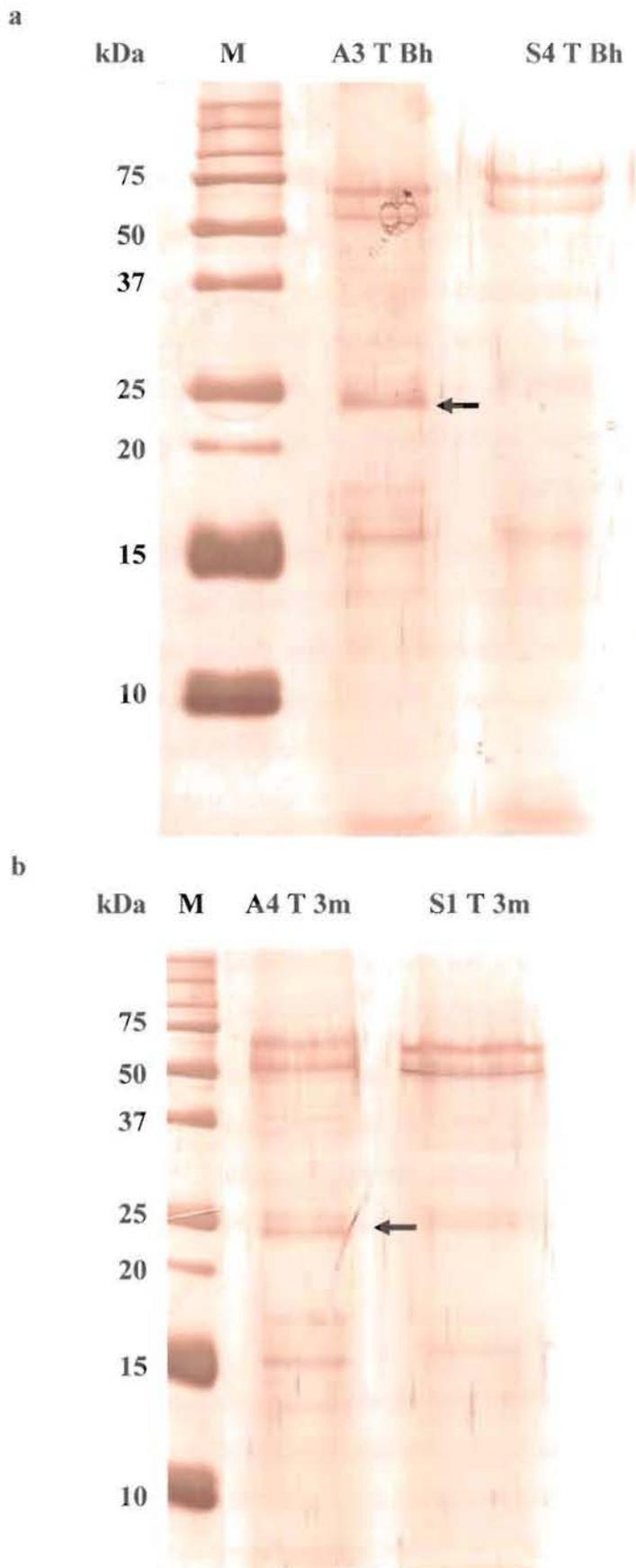
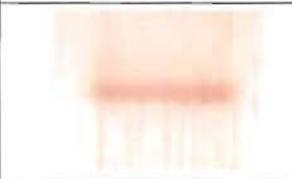
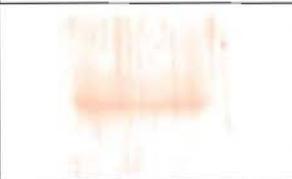
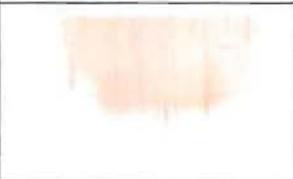


Photo 2.2. Mise en évidence d'une protéine de réserve chez le chêne pédonculé. Electrophorèse en milieu dénaturant d'extraits protéiques d'aubier de tronc, à la base du houppier (T Bh), de chênes pédonculés adultes récoltés en automne (deux arbres différents a : A3, b : A4) et au printemps (deux arbres différents b : S1, a : S4). Les polypeptides ont été révélés au nitrate d'argent. Les chiffres à gauche indiquent la taille des marqueurs moléculaires utilisés. Dans tous les cas, le dépôt de proréines est identique (1.4 μ g).

Les gels obtenus nous permettent de caractériser une VSP de 25kDa (photo 2.2a arbre A3 et 2.2b arbre A4) dans l'aubier des troncs à la base du houppier (photo 2.2a arbre A3) et à 3m du collet (photo 2.2b arbre A4). En effet on peut observer sur la première piste correspondant au prélèvement effectué en automne (A) une bande de 25kDa qui n'apparaît pas pour l'échantillon de printemps (photo 2.2a arbre S4 et 2.2b arbre S1) ce qui correspond à la définition même proposée par Staswick (1994) pour les VSP. Les photos 2.2a et 2.2 b, ayant été réalisées sur des arbres différents, nous confirme la répétitivité de l'existence d'un polypeptide de 25kDa en octobre et de son absence au printemps.

La comparaison de l'épaisseur des bandes à 25kDa, obtenues pour les différentes hauteurs du collet (T0) à la base du houppier (Bh) de deux des arbres abattus en Octobre (A1 et A3) (photo 2.3), révèle un gradient d'intensité. La bande représente en moyenne 46% des protéines solubles totales à la base du houppier puis l'intensité de la bande diminue lorsque que l'on se rapproche du collet de l'arbre (22% des protéines solubles totales).

A1 T Bh	A1 T 3m	A1 T 0m	
			25 kDa
49.1	32.0	20.4	VSP % Prot. Sol.

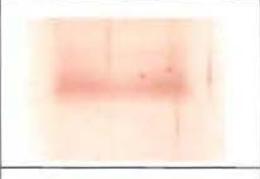
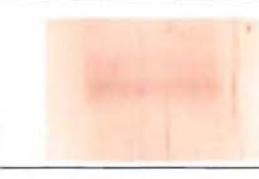
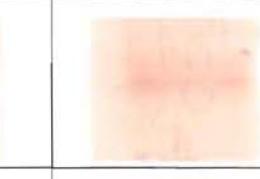
A3 T Bh	A3 T 3m	A3 T 0m	
			25 kDa
42.4	29.9	22.9	VSP % Prot. Sol.

Photo 2.3. Grossissement d'électrophorégrammes au niveau du polypeptide de 25kDa. Comparaison des électrophorèses en milieu dénaturant d'extraits protéiques d'aubier au collet (T 0m), à 3m et à la base du houppier (T Bh) de chênes pédonculés adultes récoltés en automne (deux arbres différents A1 et A3). Les polypeptides ont été révélés au nitrate d'argent. Dans tous les cas, le dépôt de protéines est identique (1.4µg). Les chiffres à droite indiquent la taille du marqueur moléculaire utilisé

Discussion

L'objectif du chapitre était de pouvoir caractériser, chez le chêne pédonculé adulte, la nature et l'importance quantitative de réserves carbonées et azotées, utilisées entre deux dates correspondant à des stades phénologiques clés (juste avant la chute des feuilles et au débourrement). Dans la littérature, l'importance des réserves est généralement présentée sous la forme d'une variation des teneurs (% MS) de certains composés, entre différentes dates. La différence que l'on peut en déduire, permet, dans ce cas, de déterminer la proportion de biomasse investie pour le stockage hivernal. Les biomasses totales des compartiments ayant pu être déterminées, nous avons également caractérisé les quantités de réserves (exprimées en g C et en g N) utilisées entre les deux dates, à l'échelle d'un arbre. Enfin, une première approche de caractérisation de VSP a été entreprise ici.

L'absence de différences pour les caractéristiques dendrométriques et les biomasses d'aubier obtenues pour les différents arbres de l'expérience nous a permis de faire des moyennes entre les différents arbres d'une même date ($n = 4$ par date).

*La composition de la biomasse de l'aubier en carbone total n'est pas différente significativement entre organes et entre dates (Tableau 2.VI et Tableau 2.VIII) et elle correspond à celle donnée dans la littérature (Barbaroux *et al.* 2003). En tenant compte de la biomasse de l'aubier des différents organes (Tableau 2.III), des teneurs en carbone total de l'aubier des différents organes (g/100g MS, Tableau 2.VI), nous avons calculé les quantités de carbone total exprimées en g de carbone.*

Le C total de l'aubier est de 8572g en octobre et de 8482g en Juin (Tableau 2.X). A l'échelle de l'aubier de l'ensemble des parties pérennes, il n'y a donc pas de variation de cette quantité. Ce qui conduirait à supposer que ces tissus pérennes n'ont pas été approvisionnés en carbone récemment assimilé alors qu'en juin, les feuilles étaient déjà présentes. Dans ce cas, la priorité de la distribution des composés carbonés nouvellement assimilés pourrait être vers les puits en croissance, c'est-à-dire les nouvelles feuilles, les nouvelles pousses et les jeunes racines, non inclus dans cette estimation. La quantité de carbone dans les feuilles (en juin) en tenant compte de la biomasse des feuilles a été estimée à 355 ± 36 g de C total.

Tableau 2. XV. Tableau de comparaison des réserves carbonées [sous forme de sucres solubles non structuraux (C-TNC) et de protéines (C-Prot)] présentes dans l'aubier du chêne pédonculé entre Octobre 2001 et Juin 2002 et du chêne sessile entre Octobre 1999 et Juin 2000

Réserves utilisées		C-TNC	C-Prot
Chêne pédonculé (chapitre 2) 20 ans	Quantité totale (g C)	216 94% réserves C dosées	21 5% réserves C dosées
	Biomasse totale aubier arbre (Oct) kg	18,63	18,63
	Concentration (g C /kg arbre)	1,17	0,11
	Proportion de réserves utilisée (% de la quantité en octobre)	29	54
	<i>source</i>	<i>Valenzuela Nunez Chapitre 2</i>	
Chêne sessile (chapitre 1 + Barbaroux 2002) 45 ans	Quantité totale (g C)	2400	75
	Biomasse totale aubier arbre (Oct) kg	156,5	156,5
	Concentration (g C /kg arbre)	1,53	0,05
	Proportion de réserves utilisée (% de la quantité en octobre)	40	14
	<i>source</i>	<i>Barbaroux et al. 2003</i>	<i>Valenzuela Nunez Chapitre 1</i>

Nous devons néanmoins considérer que les données obtenues reflètent plutôt la résultante (à un temps donné) de différents mécanismes :

- 1) mobilisation de C issu de réserves et redistribution vers les organes demandeurs (perte)
- 2) transport de C nouvellement assimilé vers les organes pérennes (gain)

En Octobre (JJ296) c'est-à-dire au moment de la chute des feuilles et donc à une période de stockage maximal de réserves carbonées (Barbaroux *et al* 2003), nous avons montré que *l'amidon représente entre 10 et 20% du carbone total* dans l'aubier des différents organes pérennes d'un chêne pédonculé âgé de 20 ans (Figure 2.1). Dans tous les organes et parmi tous les composés qui ont été dosés, l'amidon est le plus abondant.

La teneur en amidon est de 9% de la matière sèche dans l'aubier des branches et du tronc (Tableau 2. VII), ce qui est du même ordre de grandeur que les valeurs données dans la littérature pour des arbres adultes de chêne sessile (Barbaroux *et al* 2003, Hoch *et al* 2003) et de hêtre (Damesin et Lelarge 2003). La teneur en amidon (23% MS) dans l'aubier des racines est 1,7 fois plus importante que dans les deux autres compartiments (Tableau 2.VII). C'est dans cet organe que le stockage est particulièrement important pour différentes espèces (Lacointe 2001, Ludovici *et al.* 2002).

En Octobre, du fait de la biomasse plus importante du tronc, les quantités de C sous forme d'amidon deviennent comparables entre le tronc et les racines, 390 et 400g de C-Amidon en octobre et en juin, respectivement (Tableau 2.X). Cette accumulation importante d'amidon dans l'aubier des racines et du tronc reflète un stockage équilibré de ce composé évitant l'engorgement d'un puits lors du transport des sucres en vue du remplissage hivernal. De plus, cette accumulation dans l'aubier, qui se ferait plus précisément dans les cellules vivantes à proximité des vaisseaux du xylème (Tromp 1983, Fisher et Höll 1992, Sauter et Van Cleve 1994) aurait l'avantage de permettre un transport rapide au moment de la mobilisation. Il est toutefois important de noter que de l'amidon est également présent dans les cellules vivantes à proximité du phloème dans l'écorce interne (Fisher et Höll 1992). Dans notre cas, l'écorce n'a pas été étudiée.

Alors que le C-Amidon représente 11 et 6% du carbone total en octobre et juin, respectivement, les sucres solubles sont beaucoup moins abondants puisqu'ils représentent moins de 2% du carbone total (Tableau 2. IX) et de la masse de matière sèche (Tableau 2.VI). De faibles teneurs en sucres solubles ont déjà été citées dans la littérature (Barbaroux *et al* 2003, Hoch *et al* 2003) elles résulteraient d'une utilisation rapide de ces composés :

- aussi bien à l'automne pour le stockage directement sous forme d'amidon (dans le cas par exemple des arbres accumulant de l'amidon « starch trees ») ou sous d'autres formes telles que les lipides (« fat-trees ») (Höll, 1997).

- qu'au printemps pour être incorporés dans des molécules organiques nécessaires à la croissance.

La relation entre les quantités de C-Amidon et les quantités de C total réalisée avec les données de tous les organes (Figure 2.4) montre qu'à quantité de C total égale, la quantité de C investie dans l'amidon est significativement plus importante (x 2,2) en octobre qu'en juin.

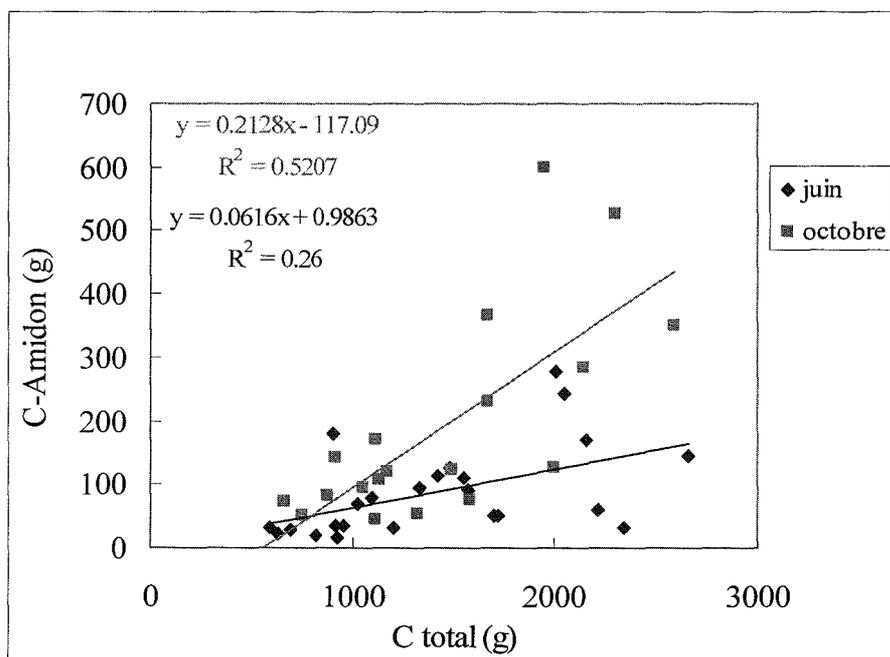


Figure 2.4. Relation entre la quantité de carbone présent sous forme d'amidon en juin (bleu $p = 0,0109$) et en octobre (rose $p = 0,0005$) chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans sans distinction d'organes. Les pentes sont significativement différentes.

En Juin, les quantités d'amidon sont effectivement significativement diminuées à l'échelle de l'arbre, ce qui nous a permis d'évaluer que 216g de C sont utilisés, entre les deux dates, sous forme d'amidon (Figure 2.3 et Tableau 2.XV).

Cette quantité représente 2,5% du carbone total présent en octobre (8572g C) et 1,17% de la biomasse totale d'aubier (Tableau 2.XV). Nous n'avons pas de données de comparaison pour évaluer l'importance de cette dernière estimation. Elle a déjà été réalisée dans le chapitre 1 à partir des données de Barbaroux (2002) et de Barbaroux *et al.* (2003) pour le chêne sessile et les données ont été reportées dans le tableau 2.XV. Il est intéressant de noter que, dans les deux cas, bien que les arbres soient d'espèces et d'âges différents et que les années d'étude et

les dates de prélèvement ne soient pas identiques, le C-Amidon mobilisé correspond, tous organes confondus, à une valeur comparable de 1,2 à 1,5% de la biomasse de l'aubier.

De plus, ce résultat nous permet de dire que le carbone utilisé entre les deux dates sous forme d'amidon représente 29% de la quantité présente en octobre (736g C-Amidon, tableau 2.XI). Ce qui est moins des 40% trouvés chez le chêne sessile (Barbaroux *et al.* 2003). La différence pourrait s'expliquer par l'âge, l'espèce ; mais également par les conditions de sol et les différences climatiques entre les années d'observations qui influent de manière significative sur les coûts de maintenance hivernale et de croissance printanière (Damesin *et al.* 2002, Edwards et Hanson 1996).

Les autres composés carbonés non structuraux dont la contribution a été également envisagée dès notre première étude sont les protéines solubles et les acides aminés de manière à avoir des informations sur leur participation potentielle au stock de carbone.

Les teneurs en protéines solubles totales (en moyenne 0,25% et de 0,13% MS, en Octobre et Juin respectivement) et en acides aminés (en moyenne 0,09% MS) (Tableau 2.VII) sont faibles par rapport à celle de l'amidon.

Les quantités de carbone sous forme protéique (C-Protéines) sont plus faibles que celles du C-Amidon, elles sont de 38 et 17 g C-Protéines en octobre et juin, respectivement ce qui représente 5 à 7% des quantités de C-Amidon.

Alors que le C-Amidon représente 11 et 6% du carbone total en octobre et juin, respectivement, le C-Protéines ne représente que 0,4 et 0,2% du carbone total en octobre et juin, respectivement. Les acides aminés représentent une proportion encore plus faible, de l'ordre de 0,12% du carbone total (Tableau 2.VIII).

La relation entre les quantités de C-Protéines et les quantités de C total réalisée avec les données de tous les organes (Figure 2.5) montre également que le C-Protéines contribue au C total pour une plus grande part en Octobre par rapport à Juin. De plus, cette relation montre à l'inverse de la figure précédente (Figure 2.4), que, quel que soit le stock de carbone total de l'organe, la quantité de C investie dans les protéines solubles reste la même, bien que supérieure en Octobre par rapport à Juin.

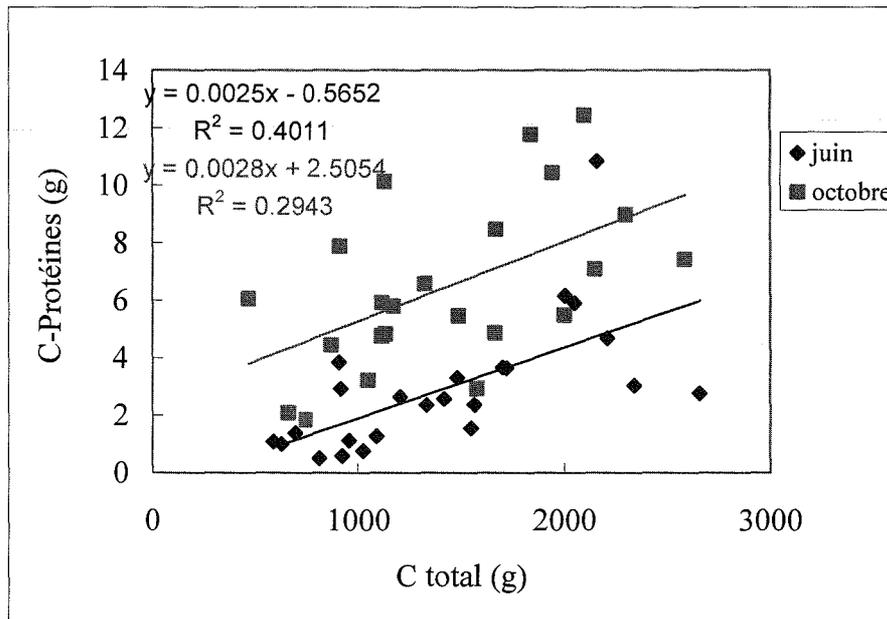


Figure 2.5. Relation entre la quantité de carbone présent sous forme de protéines en juin (bleu $p = 0,0009$) et en octobre (rose $p = 0,0074$) chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans sans distinction d'organes. Les pentes ne sont pas significativement différentes.

En Juin, les quantités de C-Protéines sont significativement diminuées à l'échelle de l'arbre (Tableau 2.XI), ce qui nous a permis d'évaluer que 21g de C sont utilisés, entre les deux dates, sous forme de protéines (Figure 2.3 et Tableau 2.XV) soit 10 fois moins que sous forme d'amidon. Cette quantité utilisée représente 0,24% du carbone total présent en octobre (8572g C) et 0,11% de la biomasse totale d'aubier ce qui est deux fois plus important que ce que nous avons trouvé pour le chêne sessile (Tableau 2.XV).

Par ailleurs, même si la quantité de C-Protéines utilisée entre les deux dates paraît dérisoire par rapport à celle de l'amidon, il est important de signaler que le carbone utilisé entre les deux dates sous forme de protéines représente 54% de la quantité présente en octobre (39g C-Protéines, tableau 2.XI).

Pour résumer, à l'échelle de l'arbre, la quantité de carbone utilisée entre les deux dates représente au total 239g, soit 2,8% du carbone total et 1,3% de la biomasse de l'aubier. L'amidon est de loin le composé le plus abondant et le carbone qu'il contient participe de manière majoritaire à la fraction de carbone utilisée entre les deux dates.

La quantité de carbone sous forme d'amidon est liée à la quantité de carbone total (Figure 2.4) ce qui est une donnée largement répandue dans la littérature et est un moyen de

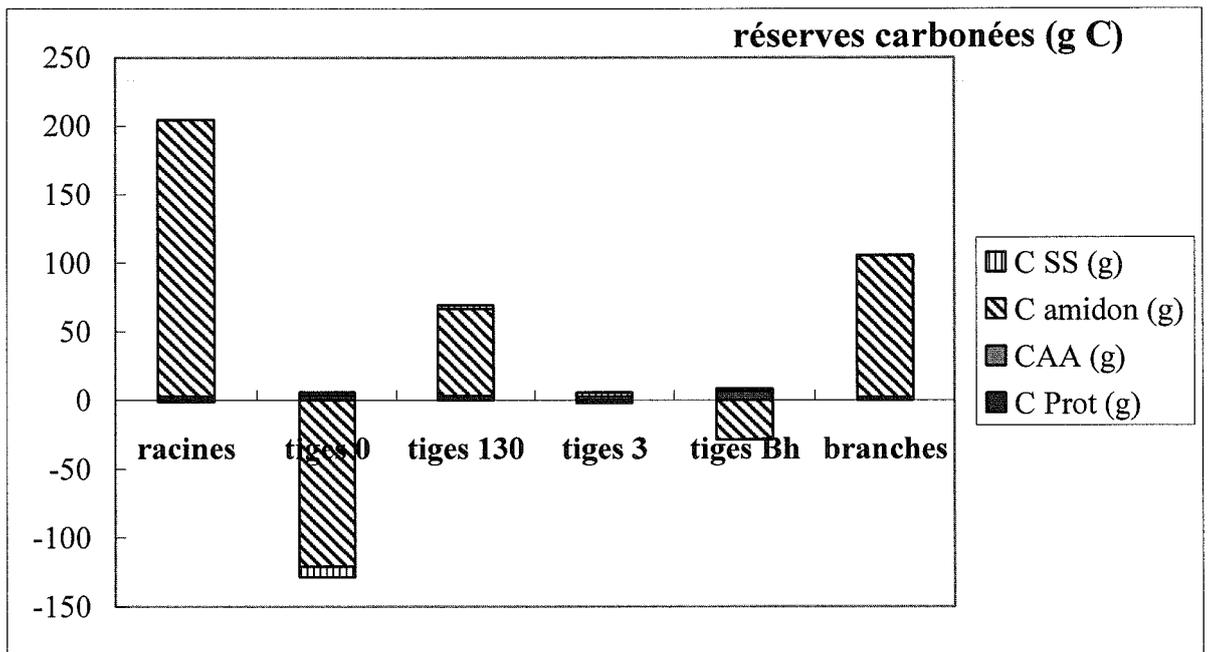


Figure 2.6. Différence des quantités de carbone (g) entre octobre et juin sous forme de Protéines (C-Prot), d'acides aminés (C-AA), d'amidon (C-amidon) et de sucres solubles (C-SS) dans l'aubier de chênes pédonculés adultes (n=4). Les différences positives entre octobre et juin signifient une perte de carbone, les différences négatives entre octobre et juin signifient un gain de carbone. Bh = base du houppier.

stocker efficacement un surplus de carbone, sans risque osmotique comme cela pourrait être le cas d'une accumulation de sucres solubles. Notre travail montre de plus que la relation est différente entre octobre et juin, ce qui rend compte des capacités de stockage entre les deux dates.

Le chêne pédonculé, âgé de 20 ans, a utilisé, entre octobre et juin, seulement 29% de l'amidon présent en octobre et 54% des protéines présentes à cette date. Ces données sont totalement liées aux coûts de maintenance hivernale et de croissance printanière qui ont été nécessaires, entre Octobre 2001 et Juin 2002, dans les arbres étudiés. Les températures hivernales et printanières sont, en effet, connues pour réguler fortement l'hydrolyse de l'amidon (Sauter 1988) et les respirations de maintenance et de croissance (Edwards et Hanson 1996, Damesin *et al* 2002) aussi aurait-il été intéressant de pouvoir estimer, à partir d'une fonction Q10 et des données de températures entre ces deux dates, les coûts réels en carbone nécessaires à la maintenance et à la croissance de manière à indiquer si les quantités de carbone utilisées ont été suffisantes pour assurer ces coûts estimés.

Nous avons caractérisé et quantifié des fractions de carbone utilisées entre deux dates mais nous n'avons pas les moyens:

- d'assurer que ce sont les seuls composés utilisés
- de savoir si ces fractions utilisées sont réellement des « réserves » au sens strict du terme (voir définition de Staswick 1994). Ainsi, nous avons fait le choix d'utiliser ce terme pour qualifier les quantités de composés diminuant entre les dates phénologiques que nous avons choisies. Or, comme indiqué précédemment, nous devons considérer que les données obtenues reflètent plutôt la résultante (à un temps donné) de différents mécanismes :

- 1) mobilisation de C issu de réserves et redistribution vers les organes demandeurs (perte)
- 2) transport de C nouvellement assimilé vers les organes pérennes (gain)

Ceci étant d'autant plus justifiable que les arbres avaient des feuilles à la deuxième date.

Si l'on détermine les fractions utilisées entre octobre et juin, cette fois ci, dans chaque compartiment (Figure 2.6), les résultats sont différents et vont dans le sens de la nécessité de comparer plutôt une résultante des deux points précédents.

Dans la figure 2.6, les différences positives de quantités de carbone entre octobre et juin signifient une perte de carbone et peuvent donc être assimilées à des réserves utilisées entre

les deux dates. Ainsi, des réserves carbonées peuvent être caractérisées sous forme d'amidon dans les racines et dans les branches et sous forme de protéines dans les 3 compartiments avec une prépondérance dans le tronc à la base du houppier.

Par contre, les différences négatives entre octobre et juin, signifient un gain de carbone, ce qui est le cas dans le tronc pour les quantités d'amidon et dans une moindre mesure pour les quantités de sucres solubles. Ainsi, dans l'aubier du tronc, entre les deux dates, on note un gain de C sous forme d'amidon qui serait la résultante d'un apport de C nouvellement assimilé plus important que la mobilisation de leur réserve de carbone, les deux n'étant pas forcément coordonnés dans le temps. A JJ 152, les feuilles étant matures, on peut supposer que les assimilats ont été orientés vers le tronc. On pourrait d'ailleurs supposer que ce surplus de C dans l'aubier du tronc en Juin (JJ 152) reflète la force de puits de la croissance en diamètre du tronc (volume d'aubier le plus important). Cette croissance serait initiée à la base du tronc puisque c'est dans cette zone que la quantité d'amidon augmente le plus. Cela pourrait aussi indiquer que la croissance en diamètre du tronc débute plus tôt que celle des racines et des branches. Pourtant, Lachaud et Bonnemain (1981) ont observé, dans une étude de xylogénèse sur chêne pédonculé âgé de 30 ans, une réactivation cambiale d'ensemble, c'est-à-dire avec simultanément une réactivation dans le tronc et une progression basipète de réactivation dans l'extrémité des branches. Ce type de réactivation cambiale d'ensemble est généralement associé aux espèces à bois à zone poreuse (Zimmermann et Brown, 1971). Les résultats présentés en figure 2.3 reflètent bien la résultante des deux mécanismes et met en évidence la complexité de pouvoir clairement définir les réserves carbonées et azotées, la date de stock maximal et minimal étant elle-même difficile à connaître (en outre très dépendante du climat) et très transitoire. La seule méthode pour résoudre ce problème aurait été de choisir un nombre de dates de prélèvement plus important pour avoir une cinétique fine en relation avec la phénologie de l'arbre. Pour envisager de telle cinétique, il est souhaitable de travailler sur des échantillons non destructifs et de suivre les mêmes individus au cours du temps. A ce stade des connaissances, il n'était pas envisageable de procéder ainsi car (1) la distribution des protéines au sein de l'arbre n'était pas connue, et (2) les procédures biochimiques de dosage ont nécessité des mises au point techniques nécessitant d'importantes quantités de bois. On ne peut que difficilement envisager pour pallier à ce problème de se contenter de la cinétique d'évolution des quantités de réserves carbonées et azotées dans les branches puisque chaque organe semble suivre sa propre cinétique (Figure 2.6).

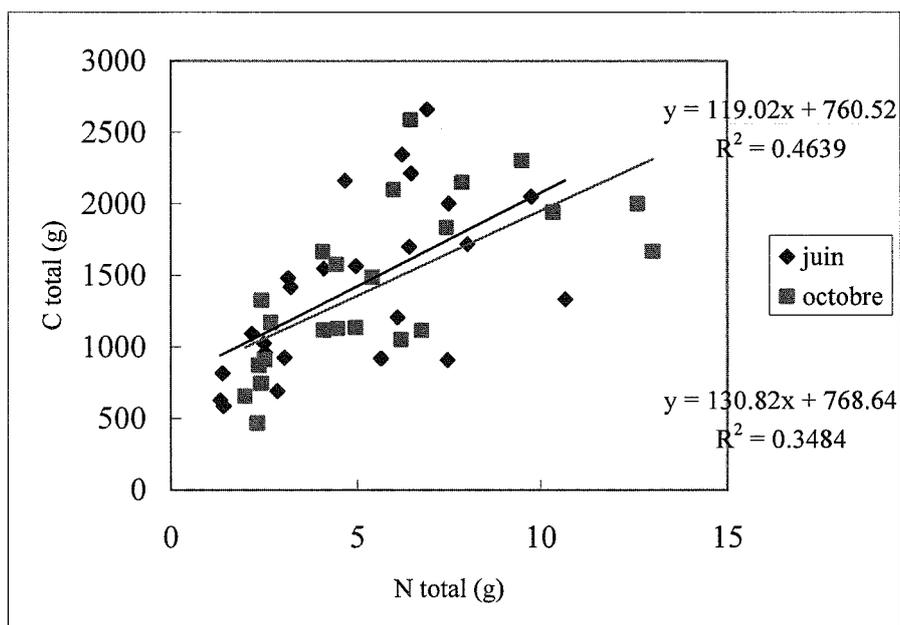


Figure 2.7. Relation entre les quantités de carbone total et d'azote total en juin (bleu $p = 0,0024$) et en octobre (rose $p = 0,0003$) chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans sans distinction d'organes. Les pentes ne sont pas significativement différentes.

Les protéines semblent impliquer quel que soit l'organe dans le processus de réserve. Nous avons cherché à savoir ce que représentait ce stockage en terme d'azote.

La teneur en azote total dans l'aubier (Tableau 2. VI) est faible par rapport à celle du carbone, elle est en moyenne de 0,12 % de la masse de matière sèche, tous organes confondus, que ce soit en Juin ou en Octobre. Cette teneur est plus faible que celle donnée pour les arbres fruitiers fertilisés (0,34% MS en moyenne dans le pommier, d'après Kozlowski *et al.* 1991, jusque 0,9% MS dans le pêcher, d'après Gomez et Faurobert 2002) et elle est également plus faible que celle observée par Barbaroux *et al.* (2003) chez les chênes sessiles âgés de 45 ans provenant d'un site de fertilité comparable (racines 0,42% MS, tronc 0,11% MS, branches 0,60% MS). Les valeurs faibles obtenues pour le chêne pédonculé (20 ans) sont par contre proches de celles observées chez le frêne âgé de 10 ans (Marmann *et al.* 1997) où la teneur en N total est comprise entre 0,1 et 0,2% de la biomasse d'aubier. Cette faible teneur en azote ne s'explique pas par la pauvreté du sol en azote puisque la concentration en azote foliaire, qui en est un bon indicateur, est de 2,3% (Tableau 2. VI). Les analyses foliaires issues de RENECOFOR indiquent d'ailleurs que la région lorraine est à un seuil optimal ou au dessus du seuil critique rencontré dans d'autres régions. La différence entre nos résultats et ceux de Barbaroux *et al.* (2003) pourrait être due au fait que nous avons travaillé uniquement sur l'aubier et non sur des échantillons complets, écorce comprise. En effet, Barbaroux *et al.* (2003) ont mesuré une concentration en azote total de 0,72% MS dans les écorces des troncs, ce qui est bien plus élevé que lorsqu'ils mesurent l'azote total sur l'ensemble du compartiment (0,11% MS).

Ce sont les branches qui ont une teneur en azote total la plus élevée : 0,26% de leur biomasse (Tableau 2.VI) et il n'y a pas de différence entre le tronc et les racines. Chez le frêne, la teneur en azote total des racines est 3 fois plus faible que celle de l'aubier du tronc tout au long de la période de croissance (Marmann *et al.* 1997).

A l'échelle de l'aubier de l'ensemble des parties pérennes, la quantité d'azote total n'est pas significativement différente entre les deux dates. La relation entre quantité de carbone total et quantité d'azote total, tous organes confondus (figure 2.7) n'est pas modifiée, ce qui indique que le rapport C/N est conservé entre les deux dates.

L'azote est stocké sous forme de composés aminés et de protéines. Dans l'aubier des chênes pédonculés étudiés, les protéines solubles totales ont des teneurs de l'ordre 0,26 % MS et les acides aminés 0,10 % MS. En Octobre, l'azote des protéines solubles totales (N-Protéines) représente en moyenne 36% de l'azote total de l'aubier alors que l'azote des acides aminés (N-AA) n'en représente que 6% (Tableau 2. IX). Dans le tronc, l'N protéique représente jusque 50% de l'azote total alors que dans les racines et les branches, il représente des fractions plus faibles, respectivement 30 et 20% de l'azote total (Figure 2.2). L'azote des acides aminés, en octobre, semble correspondre à une fraction plus homogène entre organes mais plus faible que celle de l'N-Protéines puisqu'elle correspond à environ 10% de l'azote total (Figure 2.2).

Il existe encore une controverse pour savoir si les composés aminés ou protéiques sont les plus importants. Les proportions relatives de ces deux familles de composés varient en cours de saison, entre les différents organes et avec la fertilité (Dickson, 1989) et il est difficile de généraliser. Chez des espèces fruitières, dans l'écorce de pommier 90% de l'azote est sous forme protéique (Kang et Titus 1980) par contre, dans l'écorce de pêcher, l'azote protéique ne représente que 20% de l'azote total (Gomez et Faurobert 2002). Pour *Fraxinus excelsior*, Marmann *et al.* (1997) ont montré que les protéines solubles représentent en hiver environ 44% et 19% de l'azote total dans le tronc et les racines de semis de 3 ans cultivés en serre. Chez des arbres de la même espèce, âgés de 10-15 ans et en conditions naturelles, la proportion est conservée.

Dans le cas du chêne pédonculé adulte, la contribution de l'azote protéique et de l'azote des acides aminés à l'azote total varie de manière importante avec la saison (Figure 2.2). L'azote protéique notamment contribue moins à l'azote total en juin puisque les valeurs sont en moyenne de 20% de l'azote total dans chaque organe et de 16% à l'échelle de l'arbre entier (Tableau IX). Cette baisse déjà observée dans la littérature (Marmann *et al.* 1997, Gomez et Faurobert 2002) rend compte de la mobilisation de l'azote issu des protéines solubles. Elle est confirmée par les baisses significatives des teneurs en protéines solubles dans tous les organes (Tableau 2. VII) et par les baisses de quantités (Tableaux 2.XII et 2.XIII). Les produits de la protéolyse (composés aminés) sont soit utilisés directement dans l'organe pour sa propre croissance soit transportés vers les organes en croissance par chargement dans la sève xylémienne en faisant intervenir des transporteurs membranaires (Lalonde 2003). Dans la figure 2.2, il serait intéressant de connaître la composition de l'azote non dosé (N-non dosé).

Cet azote non dosé correspond en octobre à 14% de l'azote total pour le tronc à 3m du collet et jusque 50% pour le tronc à 1,30m du collet à la basse du houppier. Cette proportion augmente en juin puisqu'elle atteint des valeurs comprises entre 51% de l'azote total pour le tronc au collet et 71% pour le tronc à la base du houppier. Dans l'écorce de pêcher, la fraction non dosée (correspondant à l'N total – N-Protéines) représente environ 78% de l'azote total en octobre et 90% en juin.

En octobre, l'azote non dosé peut être soit de nature structurale i.e. protéines insolubles constitutives soit de nature non structurale telles que les amides qui ont été dosés uniquement dans les branches et qui contribuent pour presque 25% à l'azote total, (Tableau 2.XIV), nous ne pouvons pas savoir si ces composés sont plus abondants dans les autres organes.

Les formes de transport de l'azote dans la sève xylémienne des arbres sont l'asparagine, la glutamine, la citrulline et l'arginine (Malaguti *et al* 2001). L'accumulation sous forme d'amides dont l'asparagine est connue depuis de nombreuses années (Taylor 1967, Gaudillère 1997). Asparagine et glutamine ont l'avantage d'être plus riches en azote que les acides aminés puisque leur rapport N/C est de 0,45 contre 0,24 en moyenne pour les autres acides aminés. L'asparagine représente 50% des composés aminés chez le pommier (Malaguti *et al* 2001), alors que la glutamine est majoritaire chez le peuplier (Schneider *et al.* 1994).

En juin, la baisse de la proportion de protéines solubles serait compensée par la prépondérance d'autres composés azotés que nous n'avons pas dosés ou par l'efflux des composés azotés issus de la protéolyse, ce qui augmenterait la contribution des autres composés azotés que nous avons mesurés ; mais dans ce cas, on devrait observer une baisse de la concentration d'azote total dans l'organe, ce qui n'est pas le cas (Tableau 2.VI). Les composés impliqués pourraient être soit de nature structurale et leur présence serait associée à la reprise de croissance soit de nature non structurale telle que les amides que nous n'avons dosés que dans les branches. Dans ces organes, l'azote des amides ne contribue que pour 14% de l'azote total (Tableau 2.XIV) ce qui implique, qu'au moins dans ces organes, d'autres composés azotés sont impliqués. Un dosage de l'azote insoluble aurait pu permettre d'apporter des éléments de réponse.

La protéolyse n'est pas un mécanisme spécifique à la mobilisation des réserves azotées. Elle assure une multitude de fonctions dans la physiologie de la cellule et constitue un mécanisme de régulation essentiel du métabolisme cellulaire (Brouquisse *et al.* 1997). Dans toutes cellules vivantes, les protéines sont soumises à un renouvellement continu et la teneur intracellulaire en une protéine donnée dépend de ses vitesses de synthèse et de dégradation ; la

plupart des protéines ont en effet une durée de vie inférieure à celle de la cellule. Un dosage de protéines donne donc une indication sur une teneur à un instant donné qui masque toutes fluctuations se déroulant au sein du pool dosé.

Entre octobre et juin, 7 g d'azote ont été utilisés dans l'aubier des parties pérennes de l'arbre sous la forme de protéines (Figure 2.3). Comme indiqué pour la fraction de carbone utilisée, nous n'avons pas les moyens:

- d'assurer que ce sont les seuls composés utilisés
- de savoir si ces fractions utilisées sont réellement des réserves

Nous avons déterminé les fractions utilisées dans chaque compartiment, entre octobre et juin (Figure 2.9), les différences positives d'azote entre octobre et juin signifient une perte et sont donc qualifiées de réserves. Dans les branches, les amides correspondent à la forme principale des réserves azotées dosées (58%), les protéines ne représentant que 29%. Dans les autres compartiments, n'ayant pas dosé les amides, nous pouvons dire que les réserves azotées dosées sont constituées majoritairement de protéines.

La baisse de la proportion de l'N Protéique dans l'azote total entre octobre et juin rend probablement compte de la mobilisation d'azote issu de la protéolyse de seulement certaines des protéines solubles que nous avons dosées. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à savoir si des protéines de réserve (VSP) pouvaient être impliquées. Si tel était le cas, la protéolyse impliquant la mise en œuvre de protéases et les VSP étant préférentiellement dégradées, des caractéristiques structurales devraient permettre leur reconnaissance par les systèmes protéolytiques (Gaudillère 1997).

Les gels obtenus nous permettent de caractériser une VSP de 25kDa dans l'aubier du tronc (photos 2 et 3). En effet, on peut observer sur la première piste correspondant au prélèvement effectué en automne (photo 2a arbre A3 et 2b arbre A4) une bande de 25kDa qui n'apparaît pas pour l'échantillon de printemps (photo 2a arbre S4 et 2b arbre S1), ce qui correspond à la définition même des VSP proposée par Staswick (1994).

La comparaison des bandes à 25kDa obtenues pour les différentes hauteurs du collet (T0) à la base du houppier (Bh) de deux des arbres abattus en Octobre (A1 et A3) (photo 2.4) révèle un gradient d'intensité. Le polypeptide de 25kDa représente en moyenne 46% des protéines

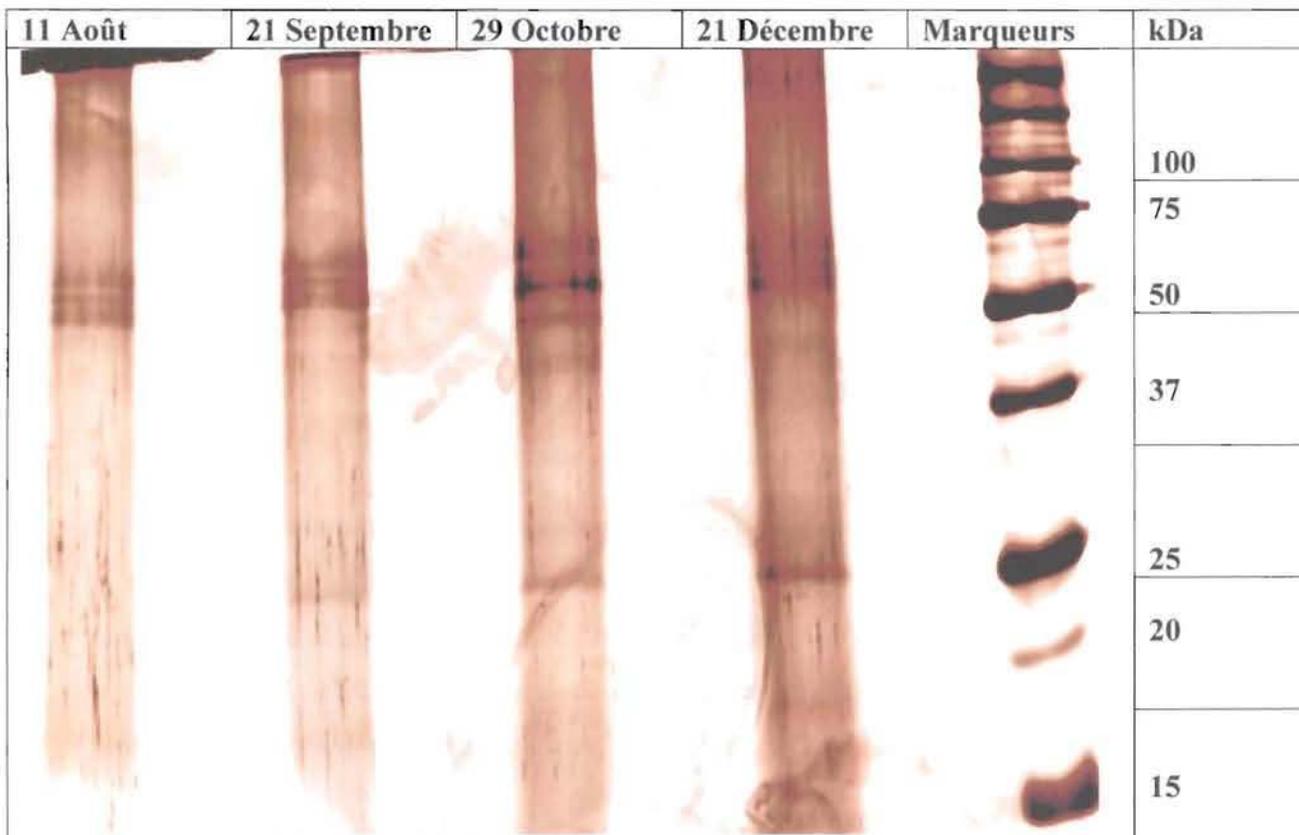


Photo 2.5 Electrophorèse en milieu dénaturant d'extraits protéiques de cernes 1998 d'aubier de chêne sessile adulte en fonction de la date de prélèvement. Les polypeptides ont été révélés au nitrate d'argent. Les chiffres à droite indiquent la taille des marqueurs moléculaires utilisés.



Photo 2.6. Grossissement de l'électrophorèse précédente au niveau du polypeptide de 25kDa. Electrophorèse en milieu dénaturant d'extraits protéiques de cernes 1998 d'aubier de chêne sessile adulte en fonction de la date de prélèvement. Les polypeptides ont été révélés au nitrate d'argent. Les chiffres à droite indiquent la taille des marqueurs moléculaires utilisés.

solubles totales à la base du houppier puis l'intensité de la bande diminue lorsque que l'on se rapproche du collet de l'arbre (22% des protéines solubles totales).

Dans la littérature, les protéines de réserve peuvent représenter plus de 50% des protéines solubles totales chez *Gingko biloba* (Shim et Titus 1985) et le pommier *Malus domestica* (Titus, 1989), plus de 70% des protéines solubles chez le peuplier (Sauter *et al.*, 1988) et seulement 7 à 22% des protéines totales d'une branche de pêcher (Gomez et Faurobert 2002). Les profils électrophorétiques présentent, par ailleurs, une très grande diversité et révèlent une hétérogénéité de masse moléculaire. On observe ainsi un polypeptide majeur de 40 kDa dans l'écorce du *Gingko biloba* (Shim et Titus 1985) et deux polypeptides de plus petite taille (16,5 et 19 kDa) chez le pêcher (Gomez et Faurobert 2002). Chez le peuplier, les VSP des cellules du parenchyme proche du xylème, ont une taille de 15 à 45 kDa (Stepien *et al.*, 1994) et dans l'écorce, les 2 BSP (Bark Storage Protein) ont une taille de 32 et 36 kDa (Coleman *et al.* 1993). La masse molaire des BSP de *Populus euramericana* a été estimée entre 110 et 230 kDa par électrophorèse en conditions non dénaturantes (Stepien et Martin 1992).

Les photos 2.5 et 2.6 correspondent à électrophorégrammes obtenus pour les cernes 1998 d'un chêne sessile (45 ans) carotté en Août, Septembre, Octobre et Décembre 1999. Sur chaque profil, on distingue de multiples bandes représentant les protéines révélées au nitrate d'argent. On peut noter toutefois clairement la présence d'une bande à 25 kDa qui apparaît à partir du 21 septembre et dont l'intensité augmente jusqu'au mois de décembre (voir grossissement photo 3). Cette expérience montre clairement la cinétique d'apparition du polypeptide, rendant compte de sa synthèse en fin de saison, probablement liée à un début de mobilisation de l'azote foliaire. Par ailleurs, le polypeptide serait de même taille que celui présent dans l'aubier du chêne pédonculé (20 ans). L'augmentation de la présence de la protéine entre le 29 octobre et le 21 décembre pourrait en partie être consécutive à une période de gel dans le tronc et sous écorce avec une température négative à partir de 15 novembre 1998. Ces températures ont atteint des minimum autour de -11°C. Il a été observé conjointement à cette période une hydrolyse de l'amidon en sucres solubles (Barbaroux et Bréda, 1994). L'augmentation de la teneur en protéine de réserve pourrait elle aussi contribuer à la résistance au froid de l'arbre.

Coleman *et al.* (1992, 1993) ont montré que la dégradation de la BSP et la remobilisation d'azote seraient liées à la demande des puits (croissance active des bourgeons). En héméropériode longue, les feuilles matures sont des sources, les feuilles en croissance et les apex sont des puits importants pour l'azote, les BSP stockées dans l'écorce sont alors

fortement mobilisées. Van Cleve et Apel (1993) ont alors suggéré que l'héméropériode pourrait réguler la synthèse de BSP indirectement en induisant le début de la sénescence foliaire. Selon ces auteurs, l'augmentation des pools d'acides aminés libres, résultant de la protéolyse foliaire, serait plus directement responsable de la synthèse de VSP. Un traitement en jour court accélère l'entrée en dormance des bourgeons du peuplier et modifie donc les relations source-puits en provoquant une inhibition de la croissance et une baisse de la demande en azote (Arora *et al.*, 1992). Cependant, Coleman *et al.* (1993) ont montré que ce sont les jours courts qui induisent spécifiquement la synthèse de BSP et non la diminution de la demande due à un arrêt de végétation. Le stockage et la remobilisation de l'azote chez le peuplier sont donc déclenchés soit par des signaux externes comme la longueur du jour, soit par des signaux internes liés à l'état des relations source-puits (Gaudillère, 1997).

L'écorce a été montrée comme particulièrement riche en protéines solubles et plus particulièrement en VSP (appelées dans ce cas BSP pour bark storage proteins) chez des espèces fruitières (Kennedy et Titus, 1979, Gomez et Faurobert 2002), chez le peuplier (Stepien *et al.* 1994) et chez certaines espèces forestières (Wetzel et Greenwood 1991, Marmann *et al.* 1997). Dans les branches de pêcher, même si l'écorce (parenchyme cortical et phloème) est plus concentrée en protéines (jusque 5% MS), du fait de la biomasse, le bois contient des quantités de protéines plus importantes (Gomez et Faurobert 2002). La concentration plus importante serait liée à la présence de plus de corps protéiques dans l'écorce (Stepien *et al.* 1994). Chez le peuplier, par contre, il ne semble pas y avoir de spécificité tissulaire aussi marquée dans la tige (Stepien 1992). Elles sont concentrées autant dans le parenchyme de l'écorce, du phloème, des rayons ligneux ainsi que dans la zone cambiale chez le saule (Wetzel et Greenwood 1991) et le peuplier (Stepien 1992). Leur distribution est généralement à proximité immédiate du système vasculaire. Si leur accumulation est importante au niveau de l'écorce interne, le transport des VSP ou de leurs produits d'hydrolyse en direction des vaisseaux pourrait se faire via des plasmodesmes montrés comme particulièrement nombreux dans les cellules corticales (Stepien *et al.* 1991).

Dans notre travail, il nous a été impossible de travailler sur l'écorce de chêne adulte du fait de sa trop grande richesse en tannins qui interfèrent dans le dosage des protéines et des acides aminés et qui, par ailleurs, rendent les électrophorèses difficilement exploitables, bien que nous ayons pris la précaution de prendre un milieu d'extraction enrichi en différents protecteurs type PEG et PVP (Loomis, 1974, Pitel et Cheliak 1986). A ce jour, nous ne pouvons pas dire si des VSP sont également présentes dans l'écorce des chênes pédonculés.

Certaines VSP ont été caractérisées comme étant des lectines ou glycoprotéines. En effet, la présence de groupements glycosylés a été démontrée dans les protéines de l'écorce du pommier (O'Kennedy et Titus, 1979) et chez le peuplier (Stepien *et al.* 1994). La composition en sucre est mal connue, il s'agirait de glycane N-liés c'est à dire que les sucres sont ancrés sur l'azote du groupement amide de l'asparagine. Le sucre qui se lie à l'asparagine est le N-acetylglucosamine (GlcNAc), la glycosylation se fait dans le lumen du réticulum endoplasmique (Alberts *et al.* 2002). Ces chaînes oligosaccharidiques peuvent représenter 10 à 22% de sucres présents dans l'écorce de peuplier (Stepien *et al.* 1994), elles conféreraient à ces protéines une meilleure thermostabilité pendant l'hiver et permettraient d'accroître également la quantité de carbone stocké (Ourry *et al.* 2001). Leur présence peut être montrée indirectement par déglycosylation à l'aide d'une enzyme hydrolytique spécifique (Stepien 1992).

Le rôle physiologique des VSP n'est pas totalement identifié. Gomez et Faurobert (2002) ont montré chez le pêcher que les VSP ne fournissent que 5% de l'azote remobilisé au printemps pour la reprise de la croissance. Leur remobilisation est cependant précoce, ce qui suggère un rôle dans l'initiation de la reprise de croissance (Gomez et Faurobert 2002).

La présence d'un polypeptide de 25kDa dans l'aubier de chêne pédonculé est particulièrement intéressante car, comme indiqué dans l'introduction, très peu de VSP ont à ce jour été caractérisées chez des espèces forestières. Ce résultat est nouveau : Wetzell et Greenwood, en 1991, n'avaient d'ailleurs pas trouvé de VSP chez le chêne rouge (*Quercus rubra*). La mise en évidence de cette VSP est probablement liée à la présence du composé réducteur ajouté dans les milieux d'extraction et de dénaturation, à une concentration supérieure à celle utilisée normalement (DTT 0,2 M). En effet, en l'absence de DTT, cette bande n'apparaît pas. Un composé réducteur, tel que le DTT ou le β mercaptoéthanol, est connu pour rompre les ponts disulfures entre les différentes sous unités d'une protéine et donc pour libérer des polypeptides migrant en fonction de leur taille propre sur un gel d'électrophorèse. Il se pourrait donc qu'une des premières propriétés que nous ayons mise en évidence soit l'existence d'une structure polymérique riche en ponts disulfures et probablement en cystéine. Dans la littérature, une protéine de réserve dans les graines de céréales ayant ces propriétés a été montrée comme étant une endoprotéase (Callis 1995). Les protéases à cystéine sont localisées dans les vacuoles (VPE vacuolar processing enzymes,) et coexistent donc avec les protéines de réserves. Celles-ci seraient protégées d'une protéolyse par une conformation particulière qui disparaîtrait au moment de la germination (Schaller 2004).

La mise en évidence de cette VSP dans le tronc de chêne ouvre donc de nombreuses perspectives (obtention d'anticorps pour quantification, localisation, caractérisation de la protéine et des gènes impliqués dans sa synthèse, régulation de sa synthèse, propriétés physico-chimiques).

Le travail entrepris pour ce chapitre avait pour objectif de contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le processus de mise en réserve de composés carbonés et azotés chez le chêne pédonculé. D'une manière générale, les techniques utilisées peuvent, à l'heure de la « métabolomique » et « protéomique », paraître un peu trop classiques, elles ont cependant permis de faire un bon état des lieux et d'envisager de nombreuses perspectives. Du fait de l'abondance de composés contaminants dans les organes de chêne, nous avons procédé à de très nombreux essais avant de parvenir à des résultats exploitables et ceci dans le cas de chacun des dosages biochimiques utilisés. L'utilisation de standards internes nous a permis de vérifier que nos techniques étaient fiables.

Outre les différentes recherches qu'il faudrait à présent entreprendre pour mieux caractériser les VSP, le séquençage au moins partiel du polypeptide de 25 kDa, que nous avons identifié comme étant une VSP, nous permettrait de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine. Ces outils nous permettraient de réaliser une localisation tissulaire de cette VSP.

Le clonage et séquençage du polypeptide serait aussi à la base de l'étude du niveau d'expression du gène codant pour cette VSP: en fonction de la saison, des organes et des espèces. Ceci s'inscrit dans un thème de recherche développé au laboratoire qui tend à chercher un marqueur efficace de reprise de la croissance chez le chêne. Depuis plusieurs années, une chenille processionnaire (*Thaumetopoea rocessionea*) provoque localement des défoliations du chêne dans les forêts de Moselle et Meurthe-et-Moselle créant d'importants dégâts. Si la formation de nouvelles feuilles en remplacement des feuilles perdues est impossible la même année en cas de défoliation tardive, les réserves carbonées et azotées ne pourront se reconstituer à leur niveau habituel avant l'hiver, ce qui peut s'avérer pénalisant, à la fois pour la survie hivernale et la nouvelle croissance au printemps. Le phénomène peut aller en s'aggravant si les chenilles sont présentes plusieurs années. Un des soucis des exploitants forestiers est de pouvoir repérer à l'automne (période d'abattage des arbres) les arbres morts. Ils ont donc besoin d'un marqueur qui leur permettrait de faire cette distinction chez le chêne.

**Effets de l'ombrage et d'une défoliation estivale
sur la croissance et le statut carboné et azoté
en fin de période hivernale
et sur l'absorption d'azote
lors de la croissance printanière suivante
chez de chêne sessile (*Quercus petraea* L.)
et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.)
au stade juvénile**

Les espèces pérennes sont caractérisées par une croissance cyclique et pluriannuelle. Il a été largement démontré que, dans les arbres à feuilles caduques, le bois et les racines sont des réservoirs importants pour le carbone (C) et l'azote (N) (Dickson, 1989). Le carbone (C) et l'azote (N) assimilés sont répartis au sein de la plante selon la force de puits de ses différents compartiments sous forme de réserves azotées (acides aminés, protéines) ou carbonées (glucides, amidon, lipides). Le stockage des réserves est une des fonctions majeures des plantes au même titre que l'acquisition, le transport, la croissance, la défense et la reproduction (Chapin *et al* 1990) et constitue un mécanisme adaptatif qui assure le caractère pérenne des plantes ligneuses face à un environnement aux conditions variables. Les arbres doivent régulièrement faire face à divers stress biotiques et abiotiques, et cela indique qu'une partie de réserves va être consommée. Si une attaque par un pathogène ou des insectes affaiblit la plante et affecte son fonctionnement, une partie des réserves peut être mobilisée pour la synthèse de composés de défense et pour maintenir le métabolisme. Les réserves stockées dans le restant de l'arbre lui permettent de reformer le feuillage (Vanderklein et Reich 2000, Cherbury *et al*, 2001), de survivre à des défoliations dans la même saison (Hoch *et al* 2003) d'assurer le développement, la formation des nouveaux tissus, et une augmentation de la biomasse, aspect important du point de vue économique pour l'exploitation des forêts.

Dans ce contexte, l'élaboration des réserves, à partir de la photosynthèse, est un aspect fondamental pour les arbres qui dépend de la disponibilité des éléments de base et des facteurs de l'environnement. Le facteur de l'environnement le plus important pour la photosynthèse est la disponibilité en lumière, qui est indispensable à l'existence et à la croissance des végétaux qui ne peuvent se reproduire et croître qu'en présence d'une quantité suffisante de lumière. L'existence des microclimats forestiers est un phénomène connu depuis longtemps. Les facteurs écologiques (lumière, température, disponibilité en eau, sol, vent, etc. ...) sont des éléments essentiels dans les processus d'élaboration des réserves et des autres produits par la photosynthèse (ONF-Bulletin Technique 1997). Cette variabilité de la disponibilité des facteurs écologiques, en particulier dans le cas de la lumière, a favorisé l'adaptation de différentes espèces à survivre en conditions de faible disponibilité en lumière (« tolérance à l'ombrage ») comme le hêtre (*Fagus sylvatica*) sans pour autant dépérir à la pleine lumière. Les espèces nommées « essences de lumière » comme la plupart des chênes (y compris le chêne sessile *Quercus petraea*) préfèrent croître en pleine lumière. Le caractère d'essence

d'ombre ou de lumière est très marqué à l'état juvénile des arbres, puis s'estompe avec l'âge (ONF-Bulletin Technique 1997).

Les arbres jeunes, en forêt naturelle, sont rarement placés dans des conditions de développement optimal parce que certains facteurs écologiques comme la lumière peuvent être limitants. En plus, les jeunes arbres doivent faire face aux facteurs biotiques présents, et à l'attaque ou la perte des feuilles (défoliation), par exemple, causée par des maladies ou des insectes. Ces attaques foliaires vont se traduire par une diminution de la photosynthèse (Thomas *et al* 2002, Nykänen et Koricheva 2004), pénalisant la croissance (Gerhardt 1998), et le transport des réserves (Nykänen et Koricheva 2004). Ces changements affectent la croissance cambiale et par conséquent, la croissance des racines (Kramer et Kozlowski 1979, Thomas *et al* 2002), ainsi que la croissance et le développement des branches (Karlson et Weih 2003, Henriksson *et al* 1999). Il existent des différences marquées selon les espèces dans les réponses physiologiques à la défoliation. Les feuillus et les conifères, comme par exemple *Fagus sylvatica* et *Abies*, ne répondent pas de la même façon à la défoliation (Ayles *et al* 2004), et les feuillus résistent généralement mieux à la défoliation que les conifères (Kramer et Kozlowski 1979). Les gymnospermes à feuilles caduques survivent à une défoliation sévère, probablement parce que le feuillage détruit est rapidement remplacé par de nouvelles pousses (Nykänen et Koricheva 2004), mais aussi par leur capacité de stockage de l'azote (Millard *et al* 2001).

Il est connu depuis longtemps que l'azote de réserve chez les arbres provient d'une reprise de l'assimilation en fin d'année mais aussi et surtout de la remobilisation de l'azote des feuilles sénescentes (Taylor 1967). Grossièrement, on peut considérer que la quantité d'azote gagnée par les organes pérennes correspond à celle perdue par les feuilles avant leur abscission (Bollmark *et al.*, 1999). Les arbres possèdent donc un système de recyclage permettant de conserver l'azote qui, le cas échéant serait perdu lors de la chute des feuilles avant l'hiver (Titus et Kang 1982). Au printemps, l'azote utilisé par les arbres pour leur croissance provient plus des réserves accumulées l'année passée que de l'assimilation du sol, l'assimilation s'avérant faible et la fertilisation quand elle existe, quasi inopérante à cette période de l'année (Millard 1994, Vizoso 2004).

L'existence d'un cycle interne de l'azote alternant stockage et remobilisation de l'azote, joue un rôle important dans le métabolisme, l'assimilation de carbone par le feuillage et la

croissance saisonnière des arbres (Millard 1996). Les feuilles, en tant que réservoirs importants d'azote, et en tant qu'organes assimilateurs de carbone sont des organes vitaux pour l'arbre. Leur perte par défoliation avant la fin de la croissance saisonnière est susceptible de créer des carences en carbone et en azote et de diminuer le stock de réserves nécessaires pour survivre l'hiver et reconstituer le feuillage au printemps suivant. Cependant, si les conditions climatiques le permettent et si la défoliation n'est pas trop avancée dans la saison, les arbres peuvent reconstituer le feuillage perdu en puisant dans leurs réserves, puis reconstituer leur stock de réserves comme observé par exemple chez *Quercus suber* (Cerasoli *et al.* 2004).

Comprendre les relations qui existent entre la forêt et son environnement et faire le lien avec les dépérissements observés en forêt, passe par la connaissance de tels processus physiologiques. Ce type d'étude est aussi très important pour la gestion sylvicole de jeunes plants forestiers particulièrement sensibles aux stress biotiques et abiotiques (reforestation artificielle et naturelle). Dans la présente étude, nous avons cherché à tester l'hypothèse selon laquelle la réduction de la surface foliaire par défoliation manuelle, combinée ou non à une réduction du rayonnement incident par ombrage, (1) modifie et réduit la capacité de stockage des réserves et (2) peut augmenter la contribution de l'absorption minérale à la fourniture d'azote pour la croissance printanière. En effet, un marquage isotopique stable ^{15}N a été réalisé au printemps de manière à nous permettre de distinguer l'azote absorbé au moment de la reprise de la croissance de celui alloué avant l'hiver aux réserves azotées.

Les deux espèces forestières retenues pour notre étude sont une essence d'ombre (*Fagus sylvatica*) et une essence de lumière (*Quercus petraea*). Des différences entre traitements (ombrage, défoliation) et interspécifiques (hêtre, chêne sessile) ont été recherchées.

Matériels et méthodes

Origine des plants et conditions de croissance

Cinq cent glands de chêne sessile (*Quercus petraea*) récoltés par le laboratoire d'Ecophysiologie forestière de l'INRA Champenoux en forêt de Compiègne et cinq cents fâines de hêtre (*Fagus sylvatica*) fournies par Vilmorin (origine Est de la France) ont été plantés au printemps (mai 2003) sur un mélange tourbe + sable (1:1) dans des pots en plastique de 4L. Les pots ont été répartis en pépinière (INRA, Champenoux) : 50% en

conditions de pleine éclaircissement et 50% en conditions d'ombre (44% de la lumière incidente) pour chaque espèce.

Les plants ont été cultivés dans ces conditions pendant toute leur première année de croissance. A la fin de la deuxième année de croissance (octobre 2004), les plants ont été repotés dans des pots en plastique de 7L sur un mélange tourbe + sable (1:1).

Après la première année de croissance, une défoliation de 70% du nombre total de feuilles a été faite en été (juillet 2004) sur 50% des plants de chaque espèce et par condition d'éclaircissement. La surface foliaire prélevée a été mesurée. On a, ainsi, quatre traitements par espèce.

- E ND = Pleine lumière et pas de défoliation
- O ND = Ombrage et pas de défoliation
- E D = Pleine lumière avec défoliation.
- O D = Ombrage avec défoliation.

Prélèvement des plants et suivi phénologique

Six campagnes de prélèvement ont été menées à six stades physiologiques différents (Figure 3.1) :

- (1) Le premier prélèvement a été effectué pendant la phase de *chute des feuilles* du 28 octobre au 4 novembre 2004 (jour julien 302 à 309) = « Novembre »
- (2) Le deuxième prélèvement a eu lieu pendant la phase de *repos hivernal* du 21 au 28 janvier 2005 (jour julien 21 à 28) = « Janvier »
- (3) Le troisième prélèvement a été fait au stade de *gonflement des bourgeons hivernaux* du 25 au 29 avril 2005 (jour julien 115 à 119) pour le chêne, et du 28 avril au 2 mai 2005 pour le hêtre (jour julien 118 à 122). Le marquage des plants de chêne et de hêtre au ¹⁵N débute alors = « Avril »
- (4) Le quatrième prélèvement a été fait à *dix jours après le débourrement* (6 au 10 mai 2005 (jour julien 126 à 130) pour le chêne et du 10 au 13 mai 2005 (jour julien 130 à 133) pour le hêtre et correspond au premier prélèvement des plants marqués.
- (5) Le cinquième prélèvement a été fait à *vingt jours après le débourrement* (16 au 20 mai 2005 (jour julien 136 au 140) pour le chêne et du 19 au 23 mai 2005 (jour julien 139 à 143) pour le hêtre

(6) Le dernier prélèvement des plants a été fait *trente jours après le débourrement*, soit du 26 au 30 mai 2005 (jour julien 146 à 150) pour le chêne, et du 30 mai au 3 juin 2005 (jour julien 150 à 154) pour le hêtre. Le marquage des plants de chêne et de hêtre au ^{15}N prend fin.

Cinq plants de chaque espèce, par condition (défoliée ou non défoliée) et par traitement lumineux (ombre, plein éclaircissement) ont été prélevés aux trois premières dates : en novembre, janvier, et avril (30 jours après le débourrement), soit 40 plants au total pour chaque date, et cinq plants marqués et deux témoins (non marqués) pour les trois dernières dates (10, 20 et 30 jours après le débourrement) soit 40 plants marqués et 16 plants témoins.

Protocole de marquage au ^{15}N

L'ensemble des plants de chaque espèce, et pour chaque traitement et condition, a été arrosé deux fois par semaine à l'aide d'une solution nutritive complète (Le Blevenec 1986, Annexe 1), non marquée pour les plants témoins, et marquée à 2% (^{15}N atomes) pour le reste des plants ($^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, poudre à 100% atome ^{15}N , > 99% ^{15}N ammonium nitrate ; Spectra Stable Isotopes. Columbia, M. D.; USA).

Les arrosages ont commencé dès le débourrement en 2005 et se sont prolongés jusqu'à l'étalement complet du feuillage pour chacune des deux espèces. Lors de chaque arrosage, le plant (témoin, marqué) a été arrosé à la capacité au champ avec 700 mL de solution nutritive. La période de marquage a duré 1 mois à partir du 25 avril 2005 (jour julien 115). Les pots ont été placés sur des soucoupes et emballés dans un sac plastique étanche pour éviter que l'eau de pluie ne pénètre et dilue la solution de marquage ou qu'il y ait à l'inverse une fuite du marqueur vers l'extérieur. Des ouvertures latérales ont été pratiquées pour éviter un confinement excessif du système racinaire.

Prélèvements et échantillonnage des plants

Au moment du prélèvement, les plants ont été bien nettoyés, pour cela on les a débarrassés du substrat des pots. Les racines ont été lavées soigneusement afin d'éliminer le substrat (et toute trace de solution nutritive, marquée ou non). Après le nettoyage, les mesures de croissance ont été faites : diamètre, hauteur, nombre des feuilles et surface foliaire. La surface foliaire a été mesurée à l'aide d'un planimètre à tapis roulants (Li – 3000A Portable Area Meter® LI-3050A® Transparent Belt Conveyer Li-Cor®). Les plants ont ensuite été découpés par compartiment (racines fines de diamètre inférieur à 2 mm, grosses racines de diamètre

supérieur à 2 mm, pivot, tiges, pousses de l'année et feuilles si présentes au moment du prélèvement).

A l'aide d'un sécheur, tous les échantillons ont été coupés en petits morceaux et mis dans des sachets de papier aluminium perforé. Ensuite, tous les échantillons ont été plongés dans l'azote liquide avec précaution. Le papier aluminium perforé permet la pénétration de l'azote dans les sachets.

Les échantillons ont été conservés au congélateur à -80°C (-86C Freezer® Forma Scientific®, Ohio, USA) pendant 24 heures avant de les lyophiliser (Dura-Top®, Dura-Dry® FTS Systems®, NY, USA). La lyophilisation permet d'évaporer la totalité de l'eau par sublimation pour éviter la formation des substances qui peuvent dégrader les composés cellulaires. Pour les échantillons de diamètre supérieur à 1 cm comme les tiges, la durée de lyophilisation minimale est d'une semaine.

Une fois la lyophilisation terminée, les échantillons ont été conservés dans des sacs plastiques hermétiques afin d'éviter la reprise d'humidité. Le broyage des échantillons a été réalisé à l'aide d'un broyeur à anneaux (CEPI SODEMI® CB2200, France) et la poudre obtenue a été mise dans des piluliers stériles, pour son analyse biochimique et/ou isotopique ultérieure.

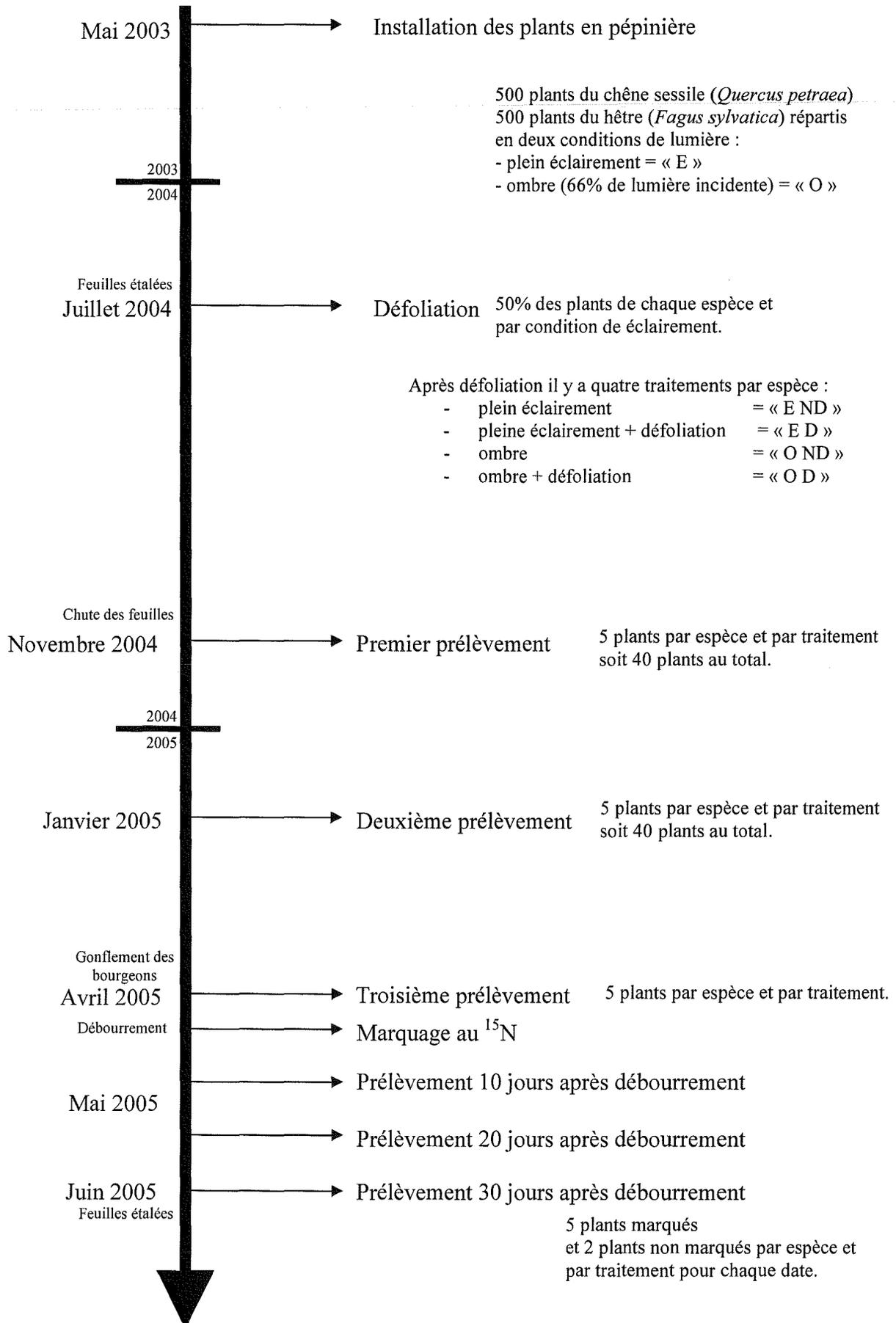


Figure 3. 1. Schéma du déroulement de l'expérience.

Analyses élémentaires et isotopiques

Nos analyses ont été effectuées sur 2 mg de matière sèche lyophilisée, préalablement séchée pendant 24 heures à 50°C. La poudre est déposée dans une capsule en étain qui est introduite dans le spectromètre de masse (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Allemagne), couplé en amont à un analyseur élémentaire (NA 1500 NCS, Carlo Erba, Milan, Italie). L'échantillon est transformé en CO₂ et N₂ par une combustion totale. Ces gaz entrent ensuite dans une chambre d'ionisation où le CO₂ est ionisé en isotopomères de masses 44, 45 et 46 selon les combinaisons des isotopes du C (12 et 13) et ceux de l'oxygène (16, 17, 18) et le N₂ ionisé en isotopomères de masse 28 et 29 selon les combinaisons des isotopes de N (14 et 15). Les ions sont accélérés dans un champ électrique et séparés dans un champ magnétique dans lequel ils décrivent des trajectoires différentes selon leur masse et ils sont finalement recueillis dans des collecteurs de Faraday distincts. Les valeurs de rapports isotopiques obtenus sont comparés automatiquement et en permanence à une valeur de ce rapport admise comme étalon international (standards secondaires calibrés pas rapport au PDB).

La richesse en ¹⁵N d'un échantillon marqué (A%) définie par :

$$A\% = \frac{\text{nombre d'atomes } ^{15}\text{N}}{\text{nombre d'atomes } ^{14}\text{N} + \text{nombre d'atomes } ^{15}\text{N}} \times 100$$

dépend des parts relatives d'azote incorporé pendant les périodes où les plants sont alimentés au niveau naturel (X, ou azote ancien) et pendant la charge (Y, ou azote nouveau) avec X+Y=1.

A l'échelle du plant, ou d'un organe, l'équation de dilution isotopique permet de quantifier la dilution progressive du stock d'azote par un stock d'N nouvellement incorporé (Deléens *et al.* 1994). Ainsi, en pratique, l'équation de dilution isotopique peut être utilisée pour quantifier le renouvellement du stock d'N, et pour établir les mouvements de cet élément entre organes (Deléens *et al.*, 1983).

$$A\%_{\text{organe i marqué}} \times (X + Y) = X \times (A\%_{\text{organe i témoin}}) + Y \times (A\%_{\text{source}})$$

La résolution de l'équation donne :

$A\%_{\text{témoin}}$ = pourcentage en ¹⁵N de la solution nutritive enrichie utilisée pendant la phase de charge, soit :

$$Y = \frac{A\%_{\text{organe i marqué}} - A\%_{\text{organe i témoin}}}{A\%_{\text{source marquée}} - A\%_{\text{source naturelle}}}$$

L'hypothèse selon laquelle l'azote est incorporé sans fractionnement isotopique est retenue (Mariotti *et al.*, 1982), aussi la formule devient :

$$Y = \frac{A\%_{\text{organe i marqué}} - A\%_{\text{organe i témoin}}}{A\%_{\text{source marquée}} - A\%_{\text{organe i témoin}}}$$

Calculer Y revient à calculer le facteur de dilution des éléments anciens par les nouveaux. Par conséquent, Y permet d'estimer la force de puits d'un compartiment au sein d'un plant. Y est aussi appelé taux de renouvellement ou allocation relative spécifique (RSA) dans le compartiment étudié.

La quantité totale d'N contenue dans un échantillon est calculée à partir de la mesure de sa concentration en azote et de son poids de matière sèche. Les quantités respectives d'N non marqué et nouvellement incorporé (N nouveau) sont calculées à partir de la proportion Y et de la quantité totale d'azote de l'échantillon considéré.

A partir du RSA, en tenant compte de la taille du compartiment et de la concentration de l'élément considéré, il est également possible d'estimer la distribution relative des assimilats entre les différents compartiments du plant. On calcule pour cela le coefficient de répartition ou partitioning (P%).

$$P\% = \frac{RSA_c \times BM_c \times [C_c]}{RSA_p \times BM_p \times [C_p]} \times 100$$

c : compartiment

p : plante

BM : biomasse de l'échantillon

[C] : concentration en N

Les nouveaux organes formés au printemps sont constitués d'un mélange de composés dérivant des réserves N acquises avant l'hiver (élément ancien non marqué) et d'N nouvellement assimilé au printemps (élément nouveau marqué). L'abondance naturelle en ^{15}N de la solution nutritive est de 0,366 %.

Extraction et dosage des sucres solubles

Extraction

Le matériel à analyser se présente sous forme de poudre issue de matériel végétal lyophilisé et finement broyé, préalablement séché pendant 24 heures à 50°C. De cette matière sèche sont extraits tous les composés solubles dans le méthanol et l'eau. Ainsi, les sucres solubles se trouvent mélangés à d'autres métabolites polaires comme les acides organiques, les acides

aminés ou les pigments hydrosolubles. Puis, un dosage enzymatique permet de doser spécifiquement les sucres choisis. L'amidon est extrait à partir du culot résiduel puis dosé suivant le même principe que les sucres solubles.

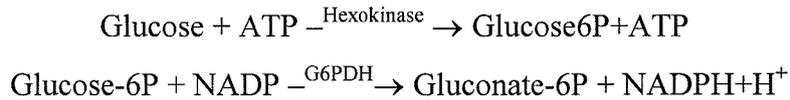
Dans les milieux réactionnels, les enzymes et co-facteurs nécessaires aux réactions enzymatiques sont en concentrations telles qu'ils ne soient jamais limitants pour la réaction, de façon à ce que toutes les réactions s'effectuent jusqu'à l'épuisement du substrat.

Dix mg de poudre d'échantillon lyophilisé et bien homogénéisée est placée dans un tube (T1), ensuite 650 µl de méthanol à 70% (méthanol/eau, 7/3, v/v) ont été mis en contact avec la poudre pendant 10 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 17 000 g pendant 5 min, puis le surnageant est prélevé et placé dans un tube (T2) de 5mL en polypropylène. L'extraction est répétée deux fois, et les trois surnageants sont rassemblés dans le tube T2 et homogénéisés. Les surnageants du tube T2 sont séchés dans un évaporateur à rotation sous vide d'air (Maxi-Dry plus, Heto-model DW1, 0-110, Heto-Holten A/S Allerød, Denmark) pendant 12 heures. Les tubes T1 contenant le culot insoluble sont placés au congélateur en attente de l'extraction d'amidon.

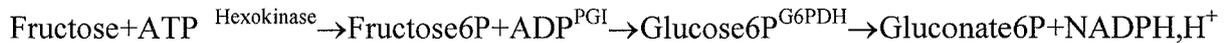
Les culots restants dans le tube T1 après extraction alcoolique (extraction des sucres et autres composés solubles) sont placés sous vide pendant 10 min pour éliminer les traces de méthanol. Le poids du tube + culot est ensuite mesuré (P1), puis 1 mL de NaOH 0,02 N est ajouté et l'ensemble est agité au vortex (la soude favorise le gonflement et l'hydratation de l'amidon pour une meilleure attaque de l'enzyme). Les tubes sont ensuite placés au bain marie 60 min à 90°C puis refroidis à 50°C et centrifugés à 12 620 g pendant 2 min. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon est réalisée en ajoutant, 100 µl de solution d'amyloglucosidase en mélange dans du tampon citrate 0.32 M pH 4.2. Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'étuve pendant 30 min à 50°C puis refroidis. Le poids du tube et du mélange est déterminé (P2). La différence P2 – P1 donne le poids correspondant au volume d'extraction. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 620 g pendant 10 min, afin de bien séparer le surnageant du culot. Pendant le dosage les tubes sont maintenus au froid pour prévenir toute dégradation des sucres en solution.

Dosage

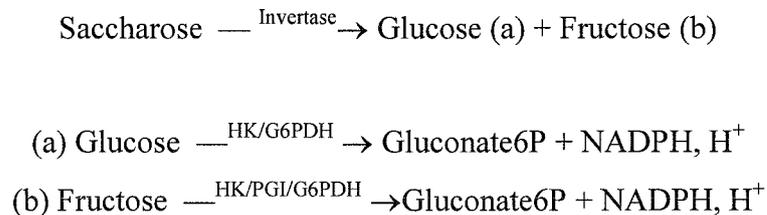
Les dosages de glucose, fructose, saccharose, et d'amidon sont réalisés suivant la méthode de Bergmeyer et Bernt (1974). Le principe de dosage est basé sur la transformation du fructose et du saccharose en glucose, pour réaliser au final le dosage du glucose. La détermination de la quantité de glucose est indirecte. Elle est basée sur la relation stœchiométrique qui existe entre la quantité de glucose de l'extrait et le NADPH formé lors de la réaction enzymatique :



La transformation du fructose et du saccharose en glucose est réalisée par hydrolyse enzymatique : pour le fructose, c'est l'enzyme phosphoglucoisomérase (PGI) qui intervient dans la réaction de conversion en glucose :



Pour le saccharose, c'est l'invertase (B-fructosidase) qui intervient dans la réaction d'hydrolyse en glucose et fructose :



La détermination de glucose est réalisée avant et après hydrolyse enzymatique, par la mesure de densité optique obtenue au spectrophotomètre à 340 nm. Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'absorption maximale du NADPH.

Les métabolites hydrosolubles contenus dans le tube T1 sont remis en suspension avec 0,5 mL de NaOH 0,02 N sur glace pilée. Après 15 minutes le mélange est agité.

La mesure de densité optique (DO) des échantillons se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV (DU 640 B, Beckman Coulter, USA) à la longueur d'onde de 340 nm. Les DO mesurées doivent être < 1,4 (seuil de linéarité du spectrophotomètre utilisé). Si les DO mesurées sont supérieures à 1,4, il n'a plus linéarité entre le NADPH formé et la densité optique mesurée. Il est alors nécessaire de procéder à une dilution avec le tampon réactionnel ou bien d'ajouter 0,5 mL de soude NaOH 0,02 N lors de la dissolution des métabolites. Le calcul de la concentration en glucides (glucose et/ou fructose et/ou saccharose et amidon) à partir des mesures de DO, est réalisé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Concentration (g/l)} = [\text{Vf} * \text{PM} / \text{E} * \text{d} * \text{v} * 1000 * \text{k}] * \text{DDO}$$

Vf : volume de liquide introduit dans la cuve (mL) = 0,86 pour l'amidon et 0,87 pour les sucres.

v : volume de l'échantillon dosé (mL) = 0,02 mL

PM : poids moléculaire de la substance à doser (g/mole)

d : longueur du trajet optique à travers la cuve (cm) = 1 cm.

E : coefficient d'absorption du NADPH = 6,3 L/mole à 340 nm

1000 : facteur de conversion des mmoles en moles.

k : Constante égale à 2 dans le cas du saccharose car une molécule de saccharose donne l'équivalent de 2 molécules de glucose après l'action de l'invertase.

DDO : différence de DO avant et après réaction enzymatique.

NB : Poids moléculaire du glucose ou du fructose = 180,16 g/mole ; saccharose = 342,3 g/mole.

Pour exprimer la concentration d'amidon en équivalents glucose, on utilise le poids moléculaire du glucose :

$$\text{PM (amidon)} = \text{PM (glucose)} - \text{PM (eau)} = 180,16 - 18 = 162,16 \text{ g/mole.}$$

Pour convertir les concentrations en glucides présents dans le volume d'extraction en concentrations dans la matière sèche initiale, la formule suivante est utilisée :

$$\text{Concentration (g/100 g MS)} = \text{Ve} * \text{C/P} * 100$$

Avec Ve : le volume d'extraction, C : Concentration en g/L et P : le poids de poudre dosée initialement.

Extraction et dosage des acides aminés totaux

Les acides aminés ont été extraits par broyage à 4°C de 10mg de poudre de chaque organe dans 650µL d'un mélange éthanol : eau (MW : 7 : 3) pendant 10 min. Les extraits sont centrifugés 5 min à 17,000 g. Le surnageant est conservé, le culot est rincé deux fois à l'aide de 650µL de MW et centrifugé chaque fois pendant 5 min à 17,000 g. Les surnageants sont

regroupés et constituent l'extrait d'acides aminés. La concentration en acides aminés est déterminée par colorimétrie à 570 nm (spectrophotomètre UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) selon la méthode à la ninhydrine de Yemm et Cocking (1955), avec la leucine comme standard.

Extraction et dosage des protéines solubles totales

Extraction des protéines solubles totales

Les échantillons (10 mg de matière sèche) sont broyés à 4°C dans 2 mL de tampon d'extraction ($\text{Na}_2 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1M pH 7.38, DTT 5mM, PEG 0,3% (m/v) et PVP 20,0000.13% (m/v), leupeptine 1 μ M et pepstatin 1 μ M) à l'aide d'un broyeur à bille (Retsch MM 301, GmbH & Co, Germany) pendant deux fois 45 secondes. Les broyats sont centrifugés deux fois à 12 000 $\times g$ à 4°C pendant 15 min et les surnageants sont utilisés pour un dosage colorimétrique.

Dosage colorimétrique des protéines solubles totales

Les protéines solubles ont été dosées selon la technique de Bradford (1976) ; cette méthode repose sur le fait que le pic maximal d'absorption du bleu de Coomassie se déplace de 465 à 595 nm lorsqu'il se lie aux résidus basiques des protéines en milieu acide. A 80 μ L d'extrait protéique sont ajoutés 720 μ L d'eau distillée et 200 μ L de réactif BIO RAD Protein Assay. Après incubation à température ambiante pendant 5 minutes, la teneur en protéines solubles est déterminée en référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (gamme de 0 à 20 μ g de SAB pour 800 μ L dans du tampon phosphate) à partir d'une solution mère de 2 mg/mL. Une répétition du dosage est réalisée pour chaque échantillon.

Analyses statistiques

Une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs (procédure GLM, SAS statistical software package v. 8 ; SAS Institute Inc., Cary, NC) suivie du test Student-Neuman-Keul a été menée sur l'ensemble des données afin d'étudier les effets de l'ombrage et de la défoliation sur chaque espèce et sur les différentes variables mesurées.

Tableau 3. I. Valeurs moyennes de différents paramètres de croissance chez *Quercus petraea* et *Fagus sylvatica* en novembre 2004 et en juin 2005. Les plants (âgés de 2 et 3 ans à la récolte) ont été cultivés en pépinière sous deux traitements de éclaircissement : E= plein éclaircissement, O= ombre et deux traitements de défoliation : D= Défolié ND=Non défolié. Les effets éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da), pour un paramètre donné, sont mentionnés par les seuils (ns=non significatif, (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p< 0.0001. ANOVA SNK). Pour un paramètre donné et une même date, une lettre indique que les valeurs ne sont pas différentes au seuil de 5%. BS = Biomasse souterraine. BA = Biomasse aérienne des parties pérennes.

Date de récolte	Novembre 2004				Juin 2005											
Eclaircissement	E		O		E		O		p							
Défoliation	ND	D	ND	D	ND	D	ND	D	Ec	De	Da	Ec*De	De*Da	Ec*Da	Ec*De*Da	
<i>Quercus petraea</i>																
Hauteur (cm)	45.5	42.9 a	50.03 a	65.63 a	47.83 a	46 a	78.86 b	78.93 b	**	*	ns	ns	ns	ns	ns	
Diamètre (cm)	1.27 a	1.27 ab	0.98 ab	0.97 b	1.96 a	1.7 a	1.78 a	1.64 a	*	**	*	ns	ns	ns	ns	
Surface foliaire (dm ²)	13.81 a	10.58 a	19.70 b	6.92 c	25.93 a	15.29 a	27.73 b	27.43 a	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	
Nombre de feuilles	129 a	122 a	110 a	75.6 a	293 a	173 b	160 b	175 b	**	ns	**	ns	ns	**	ns	
Biomasse aérienne (g)	22.96 a	23.72 a	25.48 a	13.05 b	26.36 a	19.12 b	25.2 b	18.95 b	***	**	**	ns	ns	ns	*	
Biomasse souterraine (g)	34.73 a	27.99 a	28.79 a	20.15 a	63.82 a	38.82 ab	47.04 ab	22.57 b	*	**	**	ns	ns	*	ns	
Rapport BS/BA	1.51 a	1.18 a	1.12 a	1.54 a	1.31 a	1.46 a	1.14 a	1.06 a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
<i>Fagus sylvatica</i>																
Hauteur (cm)	38.02 a	47.17 a	51.26 a	43.62 a	46.79 a	48.71 a	56.71 a	51.5 a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Diamètre (cm)	1.29 a	0.96 ab	1.16 bc	0.87 c	1.35 a	1.08 a	1.17 a	1.07 a	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	
Surface foliaire (dm ²)	5.5 ab	3.10 b	9.37 a	5.26 ab	16.41 a	10.69 a	22.86 b	17.29 a	**	**	***	ns	ns	ns	ns	
Nombre de feuilles	91 a	85 a	85 a	83 a	341 a	222 b	230 b	191 b	ns	**	***	ns	ns	ns	ns	
Biomasse aérienne (g)	18.56 a	10.53 a	12.74 a	9.08 a	18.6 a	12.13 ab	13.6 ab	11.68 b	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	
Biomasse souterraine (g)	21.88 a	10.42 b	9.04 b	13.57 b	24.41 a	11.44 a	9.7 a	14.15 a	*	**	*	ns	ns	ns	ns	
Rapport BS/BA	1.42 a	1.46 a	1.2 a	1.49 a	1.36 a	0.94 a	0.71 a	0.61 a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Résultats

Dans cette étude, nous avons cherché à estimer les effets d'une défoliation combinée à une faible luminosité sur le stockage des composés carbonés et azotés pendant la période hivernale dans de jeunes arbres de chêne sessile (*Quercus petraea*) et de hêtre (*Fagus sylvatica*). Nous avons également réalisé un bilan carboné et azoté des plants et suivi l'évolution de ces éléments depuis le débourrement jusqu'à l'étalement complet des nouvelles pousses de printemps.

Evolution des paramètres de croissance au cours de l'hiver

Le chêne est une espèce héliophile, alors, nous avons considéré, comme témoins, les plants en plein éclaircissement non défolié (E ND). En novembre 2004, les diamètres dans les jeunes plants à l'ombre sont plus petits par rapport à ceux des traitements en plein éclaircissement (tableau 3. I). L'effet du traitement ombre sur la surface foliaire diffère suivant la défoliation : pour le traitement O ND, la surface foliaire est augmentée de 43% par rapport à celle du témoin (E ND), par contre pour le traitement OD, elle est diminuée de 50%. La biomasse aérienne des parties pérennes des plants défoliés à l'ombre (OD) est réduite de 43% par rapport à celle des autres plants. Pour résumer, les plants à l'ombre et défoliés subissent la plus forte réduction de croissance.

En juin 2005, le nombre de feuilles et la biomasse aérienne des parties pérennes des témoins sont plus grands que ceux des autres traitements, quelle que soit la condition de défoliation ou d'éclaircissement. A l'ombre, les plants sont plus grands que ceux en plein éclaircissement. A part le rapport biomasse souterraine sur biomasse aérienne et la hauteur, la plupart des paramètres sont affectés significativement par les différents traitements.

Dans tous les cas, la surface foliaire et le nombre de feuilles sont augmentés entre novembre 2004 et juin 2005. Les plus fortes augmentations sont observées pour les plants OD dont la surface foliaire est multipliée par 4 et le nombre des feuilles par 2,3. Ce qui veut dire que la surface foliaire individuelle moyenne augmente dans ces plants entre 2004 et 2005. Pour résumer, les plants OD récupèrent des paramètres de croissance comparables à ceux des autres traitements.

Tableau 3. II. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités d'amidon (g par arbre) chez des jeunes chênes sessiles *Quercus petraea* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

		Concentration en amidon (g/100g MS)				Quantités d'amidon (g)			
		E ND	E D	O ND	OD	E ND	E D	O ND	OD
<i>Quercus petraea</i>									
Fines racines	Novembre	14.18 a	7.78 a	12.58 a	9.43 a	1.65 a	0.46 a	0.89 a	0.53 a
	Janvier	9.51 a	7.76 a	12.09 a	10.88 a	0.72	0.36	0.85	0.8
	Avril	11.30 a	14.67 a	11.24 a	5.62 a	1.52 a	0.93 b	0.73 b	0.19 c
Grosses racines	Novembre	12.76 a	17.06 a	19.28 a	19.02 a	1.15 a	1.52 a	1.59 a	0.68 a
	Janvier	11.36 a	13.73 a	18.95 a	23.66 a	0.94	nd	1	1.34
	Avril	16.76 a	15.43 a	12.89 a	17.96 a	1.21 ab	1.04 a	1.48 a	0.66 a
Pivot	Novembre	15.52 a	17.55 a	15.13 a	18.00 a	5.76 a	4.45 ab	4.36 a	3.10 b
	Janvier	13.28 a	9.85 a	7.25 a	6.27 a	2.34	2.48	2.71	1.51
	Avril	11.82 a	6.97 a	12.27 a	16.55 a	5.89 a	1.75 a	3.49 a	2.77 a
Tiges	Novembre	12.01 a	13.68 a	15.36 a	11.70 a	2.29 a	3.19 a	3.40 a	1.54 a
	Janvier	13.28 a	9.85 a	7.25 a	6.27 a	2.34	0.35	nd	0.37
	Avril	4.73 a	nd	5.37 a	4.46 a	1.27 a	nd	1.36 a	0.65 a
Plant	Novembre	14.45 a	14.74 a	10.46 a	16.19 a	10.65 a	8.84 a	7.07 a	6.20 a
	Janvier	13.39 a	7.32 a	5.8 a	8.74 a	6.34	nd	nd	4.02
	Avril	10.24 a	3.72 a	8.36 a	6.39 a	9.81 a	2.47 a	5.17 a	2.28 a

Tableau 3. III. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités d'amidon (g par arbre) chez des jeunes hêtre *Fagus sylvatica* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Fagus sylvatica</i>		Concentration en amidon (g/100g MS)				Quantités d'amidon (g)			
		E ND	E D	O ND	OD	E ND	E D	O ND	OD
Fines racines	Novembre	5.15 a	11.23 a	12.30 a	9.03 a	0.46 a	0.44 a	0.78 a	0.27 a
	Janvier	6.02 a	7.01 a	3.36 a	10.85 a	0.37	0.31	0.25	0.25
	Avril	3.17 a	1.65 a	3.23 a	2.38 a	0.22 a	0.10 a	0.19 a	0.16 a
Grosses racines	Novembre	15.61 a	18.41 a	16.43 a	15.50 a	1.07 a	0.75 a	0.68 a	0.63 a
	Janvier	17.80 a	13.17 a	14.08 a	7.32 a	1.69	0.53	0.14	0.04
	Avril	6.66 a	9.69 a	9.01 a	17.14 a	0.54 a	0.99 a	0.14 a	-
Pivot	Novembre	11.52 a	17.98 a	13.49 a	23.02 a	1.27 a	1.37 a	1.91 a	1.35 a
	Janvier	4.64 a	9.36 a	3.08 a	2.61 a	0.44	0.58	0.31	0.23
	Avril	11.90 a	3.93 a	6.44 a	5.42 a	1.50 a	0.34 b	0.46 b	0.35 b
Tiges	Novembre	10.53 a	11.90 a	3.12 a	10.54 a	1.65 a	1.10 a	0.91 a	0.93 a
	Janvier	nd	2.70 a	0.41 a	8.00 a	nd	0.59	nd	0.48
	Avril	3.25 a	nd	3.86 a	3.53 a	0.57 a	nd	0.43 a	0.45 a
Plant	Novembre	12.64 a	12.09 a	13.61 a	17.47 a	4.73 a	3.39 a	5.92 a	4.04 a
	Janvier	nd	6.28	6.76	nd	nd	2.42	7.99	nd
	Avril	6.38 a	2.14 a	5.48 a	nd	2.73 a	0.40 a	1.49 a	nd

Tableau 3. IV. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités de sucres solubles (g par arbre) chez des jeunes chênes sessiles *Quercus petraea* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Quercus petraea</i>		Concentration en sucres solubles (g/100g MS)				Quantités de sucres solubles (g)			
		E ND	E D	O ND	OD	E ND	E D	O ND	OD
Fines racines	Novembre	1.99 a	1.33 b	0.98 b	1.34 b	0.54 a	0.09 a	0.07 a	0.05 a
	Janvier	2.57 a	2.56 a	1.75 a	1.47 a	0.15 a	0.10 a	0.29 a	0.10 a
	Avril	2.13 a	2.38 a	1.86 a	2.26 a	0.31 a	0.20 a	0.12 a	0.08 a
Grosses racines	Novembre	1.84 a	1.44 a	1.59 a	1.48 a	0.17 a	0.13 a	0.13 a	0.04 a
	Janvier	3.71 a	2.70 a	2.31 a	1.81 a	0.29 a	0.06 a	0.15 a	0.06 a
	Avril	2.06 a	1.77 a	1.24 a	1.93 a	0.42 a	0.11 b	0.09 b	0.06 b
Pivot	Novembre	1.95 a	1.98 a	0.84 a	1.35 a	0.56 a	0.37 a	0.22 a	0.20 a
	Janvier	5.58 a	3.12 b	2.35 b	1.97 b	1.91 a	0.66 a	0.79 a	0.38 a
	Avril	2.46 a	1.17 a	1.53 a	2.39 a	1.40 a	0.32 b	0.33 b	0.28 b
Tiges	Novembre	2.43 a	1.19 b	0.97 b	1.14 b	0.56 a	0.28 a	0.21 a	0.16 a
	Janvier	4.02 a	2.48 a	2.45 a	3.06 a	0.92 a	0.37 a	0.01 a	0.46 a
	Avril	2.54 a	nd	0.83 a	1.29 a	0.68 a	nd	0.22 b	0.18 b
Plant	Novembre	3.12 a	1.39 a	1.32 a	1.42 a	2.47 a	0.70 b	0.84 b	0.60 b
	Janvier	4.77 a	1.64 a	1.63 a	2.04 a	3.57 a	0.70 a	1.00 a	0.99 a
	Avril	2.22 a	0.96 a	1.05 a	1.77 a	2.09 a	0.63 a	0.57 a	0.53 a

Le hêtre est une espèce d'ombre, pour cette raison nous avons considéré les plants à l'ombre non défolié (O ND) comme le traitement témoin.

En novembre 2004, le traitement ED diminue la surface foliaire et la biomasse souterraine (tableau 3. I). A l'ombre, les diamètres des jeunes plants et la biomasse souterraine sont plus faibles que ceux des traitements en plein éclaircissement

En juin 2005, tous les traitements (END, ED, OD) diminuent significativement la surface foliaire par rapport au témoin (O ND). Les plants du traitement E ND ont plus de feuilles.

Entre 2004 et 2005, le diamètre des plants à l'ombre est comparable à celui des plants en plein éclaircissement. Les plants des traitements END, ED et OD n'ont pas produit assez de feuilles pour atteindre le nombre des témoins.

Dans tous les cas, la surface foliaire, le nombre de feuilles sont augmentés entre novembre 2004 et juin 2005. Les plus fortes augmentations sont observées dans le cas de la surface foliaire pour les plants OD dont la surface foliaire est multipliée par 3.28 et pour le nombre des feuilles dans les plants E ND, dont le nombre des feuilles est multiplié par 3.74, ce qui veut dire que la surface foliaire individuelle est peu modifiée entre 2004 et 2005.

Evolution des teneurs et quantités de composés carbonés et azotés au cours de l'hiver

Amidon.

Chez le chêne, quel que soit le traitement, les quantités et les concentrations en amidon ne sont pas modifiées (Tableau 3.II), à l'exception du pivot, en novembre, où la quantité d'amidon est réduite de 43% et des fines racines, en avril, pour les plants d'ombre réduction de 50% de la quantité pour les plants OND et de près de 80% pour les plants OD. Les concentrations ne sont par contre pas modifiées dans ces plants, ce qui suppose qu'il s'agit plutôt d'un effet de biomasse. Entre novembre 2004 et avril 2005, les quantités et concentrations en amidon ne sont pas significativement modifiées.

Chez le hêtre, il n'y a pas d'effet des traitements sur les quantités et les concentrations en amidon (Tableau 3.III). Dans tous les organes, à l'exception des tiges, on observe une baisse significative de la concentration en amidon entre Novembre 2004 et 2005.

Sucres solubles.

Chez le chêne, les concentrations en sucres solubles des racines fines en novembre sont diminuées par tous les traitements mais cette différence par rapport aux témoins n'est plus visible en janvier et avril (Tableau 3. IV). Dans le pivot, en janvier, les concentrations en

Tableau 3. V. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités de sucres solubles (g par arbre) chez des jeunes hêtre *Fagus sylvatica* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclairément E = plein éclairément ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclairément (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Fagus sylvatica</i>		Concentration en sucres solubles (g/100g MS)				Quantités de sucres solubles (g)			
		E ND	E D	O ND	OD	E ND	E D	O ND	OD
Fines racines	Novembre	5.10 a	3.50 a	4.89 a	4.25 a	0.41 a	0.17 b	0.20 b	0.15 b
	Janvier	5.26 a	4.61 a	5.97 a	5.59 a	0.29 a	0.23 a	0.21 a	0.15 a
	Avril	3.7 a	2.98 a	5.98 a	3.6 a	0.13 a	0.13 a	0.13 a	0.17 a
Grosses racines	Novembre	5.18 a	3.93 a	5.28 a	5.89 a	0.34 a	0.18 a	0.25 a	0.10 a
	Janvier	5.6 a	5.77 a	5.76 a	9.06 a	0.40 a	0.24 a	0.38 a	0.15 a
	Avril	3.94 a	5.06 a	5.93 a	2.44 a	0.28 a	0.47 a	0.31 a	-
Pivot	Novembre	3.98 a	4.97 a	3.69 a	3.29 a	0.46 a	0.32 a	0.27 a	0.23 a
	Janvier	5.08 a	7.16 a	4.89 a	7.36 a	0.54 a	0.52 a	0.26 a	0.63 a
	Avril	5.94 a	4.53 a	3.61 a	2.76 a	0.66 a	0.21 a	0.24 a	0.17 a
Tiges	Novembre	1.41 a	2.29 a	1.69 a	2.75 a	1.23 a	2.71 a	2.31 a	1.34 a
	Janvier	nd	7.24 a	8.00 a	6.17 b	nd	0.75 a	0.39 a	0.32 a
	Avril	2.85 a	nd	2.92 a	2.49 a	0.56 a	nd	0.32 a	0.31 a
Plant	Novembre	3.48 a	4.09 a	2.64 a	2.4 a	1.6 a	1.34 a	1.1 a	0.54 a
	Janvier	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Avril	4.35 a	1.21 a	4.6 a	nd	1.89	0.23	1.24	nd

Tableau 3. VI. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités en protéines solubles totales (g par arbre) chez des jeunes chênes sessiles *Quercus petraea* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Quercus petraea</i>		Concentration en protéines solubles totales (g/100g MS)							Quantités en protéines solubles totales (g)						
		E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da	E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da
Fines racines	Novembre	1.15 a	1.27 a	1.10 a	0.93 a				0.21 a	0.09 a	0.09 a	0.04 a			
	Janvier	1.04 a	1.21 a	1.28 a	1.32 a	ns	ns	**	0.05 a	0.04 a	0.10 a	0.09 a	ns	ns	ns
	Avril	0.83 a	0.86 a	0.93 a	0.93 a				0.13 a	0.06 b	0.07 b	0.05 b			
Grosses racines	Novembre	0.97 a	1.05 a	0.65 b	0.91 b				0.08 a	0.09 a	0.11 a	0.02 a			
	Janvier	0.79 a	0.79 a	1.02 a	1.22 a	ns	*	ns	0.06 a	0.04 a	0.05 a	0.06 a	ns	ns	ns
	Avril	0.53 a	0.87 a	0.41 a	0.93 a				0.06 a	0.06 a	0.02 a	0.03 a			
Pivot	Novembre	0.79 a	0.61 a	0.52 a	0.48 a				0.26 a	0.14 a	0.12 a	0.07 a			
	Janvier	0.73 a	0.66 a	0.72 a	0.79 a	ns	ns	*	0.25 a	0.13 a	0.21 a	0.14 a	*	*	ns
	Avril	0.53 a	0.59 a	0.49 a	0.63 a				0.24 a	0.15 b	0.10 b	0.10 b			
Tiges	Novembre	0.74 a	0.80 a	0.63 a	0.63 a				0.18 a	0.18 a	0.13 a	0.08 b			
	Janvier	0.89 a	1.01 a	0.95 a	1.17 a	ns	*	***	0.16 a	0.17 a	0.15 a	0.19 a	*	ns	ns
	Avril	0.72 a	0.70 a	0.66 a	0.90 a				0.21 a	0.17 ab	0.12 b	0.11 b			
Plant	Novembre	0.82 a	0.79 b	0.62 bc	0.96 c				0.82 a	0.53 b	0.36 b	0.22 c			
	Janvier	0.84 a	0.87 a	0.90 a	0.96 a	ns	*	ns	0.55 a	0.35 a	0.53 a	0.37 a	ns	**	ns
	Avril	0.65 a	0.60 a	0.60 a	0.72 a				0.63 a	0.40 a	0.29 a	0.24 a			

Tableau 3. VII. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités en protéines solubles totales (g par arbre) chez des jeunes hêtre *Fagus sylvatica* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Fagus sylvatica</i>		Concentration en protéines solubles totales (g/100g MS)				Quantités en protéines solubles totales (g)									
		E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da	E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da
Fines racines	Novembre	0.77 a	0.83 a	0.86 a	0.97 a				0.08 a	0.03 a	0.04 a	0.03 a			
	Janvier	0.99 a	0.80 a	0.89 a	0.88 a	ns	ns	*	0.07 a	0.04 a	0.05 a	0.04 a	ns	*	ns
	Avril	0.56 a	0.66 a	0.72 a	0.81 a				0.04 a	0.03 a	0.04 a	0.05 a			
Grosses racines	Novembre	0.86 a	0.63 a	0.78 a	0.73 a				0.05 a	0.02 b	0.03 b	0.02 b			
	Janvier	0.85 a	0.67 a	0.88 a	0.77 a	ns	ns	*	0.09 a	0.02 a	0.05 a	0.04 a	ns	ns	ns
	Avril	0.39 a	0.55 a	0.69 a	-				0.02 a	0.04 a	0.03 a	-			
Pivot	Novembre	0.49 a	0.56 a	0.70 a	0.59 a				0.05 ab	0.04 ab	0.07 a	0.03 b			
	Janvier	0.71 a	0.61 a	0.64 a	0.54 a	ns	ns	*	0.07 a	0.04 a	0.05 a	0.04 a	ns	ns	ns
	Avril	0.42 a	0.36 a	0.49 a	0.59 a				0.04 a	0.03 a	0.04 a	0.04 a			
Tiges	Novembre	0.65 a	0.73 a	0.85 a	0.80 a				0.13 a	0.08 a	0.15 a	0.06 a			
	Janvier	0.91 a	0.72 b	0.79 ab	0.81 ab	ns	ns	ns	0.13 a	0.09 a	0.10 a	0.07 a	ns	**	ns
	Avril	0.67 a	0.62 a	0.76 a	0.77 a				0.10 ab	0.06 a	0.09 ab	0.13 b			
Plant	Novembre	0.71 a	0.66 a	0.80 a	0.84 a				0.30 a	0.15 a	0.31 a	0.13 a			
	Janvier	0.92 a	0.73 b	0.80 a	0.63 b	ns	ns	ns	0.27 a	0.20 a	0.18 a	0.19 a	ns	ns	ns
	Avril	0.50 a	0.56 a	0.65 a	0.79 a				0.34 a	0.12 a	0.19 a	0.24 a			

sucres solubles sont diminuées par tous les traitements (ED -44%, OND -57% et OD -65%) mais cette différence par rapport taux témoins n'est plus visible en avril. Dans les tiges, en novembre, les concentrations en sucres solubles sont diminuées par tous les traitements (ED -51%, OND -60% et OD -53%) mais cette différence par rapport taux témoins n'est plus visible en janvier et avril.

Les quantités de sucres solubles ont fortement diminué en avril dans les grosses racines de tous les traitements (ED -74%, OND -78% et OD -86%). De même, dans le pivot et les tiges, en avril les quantités de sucres solubles sont diminuées par tous les traitements (ED, OND et OD). L'absence de variation des concentrations, dans ces cas, permet de dire que les baisses observées sont liées à un effet de la biomasse.

Pour un organe et un traitement donné, la concentration et la quantité ne sont modifiées significativement entre novembre et avril.

Chez le hêtre, les concentrations en sucres solubles ne sont pas affectées par les différents traitements sauf pour les tiges, en janvier, où la concentration en sucres solubles est plus faible que celle des autres traitements (Tableau 3. V).

Protéines solubles totales

D'une manière générale, les concentrations et les quantités de protéines solubles totales sont très faibles par rapport aux concentrations et quantités d'amidon. Chez le chêne, la défoliation diminue significativement les concentrations en protéines solubles totales, en janvier, dans les grosses racines et dans les tiges ; cet effet est visible à l'échelle du plant (tableau 3. VI). Les concentrations en protéines solubles totales dans les fines racines, le pivot et les tiges sont diminuées entre janvier et avril.

Les traitements affectent peu les quantités de protéines solubles totales. En avril, l'ombre diminue les quantités de protéines dans le pivot et la tige.

Chez le hêtre, seul un effet date est observé : entre novembre et avril, la concentration en protéines solubles totales est diminuée dans les fines racines, les grosses racines et le pivot (Tableau 3.VII).

Les quantités totales des protéines de la plupart des organes ne sont pas affectées par les traitements.

Tableau 3. II. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités d'amidon (g par arbre) chez des jeunes chênes sessiles *Quercus petraea* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Quercus petraea</i>		Concentration en amidon (g/100g MS)				Quantités d'amidon (g)			
		E ND	E D	O ND	OD	E ND	E D	O ND	OD
Fines racines	Novembre	14.18 a	7.78 a	12.58 a	9.43 a	1.65 a	0.46 a	0.89 a	0.53 a
	Janvier	9.51 a	7.76 a	12.09 a	10.88 a	0.72	0.36	0.85	0.8
	Avril	11.30 a	14.67 a	11.24 a	5.62 a	1.52 a	0.93 b	0.73 b	0.19 c
Grosses racines	Novembre	12.76 a	17.06 a	19.28 a	19.02 a	1.15 a	1.52 a	1.59 a	0.68 a
	Janvier	11.36 a	13.73 a	18.95 a	23.66 a	0.94	nd	1	1.34
	Avril	16.76 a	15.43 a	12.89 a	17.96 a	1.21 ab	1.04 a	1.48 a	0.66 a
Pivot	Novembre	15.52 a	17.55 a	15.13 a	18.00 a	5.76 a	4.45 ab	4.36 a	3.10 b
	Janvier	13.28 a	9.85 a	7.25 a	6.27 a	2.34	2.48	2.71	1.51
	Avril	11.82 a	6.97 a	12.27 a	16.55 a	5.89 a	1.75 a	3.49 a	2.77 a
Tiges	Novembre	12.01 a	13.68 a	15.36 a	11.70 a	2.29 a	3.19 a	3.40 a	1.54 a
	Janvier	13.28 a	9.85 a	7.25 a	6.27 a	2.34	0.35	nd	0.37
	Avril	4.73 a	nd	5.37 a	4.46 a	1.27 a	nd	1.36 a	0.65 a
Plant	Novembre	14.45 a	14.74 a	10.46 a	16.19 a	10.65 a	8.84 a	7.07 a	6.20 a
	Janvier	13.39 a	7.32 a	5.8 a	8.74 a	6.34	nd	nd	4.02
	Avril	10.24 a	3.72 a	8.36 a	6.39 a	9.81 a	2.47 a	5.17 a	2.28 a

Tableau 3. IX. Valeurs moyennes des concentrations (g/100g MS) et des quantités en acides aminés (g par arbre) chez des jeunes hêtre *Fagus sylvatica* cultivés en pépinière et récoltés en Novembre 2004, Janvier et Avril 2005. Les arbres, âgés de deux ans, ont été soumis à l'un des deux traitements d'éclaircissement E = plein éclaircissement ; O = Ombre et à l'un des deux traitements de défoliation : D = Défolié ; ND = Non défolié. L'effet éclaircissement (Ec), défoliation (De) et date (Da) pour un organe donné est mentionné par les seuils ((ns) non significatif ; (*) p<0.05 ; (**) p<0.01 ; (***) p<0.0001 ANOVA SNK). Pour un organe donné, et une même date, une même lettre indique que les valeurs ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%.

<i>Fagus sylvatica</i>		Concentration en acides aminés (g/100g MS)						Quantités en acides aminés (g)							
		E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da	E ND	E D	O ND	OD	Ec	p De	Da
Fines racines	Novembre	0.31 a	0.45 a	0.38 a	0.65 b				0.03 a	0.02 a	0.02 a	0.02 a			
	Janvier	0.68 a	0.65 a	1.00 a	0.83 a	**	ns	**	0.05 a	0.03 a	0.07 a	0.01 a			
	Avril	0.76 a	0.51 a	1.31 a	1.29 a				0.06 a	0.03 a	0.08 a	0.09 a	ns	ns	**
Grosses racines	Novembre	0.94 a	0.90 a	1.19 a	1.18 a				0.04 a	0.03 a	0.05 a	0.04 a			
	Janvier	1.71 a	1.55 a	2.08 a	2.01 a	ns	ns	*	0.17 a	0.07 a	0.10 a	0.11 a			
	Avril	1.07 a	1.93 a	1.99 a	-				0.06 a	0.15 a	0.07 a	-	ns	ns	**
Pivot	Novembre	1.07 a	1.62 a	1.67 a	1.39 a				0.11 a	0.12 a	0.17 a	0.06 a			
	Janvier	1.60 ab	1.44 a	2.13 ab	2.33 c	ns	ns	ns	0.16 a	0.10 a	0.30 a	0.18 a			
	Avril	1.09 a	2.11 a	2.05 a	1.88 a				0.09 a	nd	0.16 a	0.12 a	ns	ns	ns
Tiges	Novembre	0.58 a	0.67 a	0.57 a	0.61 a				0.10 a	0.07 a	0.09 a	0.05 a			
	Janvier	1.03 a	0.61 a	0.62 a	0.77 a	ns	**	ns	0.11 a	0.12 a	0.10 a	0.06 a			
	Avril	0.78 a	0.93 a	1.02 a	1.22 a				0.13 a	0.07 a	0.13 a	0.20 a	ns	ns	**
Plant	Novembre	0.75 a	0.87 a	0.90 a	0.87 a				0.32 a	0.22 a	0.32 a	0.20 a			
	Janvier	1.27 a	0.80 a	1.05 a	nd	ns	ns	ns	0.37 a	0.24 a	0.21 a	nd			
	Avril	0.81 a	0.84 a	1.40 a	1.34 a				0.34 a	0.18 a	0.38 a	0.40 a	ns	ns	ns

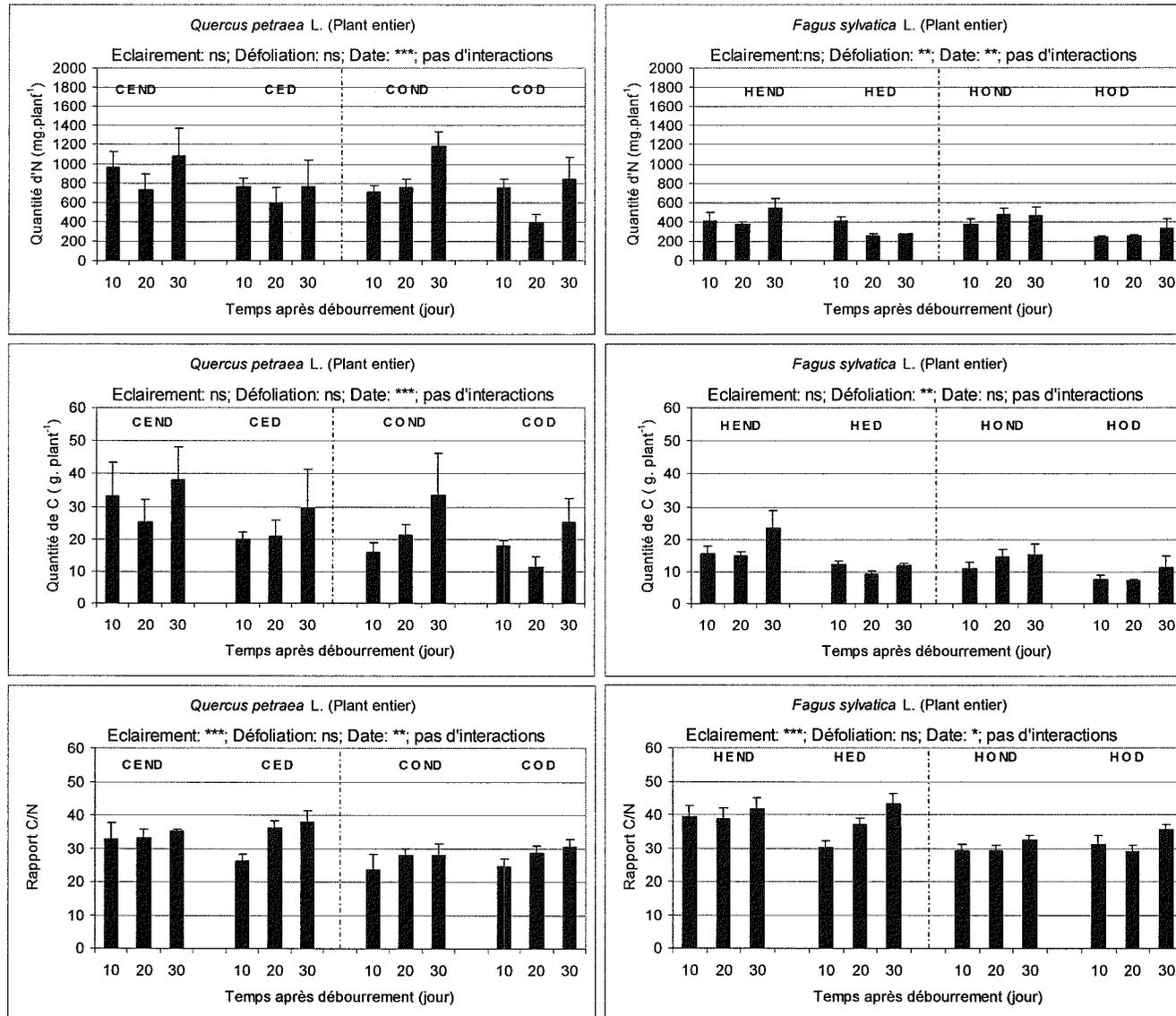


Figure 3.2. Evolution printanière des quantités totales de carbone (C), d'azote (N) et du rapport C/N de plants de chêne sessile (C ; *Quercus petraea* L.) et de hêtre (H ; *Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Acides aminés.

Les fines racines, les grosses racines et le pivot des chênes OD (Tableau 3.VIII) ont des concentrations en acides aminés plus élevées que celles des témoins. D'une manière quasi générale, les concentrations en acides aminés augmentent entre novembre et avril.

L'ombre diminue la quantité d'acides aminés et augmente celle du pivot. D'une manière quasi générale, les quantités d'acides aminés augmentent entre novembre et avril.

Contrairement au chêne, les concentrations en acides aminés de la plupart des organes chez le hêtre ne sont pas affectées par la lumière sauf dans les racines fines (Tableau 3. IX). En novembre, les racines fines des plants défoliés à l'ombre ont une concentration en acides aminés plus importante que celle des témoins (O ND) mais cet effet disparaît en janvier et avril.

Les traitements n'ont pas d'effet sur la quantité d'acides aminés (g), dans tous les organes et quelle que soit la date.

Evolution des quantités de carbone et d'azote lors de la croissance printanière

A l'échelle du plant

La quantité d'azote dans les plants de chêne varie significativement du débourrement à l'étalement complet du feuillage. Une augmentation de la quantité d'azote est observée dans les plants ombrés non défoliés. La défoliation aboutit à une légère diminution de la quantité d'azote ($p > f : 0.005$) (Figure 3.2).

La quantité d'azote dans les plants de hêtre ne varie pas avec le temps. En revanche, une diminution significative liée à la défoliation est observée. Les plants défoliés contenant en moyenne 300 mg d'N contre 400 mg pour les plants non défoliés (Figure 3.2).

La comparaison des deux espèces montre clairement que la quantité d'N dans le chêne est double quel que soit le traitement, comparativement à celle du hêtre (Figure 3.2).

Concernant la quantité de C, seule la date altère significativement celle du chêne. La quantité en C du hêtre varie uniquement avec le traitement défoliation. La défoliation aboutit à une diminution significative de la quantité de C qui passe en moyenne de 14g pour les plants non défoliés à 10g pour les plants défoliés (Figure 3.2).

Là encore la quantité de C du chêne est deux fois plus importante que celle du hêtre.

Le rapport C/N des deux espèces augmente significativement avec le temps, et est diminué d'environ 1/3 par l'ombrage. Ainsi, le rapport C/N du chêne est en moyenne de 26 à

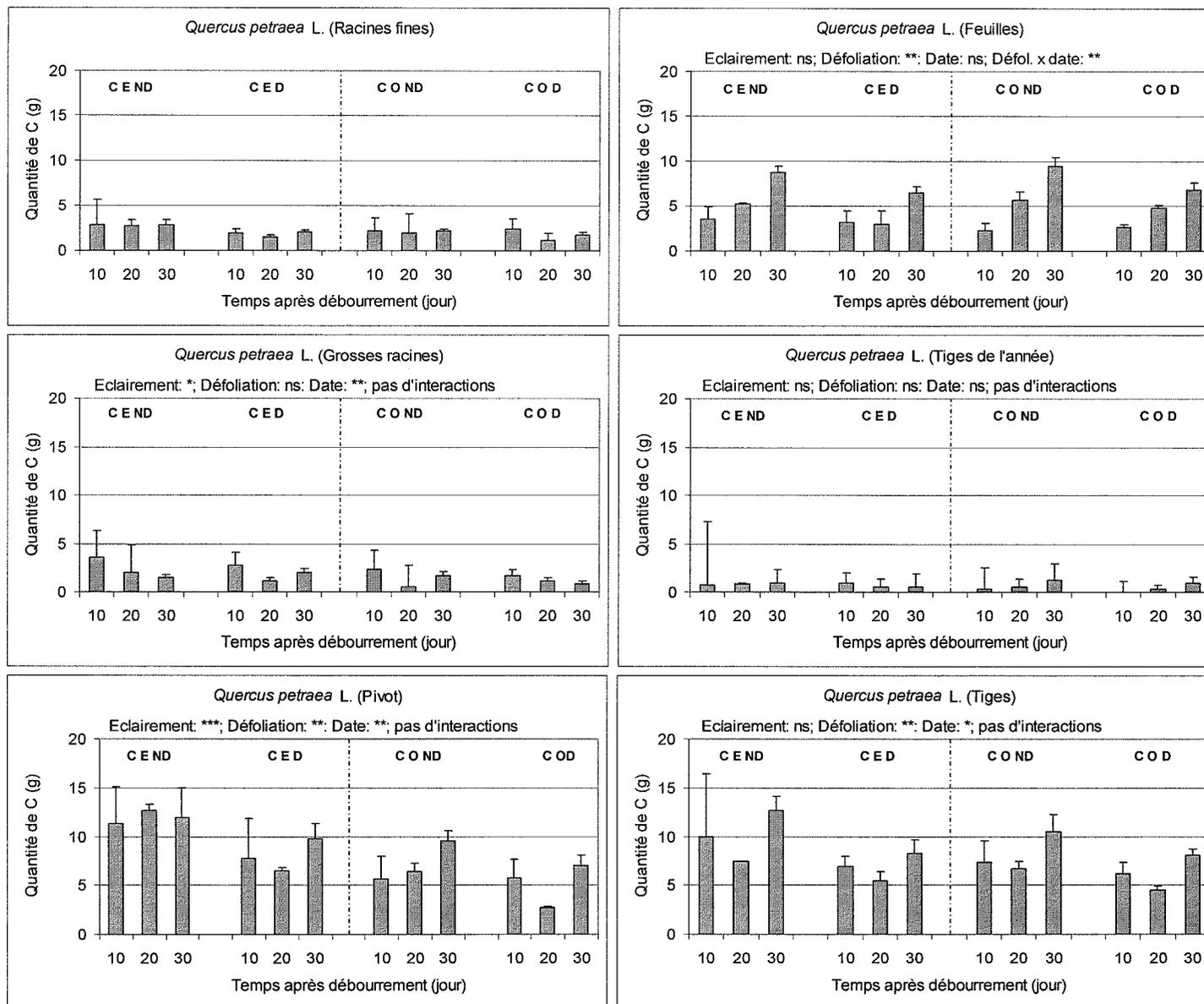


Figure 3.3. Evolution printanière des quantités totales de carbone (C) des organes aériens et souterrains de plants de chêne sessile (C ; *Quercus petraea* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

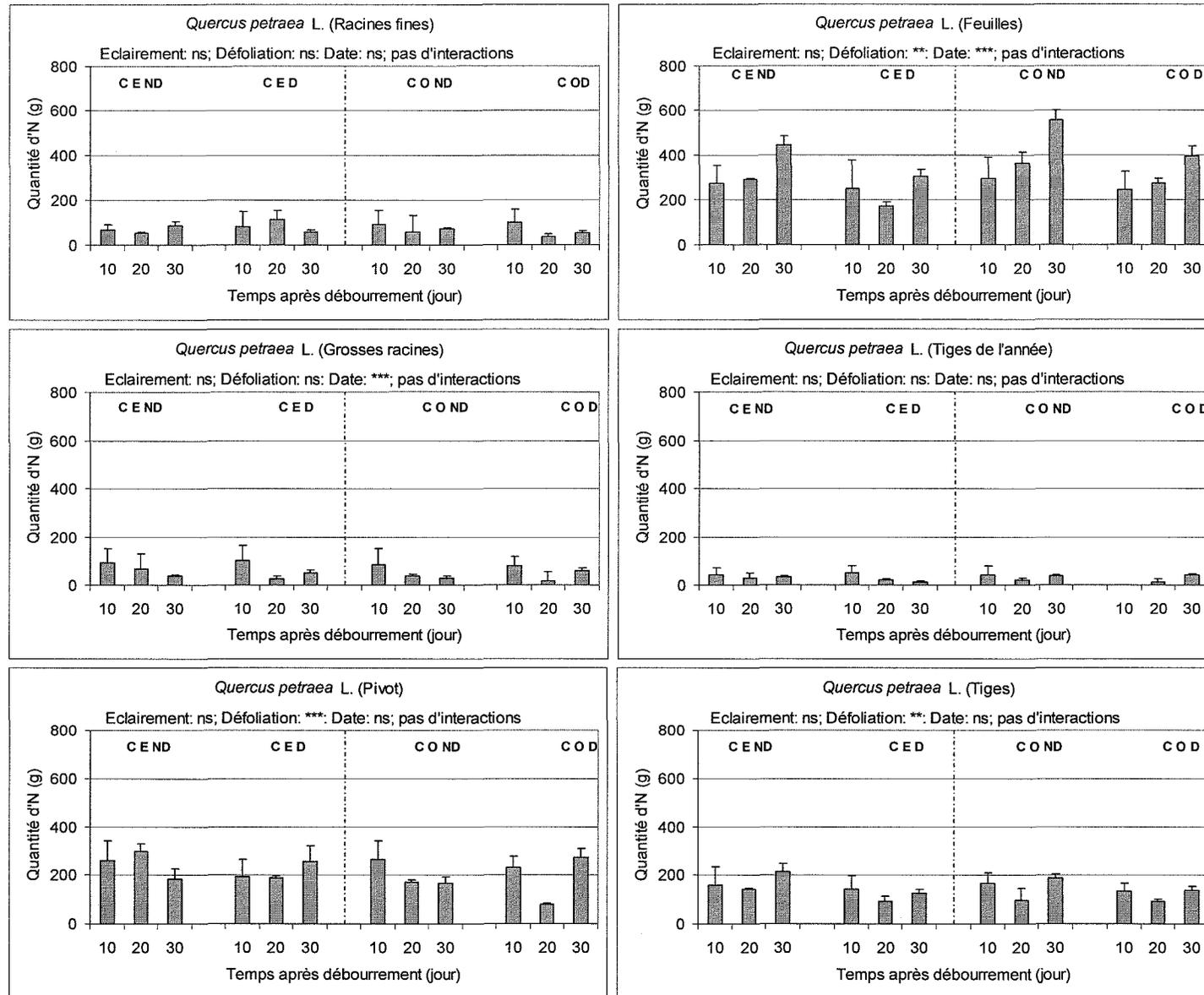


Figure 3.4. Evolution printanière des quantités totales d'azote (N) des organes aériens et souterrains de plants de chêne sessile (C ; *Quercus petraea* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

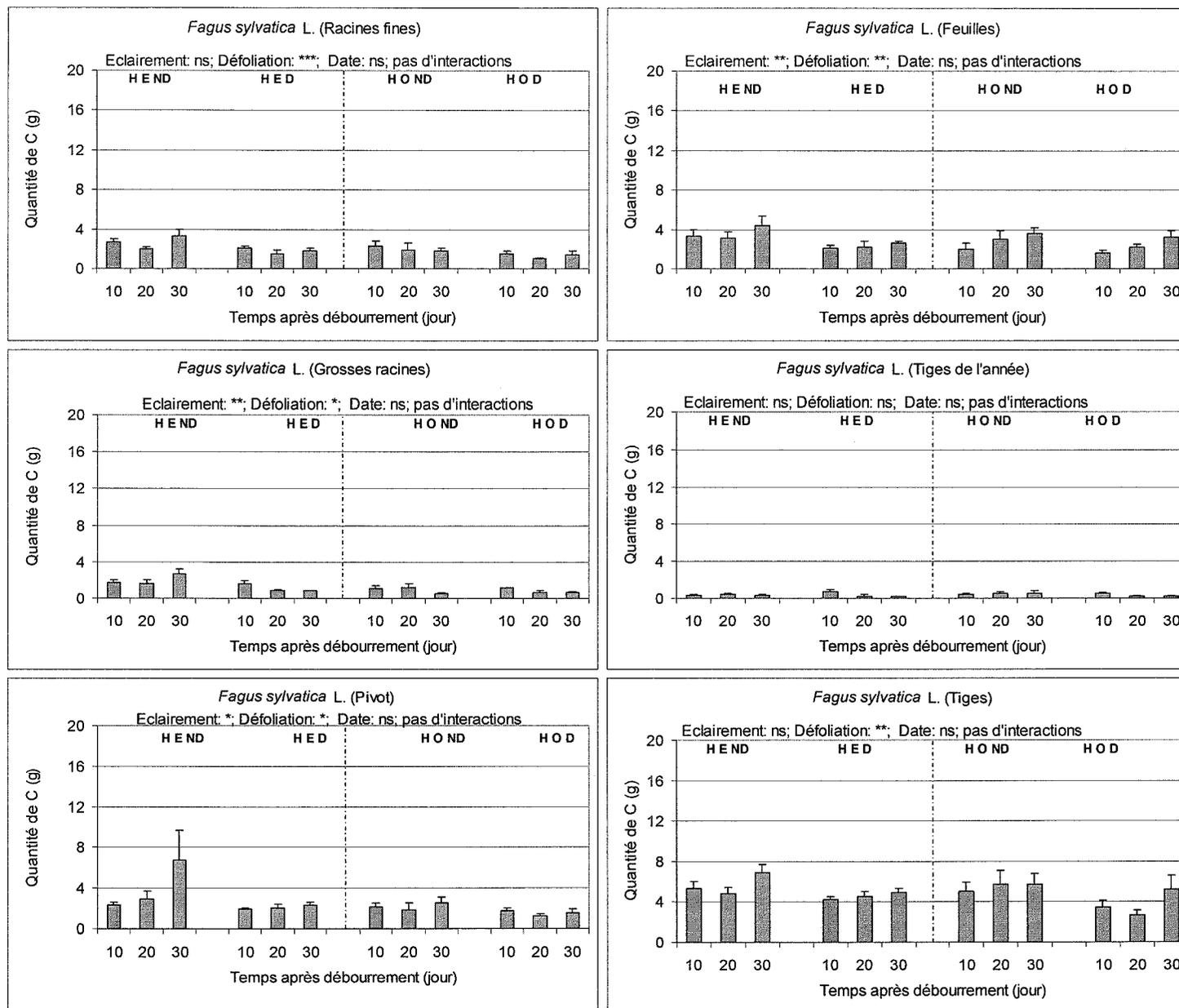


Figure 3.5. Evolution printanière des quantités totales de carbone (C) des organes aériens et souterrains de plants de hêtre (H ; *Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

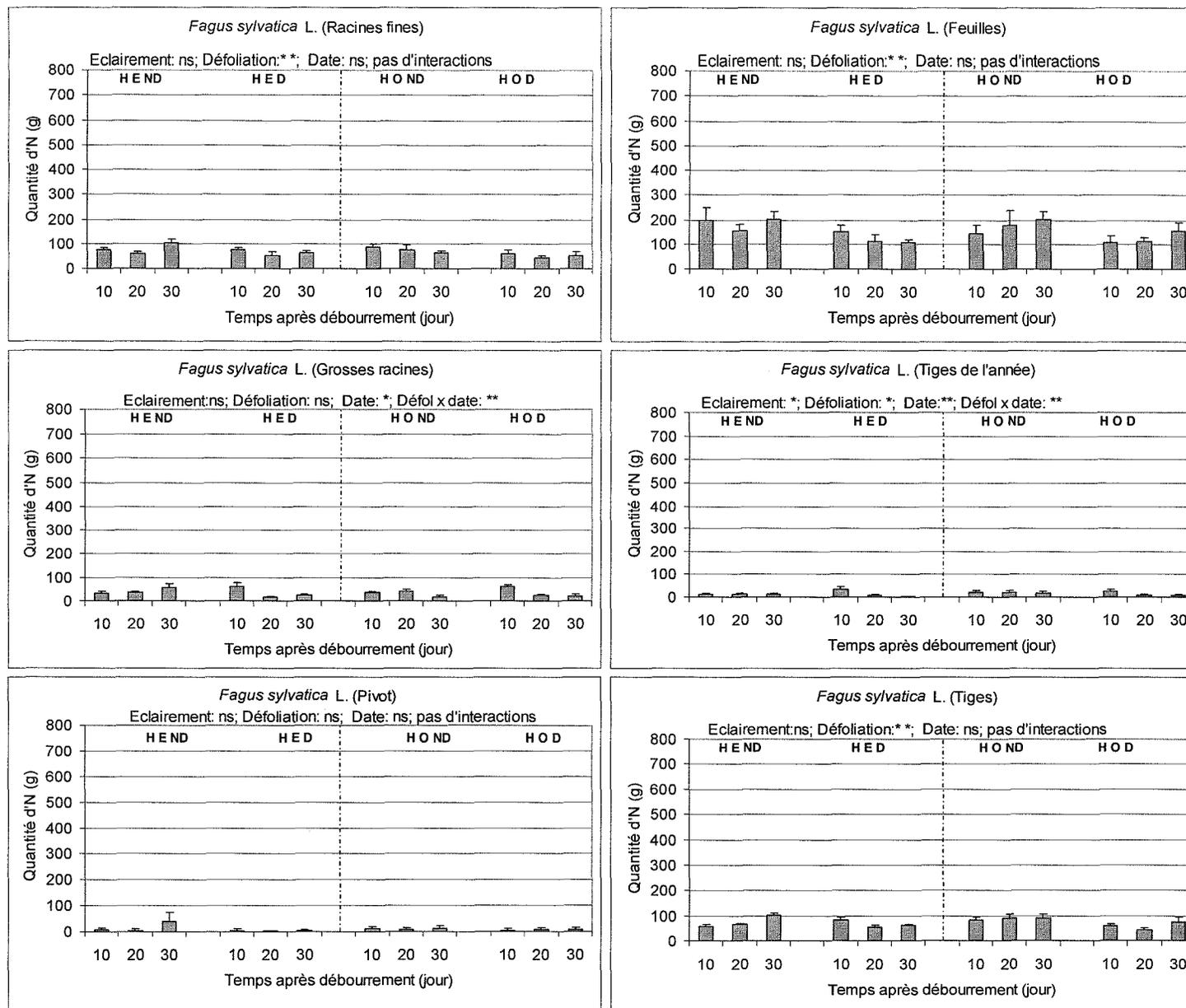


Figure 3.6. Evolution printanière des quantités totales d'azote (N) des organes aériens et souterrains de plants de hêtre (H ; *Fagus sylvatica* L.) âgés en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

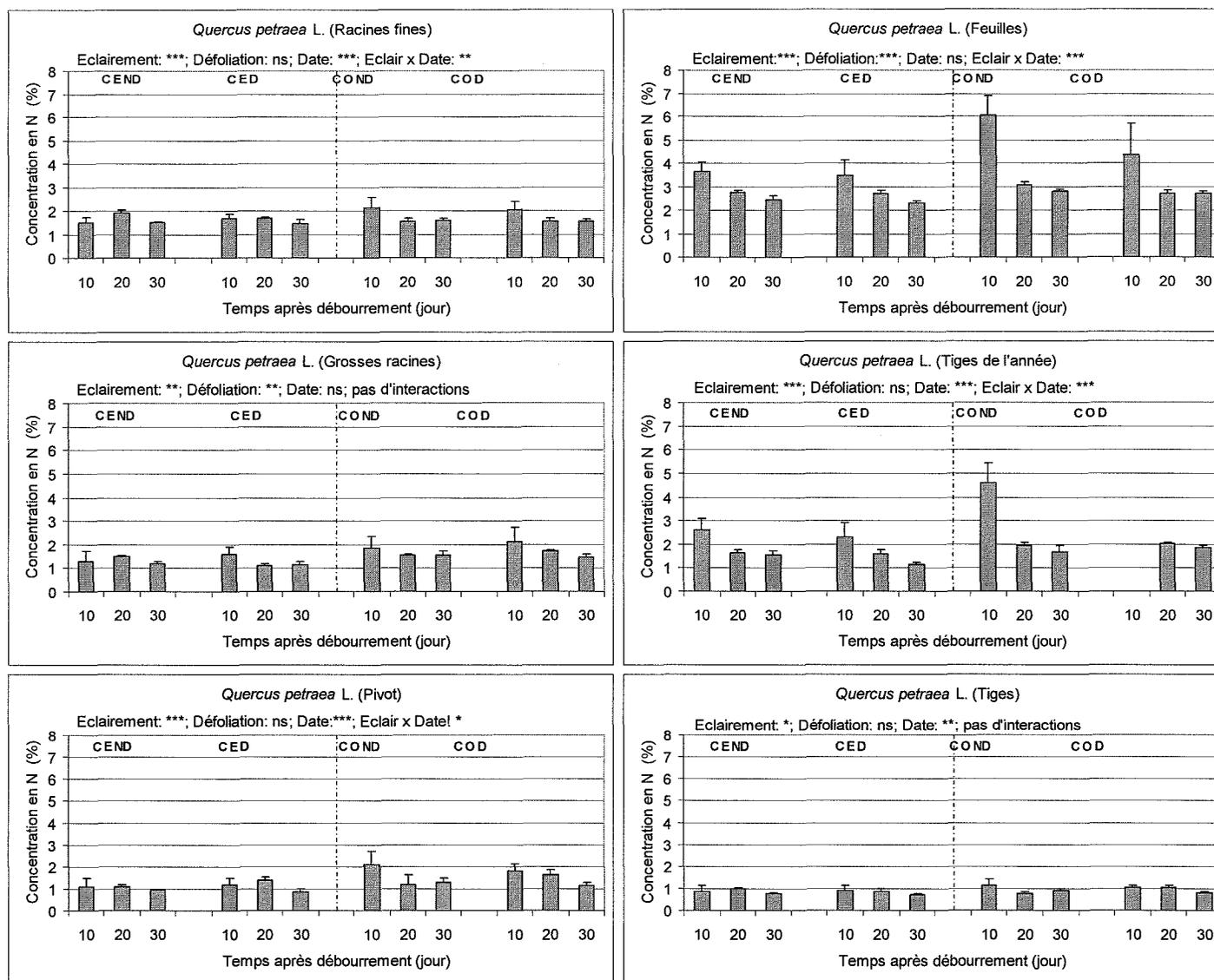


Figure 3.7. Evolution printanière de la concentration en azote total (N) des organes aériens et souterrains de plants de chêne sessile (*Q. petraea* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

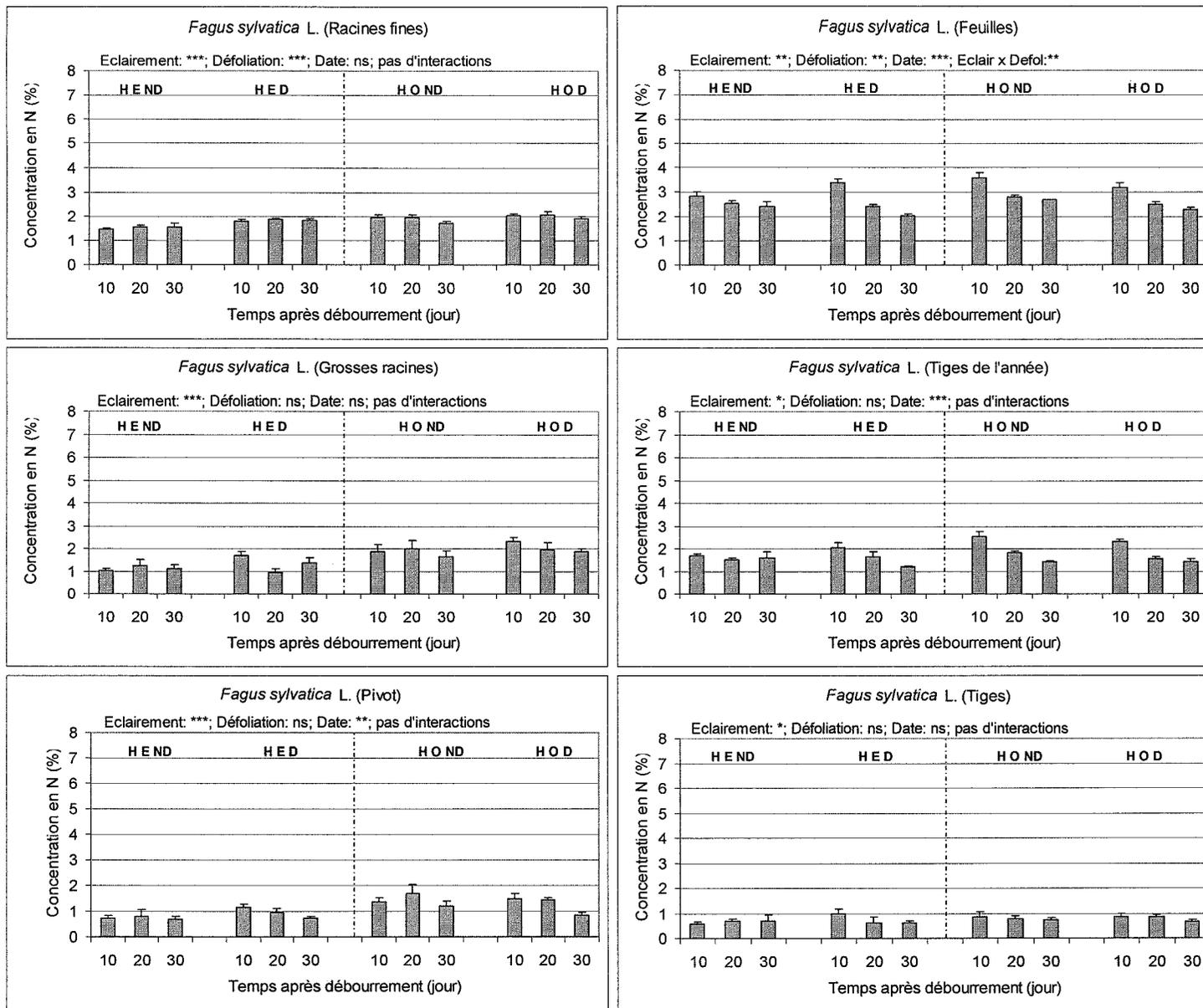


Figure 3.8. Evolution printanière de la concentration en azote total (N) des organes aériens et souterrains de plants de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=7 à 8). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

l'ombrage contre 34 pour les plants de pleine lumière, et de 31 (O) à 38 (E) pour le hêtre, respectivement (Figure 3.2).

A l'échelle des organes

Quel que soit le traitement appliqué, chez le chêne, les organes qui accumulent le plus de C sont le pivot, les tiges et les nouvelles feuilles (Figure 3.3). Viennent ensuite les grosses et les fines racines.

Alors que l'accumulation de C dans le système aérien (feuilles, tiges) semble sensible uniquement à la défoliation, le contenu en C du système souterrain (grosses racines, pivot) varie en fonction de l'éclaircissement. Les feuilles ont leur accumulation de C diminuée par la défoliation, et la quantité de C du pivot est diminuée par l'ombrage et la défoliation.

Comme pour le C, l'azote des plants se retrouve surtout dans les parties aériennes (feuilles 200 à 600 mg, et les tiges < 200mg) et le pivot (200-300 mg). L'accumulation d'azote dans ces organes est affectée essentiellement par la défoliation, le temps aboutissant à une accumulation accrue d'N dans les feuilles en lien avec leur croissance (Figure 3.4). La quantité d'N diminue de manière marquée au cours du temps dans les grosses racines. Les quantités d'azote des racines fines et des tiges de l'année ne sont affectées ni par les traitements, ni par le temps.

Chez le hêtre la quantité de C est la plus importante dans les tiges (4 à 8g) et les feuilles (2 à 4g) et la plus faible dans les tiges de l'année et les racines fines. L'ombrage et la défoliation aboutissent à des diminutions de quantités de C dans les grosses racines et le pivot ainsi que dans les feuilles. La quantité de C des tiges de hêtre est affectée négativement par la défoliation uniquement (Figure 3.5). La quantité d'azote des organes est surtout diminuée par la défoliation, l'éclaircissement ayant un effet peu marqué sur les tiges de l'année uniquement. L'azote diminue au cours du temps dans les grosses racines (Figure 3.6).

La concentration en azote des organes de chêne et de hêtre est affectée par l'éclaircissement, l'ombrage aboutissant à une augmentation de la concentration en N dans les tiges et le pivot pour le chêne (Figures 3.7 et 3.8). La défoliation diminue la concentration en azote des feuilles de chêne (ND : 3.72% ; D : 3,23 %) et de hêtre (ND : 2.65% ; D : 2,84 %). Les concentrations en azote des différents organes sont peu différentes pour les deux espèces, à l'exception des feuilles. Les feuilles de chêne sont plus concentrées en N (4 à 6%) que les feuilles de hêtre (2 à 3%) (Figures 3.7et 3.8).

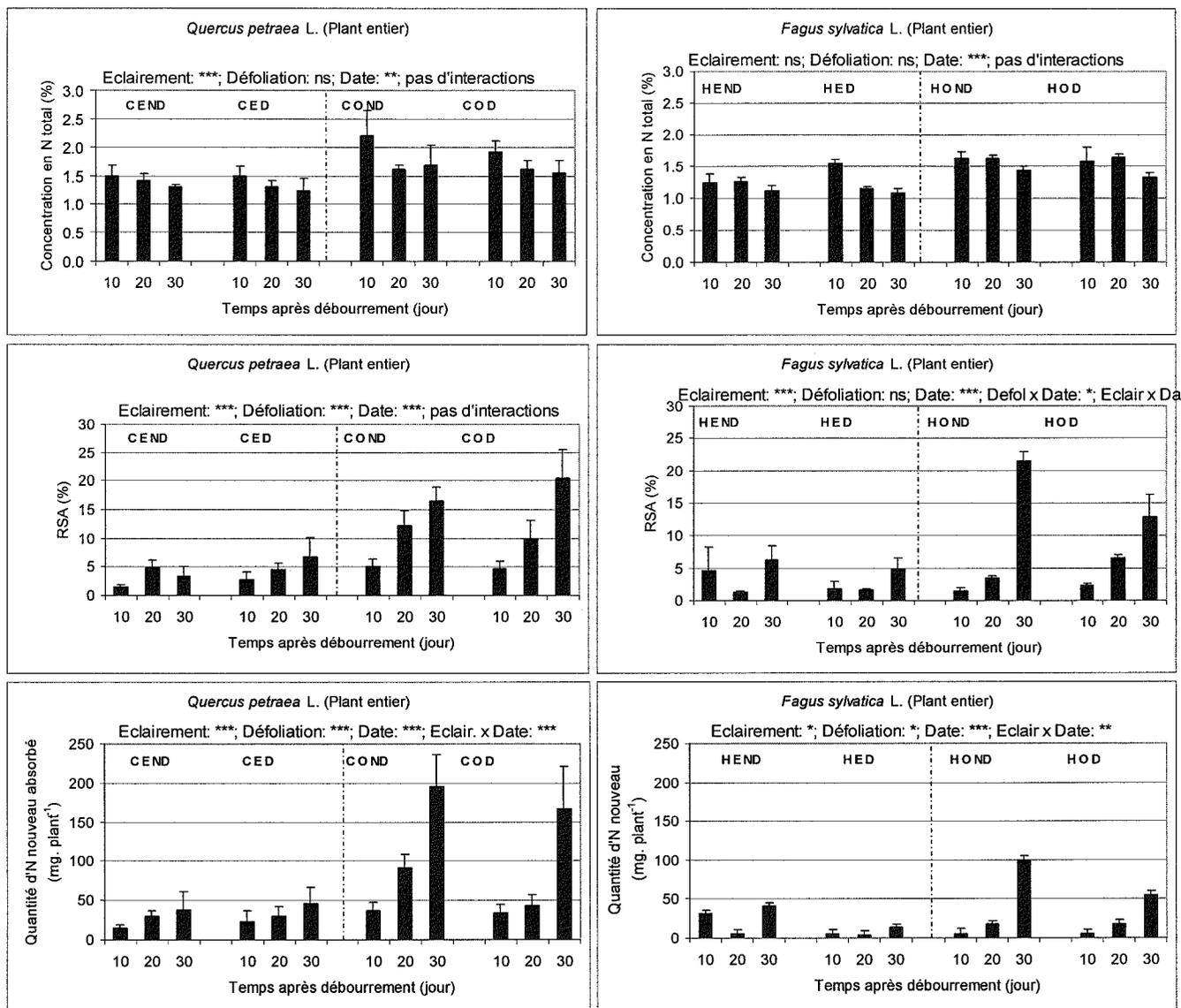


Figure 3.9. Evolution printanière de la concentration en azote total, de l'allocation relative spécifique (RSA %), et de la quantité d'azote nouveau dans des plants de chêne (C ; *Quercus petraea* L.) et de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=4 à 5). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keuln : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

Evolution de l'incorporation d'azote nouvellement assimilé lors de la croissance printanière

A l'échelle du plant

La concentration en azote diminue significativement avec le temps chez le chêne et le hêtre (Figure 3.9). La défoliation n'a aucun effet, ni sur la concentration en azote du chêne ni sur celle du hêtre. En revanche, l'éclaircissement affecte la teneur en azote des plants de chêne, les plants ombrés étant plus concentrés en azote (1,86 % en moyenne) que les plants éclairés (1,35 %). La teneur en azote des plants de hêtre ne semble pas significativement modifiée par le niveau d'éclaircissement (Figure 3.9).

Dix jours après débourrement, nous avons pu constater que les plants de chêne et de hêtre absorbent de l'azote provenant de la solution nutritive marquée. Cette absorption représente de 1 à 5 % de l'azote total des plants, selon le traitement considéré (Figure 3.9). La proportion d'azote nouveau dans l'azote total des plants de chêne et de hêtre augmente au cours du temps. Cette augmentation est plus ou moins forte selon les traitements de défoliation et d'éclaircissement appliqués. Si l'on compare l'effet défoliation sur le chêne, on peut constater que la proportion d'azote nouveau est augmentée (ND : 5,8 % ; D : 8,7%) et quasiment triplée sous l'effet de l'ombrage (E : 3,7%; O : 11,1 %). Pour le hêtre, la proportion d'azote nouveau est diminuée significativement par la défoliation (ND : 6,4 % ; D : 5,0 %) et quasiment doublée sous l'effet de l'ombrage (E : 3,4%; O : 7,9 %).

Trente jours après débourrement, lorsque la croissance printanière est achevée et le feuillage mature, la proportion d'azote nouveau dans l'azote total du plant peut représenter jusqu'à 20 % environ : c'est le cas du chêne défolié/pleine lumière, et du hêtre à l'ombre/non défolié. Ce fort taux de renouvellement de l'azote est associé à de fortes concentrations en azote total, aussi bien pour le chêne que pour le hêtre.

La quantité d'azote nouvellement absorbé augmente peu au cours du temps chez le chêne poussant en pleine lumière, mais augmente de façon spectaculaire dans les chênes ombrés (E : 31 mg ; O : 99 mg) jusqu'à atteindre 200mg dans les plants ombrés non défoliés. Aucun effet significatif de la défoliation n'est observé.

La quantité d'azote nouvellement absorbé augmente beaucoup moins avec le temps chez le hêtre que chez le chêne. Les plants de hêtre en pleine lumière accumulent moins d'azote nouveau que ceux qui sont ombrés (E : 16,8%; O : 33,3 %). La défoliation affecte l'accumulation d'azote nouveau (ND : 33.0 % ; D : 16.9 %), en particulier en pleine lumière

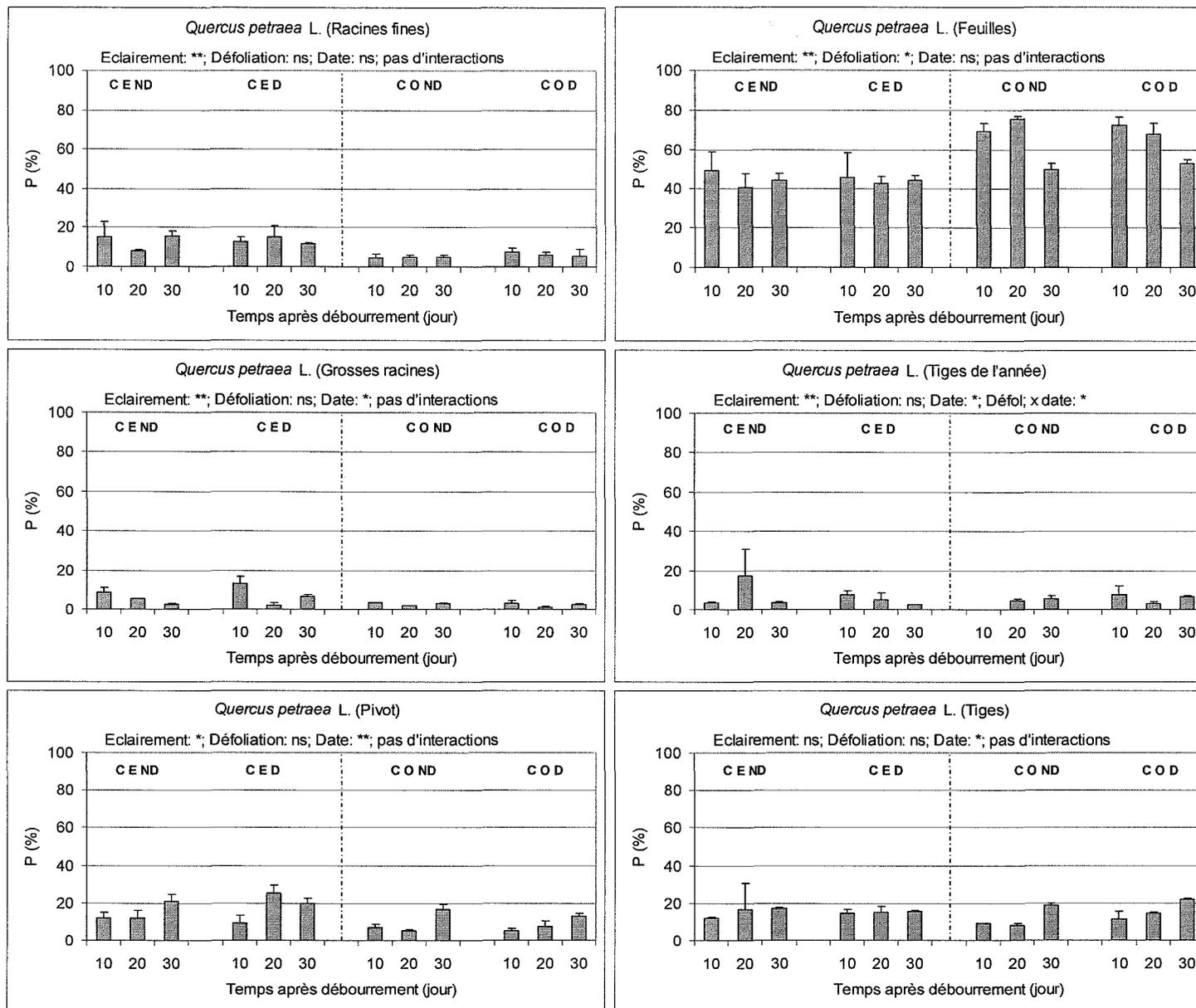


Figure 3.10. Evolution printanière de la répartition (P %) de l'azote nouvellement assimilé dans les organes aériens et souterrains de plants de chêne (C ; *Quercus petraea* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=4 à 5). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keul : (ns) non significatif ; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

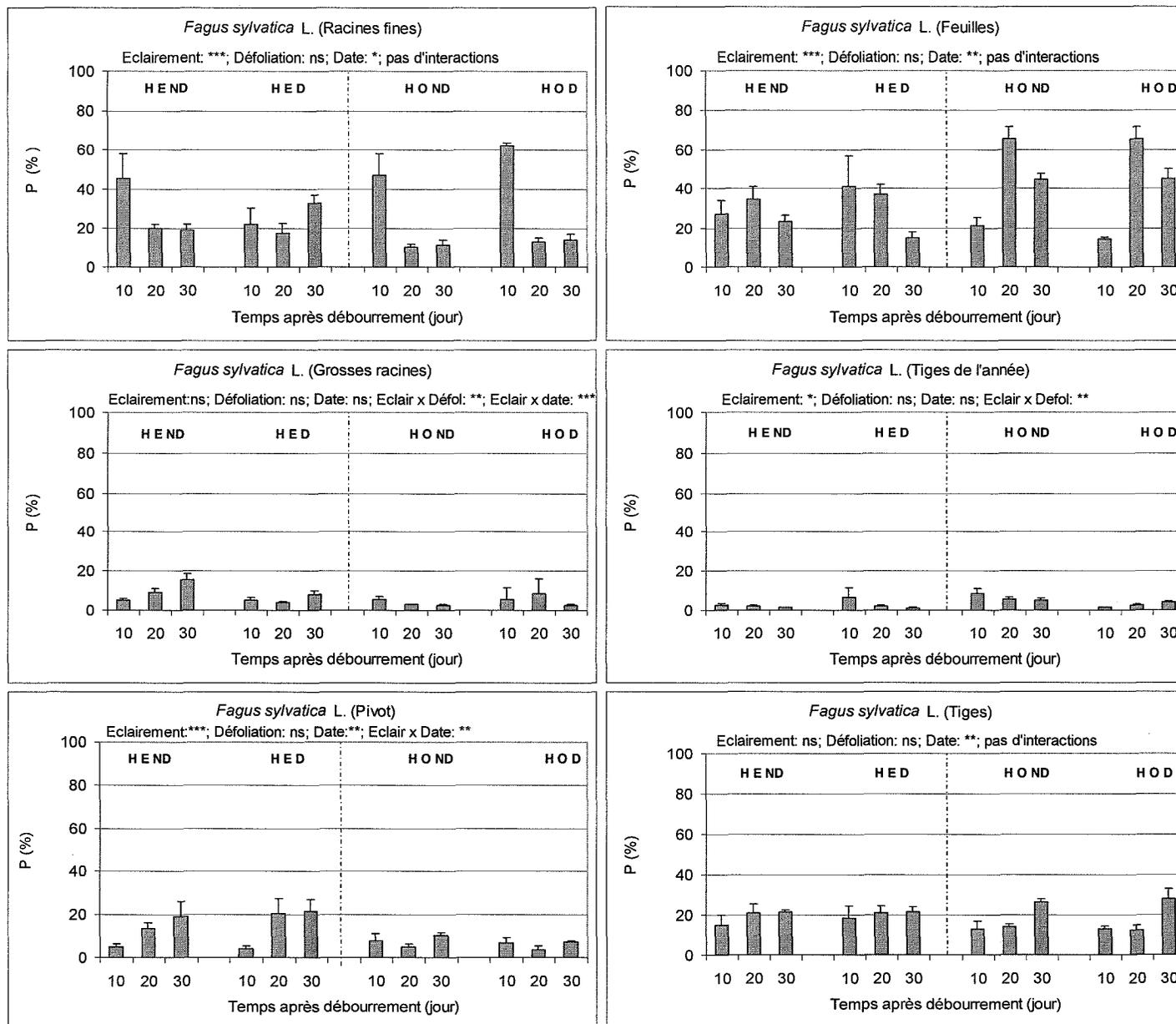


Figure 3.11. Evolution printanière de la répartition (P %) de l'azote nouvellement assimilé dans les organes aériens et souterrains de plants de hêtre (H ; *Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=4 à 5). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keul : (ns) non significatif ; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

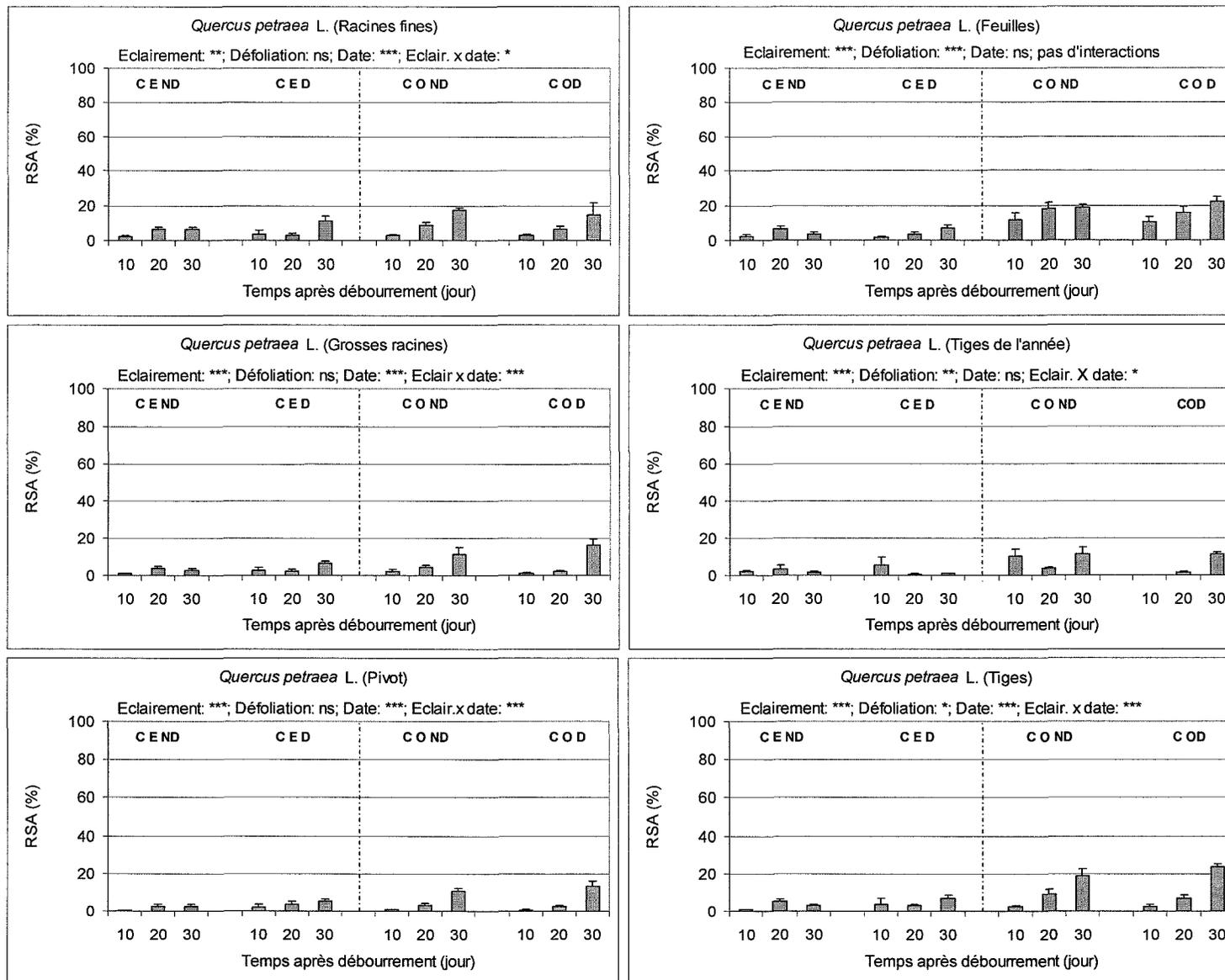


Figure 3.12. Evolution printanière de l'allocation relative spécifique (RSA %) dans les organes aériens et souterrains de plants de chêne (C ; *Quercus petraea* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=4 à 5). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keul : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

où elle est la plus faible (13 mg). L'accumulation d'azote la plus importante est observée dans les plants de hêtre ombrés et non défoliés.

A l'échelle des organes

L'ombrage et le temps affectent beaucoup la répartition de l'azote entre les organes chez le chêne et le hêtre alors que la défoliation n'a quasiment aucun effet quel que soit l'organe considéré (Figures 3.10 et 3.11).

L'azote nouvellement absorbé se retrouve essentiellement dans le feuillage en croissance où il varie entre 40 et 80% en fonction du traitement sans effet significatif du temps (Figure 3.10). La répartition dans les racines fines n'est pas affectée par le temps. Sous ombrage davantage d'azote est alloué aux feuilles (O : 60,9; E : 45,6%) et moins dans les racines fines (O : 6,4; E : 13,7 %), les grosses racines et le pivot (O : 10,5; E : 16,08%). Le temps affecte la répartition d'N nouveau dans tous les organes sauf dans les racines fines et les feuilles.

L'azote nouveau est retrouvé principalement dans les nouvelles feuilles où il varie entre 15 et 70 % en fonction du temps et de l'ombrage chez le hêtre (Figure 3.11). On en trouve aussi autour de 20 % dans les tiges et les racines fines, mais très peu dans les tiges de l'année (2 à 4%) et les grosses racines (<10%) (Figure 3.11).

Comme pour le chêne, dans le hêtre sous ombrage davantage d'azote est alloué aux feuilles (O : 53,6; E : 30,1%) et moins dans les racines fines (O : 14,5; E : 26,2 %), les grosses racines (O : 4,4; E : 8,0 %), et le pivot (O : 7,3; E : 13,3%). Les pourcentages de répartition varient dans le temps dans les racines fines, le pivot et les feuilles (Figure 3.11).

L'allocation relative spécifique (RSA) permet de suivre l'enrichissement de chaque organe considéré en N nouveau, et donc le renouvellement de son azote (Figures 3.12 et 3.13). Pour le chêne comme pour le hêtre la plupart des organes s'enrichissent en azote nouvellement absorbé au cours du temps. La défoliation joue peu sur cet enrichissement sauf sur les tiges et les tiges de l'année, pour lesquelles la défoliation limite un peu le renouvellement d'N. L'éclaircissement en revanche, affecte de façon très marquée le RSA de tous les organes du chêne, en particulier le RSA des feuilles. L'ombrage stimule le renouvellement de l'azote de tous les organes. L'effet est particulièrement marqué 30 jours après débourrement (Figure 3.12). Les organes renouvellent en moyenne moins de 10% de l'azote en pleine lumière, et autour de 10 à 20 % sous ombrage. Les feuilles et les tiges sont les organes dont le renouvellement de l'azote est le plus important sous ombrage (autour de 20%) (Figure 3.12).

Comparativement au chêne, le renouvellement de l'azote des organes chez le hêtre est peu marqué 10 et 20 jours après débourrement. Cependant, une très forte augmentation du RSA

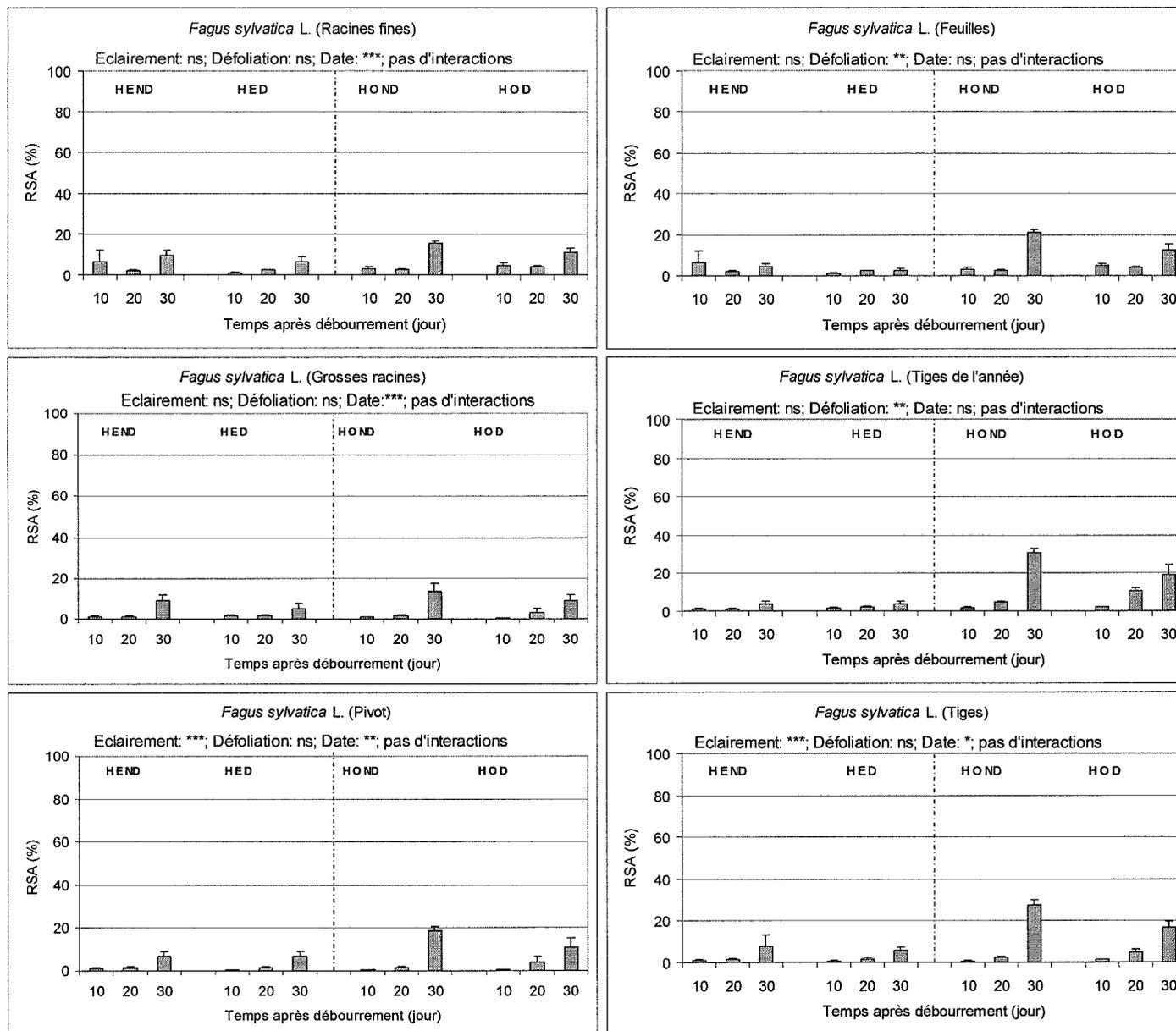


Figure 3.13. Evolution printanière de l'allocation relative spécifique (RSA %) dans les organes aériens et souterrains de plants de hêtre (H ; *Fagus sylvatica* L.) en deuxième année de croissance, et cultivés en pépinière depuis le semis. Les plants se sont développés en pleine lumière (E) ou sous ombrière (O) et ont été non défoliés (ND) ou soumis à une défoliation estivale (D) la première année. Les barres verticales sont les erreurs standard (n=4 à 5). Analyse Anova suivie du test Student-Neuman-Keul : (ns) non significatif ; (*) p<0,05 ; (**) p<0,01 ; (***) p<0,001.

des différents organes est observée 30 jours après débourrement (Figure 3.13), les feuilles des hêtres ombrés ont un RSA qui passe de 3 à 20%, mais la défoliation diminue par 2 ce renouvellement de l'azote dans les feuilles. Ce sont dans les parties aériennes que les RSA les plus élevés sont observés 30 jours après débourrement (Figure 3.13).

Ces résultats signifient, pour le chêne comme pour le hêtre qu'environ 80 % de l'azote des nouveaux organes est constitué d'azote ancien pour les plants ombrés. Les organes nouvellement formés (feuilles, tiges de l'année) sont quasiment exclusivement constitués d'azote ancien à plein éclaircissement et s'ils ont été défoliés l'année précédente.

Discussion.

Le développement normal des arbres peut être affecté lors d'attaques biotiques par des pathogènes ou des insectes qui se nourrissent de la biomasse foliaire, mais aussi par d'autres facteurs principalement d'ordre climatique (Koptur *et al* 2002). Dans notre étude nous avons fait une défoliation manuelle afin de simuler une défoliation en conditions naturelles. L'objectif est de déterminer l'impact d'une baisse de disponibilité en carbone et en azote sur l'accumulation des composés carbonés et azotés. La réduction de la surface foliaire entraîne non seulement une réduction de la surface photosynthétique mais perturbe également le métabolisme azoté du fait d'une perte importante d'azote foliaire [sous forme de rubisco, 85% de l'azote foliaire chez le Pommier (Millard et Thomson 1989) et de chlorophylles] qui s'est constitué au cours de la période précédant la défoliation et d'autre part du fait d'une réduction de la surface d'évapotranspiration, ce qui perturbe la nutrition minérale qui suit la défoliation.

Les études sur la tolérance à l'ombre chez les espèces ligneuses sont relativement récentes. Les espèces étudiées sont des conifères, tels *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii*, et *Tsuga heterophylla* (Bond *et al* 1999) et des feuillus adultes tels le chêne (*Quercus petraea*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*) (Hansen *et al* 2002). Nous avons cherché à savoir si les effets dus à l'ombrage/plein éclaircissement, modifiant davantage la disponibilité en carbone à celle en azote, sont différents de ceux de la défoliation.

Chez les deux espèces, en juin 2005 c'est-à-dire en fin de la phase de croissance printanière, la biomasse aérienne sur les arbres de chêne est réduite par l'ombrage (O) et la défoliation (ED et OD), Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Gieger et Thomas (2002) sur des arbres de *Q. petraea* et de *Q. robur* cultivés en conditions contrôlées.

Tableau 3. X Valeurs moyennes de paramètres foliaires pour de jeunes plants de *Quercus petraea* et *Fagus sylvatica* en juin 2005. Les plants ont été cultivés en pépinière sous deux traitements d'éclaircissement : E=plein éclaircissement, O=ombre et deux traitements de défoliation : D=Défolié, ND= Non défolié.

Espèce	Eclaircissement Défoliation	E		O	
		ND	D	ND	D
<i>Quercus petraea</i>	Surface foliaire (dm ²)	25.93	15.29	27.73	27.43
	Nombre de feuilles	293	173	160	175
	Surface foliaire individuelle moyenne (dm ² /feuille)	0.088	0.088	0.173	0.157
<i>Fagus sylvatica</i>	Surface foliaire (dm ²)	16.41	10.69	22.86	17.29
	Nombre de feuilles	341	222	230	191
	Surface foliaire individuelle moyenne (dm ² /feuille)	0.048	0.048	0.099	0.091

En novembre 2004, la défoliation de Juillet 2004 a induit une réduction de diamètre des tiges chez les deux espèces. Cette diminution peut être due à l'effet combiné d'une baisse des apports en photosynthétats (Gerhardt 1998) et à une baisse des exportations des photosynthétats vers les organes puits (Nykänen et Koricheva 2004) où une baisse de croissance cambiale peut se produire (Kramer et Kozlowski 1979).

En avril 2005, les chênes soumis à l'ombre sont plus grands que ceux à plein éclaircissement, ce qui peut être la conséquence du contrôle négatif de la synthèse d'auxines par la lumière (étiolement). Les plants à l'ombre sont plus hauts mais avec une biomasse aérienne des parties pérennes plus faible (30%). Ceci correspond alors à une densité plus faible des tissus due 1) à une photosynthèse limitée par la faible lumière depuis 2 saisons de croissance et/ou 2) à un investissement plus important dans la croissance en longueur (phototropisme) des organes pérennes. Il est toutefois intéressant de noter que l'ombrage a entraîné un doublement de la surface individuelle moyenne des feuilles (Tableau 3.X) ce qui supposerait que la capacité photosynthétique des chênes ombrés au cours de la dernière saison de croissance (2005) pourrait être améliorée.

Chez le hêtre, au contraire, la croissance en hauteur n'est pas modifiée par les différents traitements. Par contre, le plein éclaircissement a diminué significativement la surface foliaire de cette espèce adaptée à l'ombrage en Juin 2005. La surface foliaire individuelle moyenne est réduite de moitié par le plein éclaircissement (Tableau 3.X). La diminution de la surface foliaire des feuilles peut être le symptôme d'une carence en azote (Maillard *et al.* 2001) et serait lié au fait que le nitrate agit sur la division et l'allongement cellulaire (Radin et Boyer 1982).

En avril 2005, les chênes et les hêtres défoliés l'année précédente n'ont pas « récupéré », c'est-à-dire que leur nombre de feuilles reste plus faible que celui des témoins. Par contre, la défoliation ne semble pas affecter la surface individuelle moyenne des feuilles nouvellement formées.

La défoliation diminue significativement la biomasse aérienne des parties pérennes chez les jeunes chênes, sans doute à cause de la diminution de la photosynthèse qui a pénalisé la croissance des jeunes arbres en 2004 comme cela a été montré par Gerhardt (1998) chez des espèces forestières tropicales. Dans une étude chez de jeunes arbres d' *Eucalyptus globulus* la défoliation totale a réduit le diamètre de la tige (Collet et Neumann 2002), ce qui n'est pas le

cas du chêne. Comme la hauteur des plants n'est pas affectée par la défoliation, la baisse de biomasse pourrait s'expliquer par une densité plus faible des tissus.

La plupart des travaux étudiant les effets de date, de défoliation et d'autres facteurs de stress sur le fonctionnement d'espèces ligneuses, se focalisent sur la teneur en azote et en carbone au niveau de l'individu entier et des organes. En revanche, les impacts de ces facteurs sur le fonctionnement métabolique sont beaucoup moins connus. En particulier, de nombreuses études s'intéressent au stockage et à la remobilisation de l'azote sans détailler les composés biochimiques impliqués. Nos résultats montrent que, chez les deux espèces, chêne et hêtre, la défoliation et l'ombrage affectent les teneurs en composés carbonés et azotés et que la répartition entre ces composés est modifiée selon la condition d'éclaircissement et la défoliation appliquées. Cette étude se justifie d'autant plus que nous avons émis ci-avant l'hypothèse que la densité tissulaire des plants peut être modifiée dans certains cas.

L'amidon est souvent cité comme la forme de stockage glucidique prépondérante chez de nombreux arbres (Nelson et Dickson 1981, Stassen *et al* 1981, Tromp 1983, Witt et Sauter 1994) dont le chêne (Hoch *et al* 2003 et Barbaroux 2002 sur *Quercus petraea* et Vizoso 2004 sur *Quercus robur*) et le hêtre (Barbaroux 2002). Les données de la littérature indiquent que les réserves glucidiques peuvent représenter jusqu'à 35% de la matière sèche chez de jeunes arbres feuillus (Nelson et Dickson 1981, Tromp 1983, Dickson 1991).

Les résultats obtenus dans cette étude confirment que l'amidon est une forme de stockage importante des glucides chez le chêne sessile et le hêtre jeunes.

Chez le chêne sessile, la concentration moyenne en amidon (Tableau 3.III) du plant entier représente 12% de la biomasse et en novembre 2004, les concentrations sont comparables dans tous les organes.

Chez le hêtre, la concentration moyenne en amidon du plant entier représente 8% de la biomasse. Cette différence interspécifique a déjà été observée chez le chêne sessile et le hêtre adultes (Barbaroux *et al.* 2003, voir également le chapitre 1). Chez le hêtre, à la différence du chêne sessile, ce sont les parties souterraines qui accumulent le plus d'amidon. La concentration dans les tiges est 4 à 5 fois moins importante. La racine est habituellement décrite comme un organe important pour le stockage des réserves glucidiques (Hansen *et*

Granslund 1973, Bollmark *et al* 1999, Lacoïnte 2001, Ludovici *et al* 2002, Cerasoli *et al* 2004, Vizoso 2004, Heuvel 2005).

Suite à une défoliation, la quantité d'amidon dans la racine diminue parfois considérablement et peut devenir limitante pour la survie de l'arbre (Wargo 1996). La survie de l'arbre peut alors dépendre très directement des réserves d'amidon disponibles au moment de la défoliation (Wargo 1996). Dans notre étude, chez le chêne sessile, la quantité d'amidon à l'échelle de l'arbre n'est pas modifiée par la défoliation et l'ombrage (Tableau 3.II, ED vs END, OND vs E ND). Cette variable biochimique ne peut donc pas expliquer *a priori* l'hypothèse d'une densité tissulaire plus faible émise précédemment (ED et O ND). Il est cependant important de signaler que les dosages d'amidon n'ont pu, faute de temps, être réalisés en Juin 2005, date à laquelle la biomasse a été estimée.

Les plants défoliés en plein éclaircissement (ED) et à l'ombre (O ND) montrent une baisse de la quantité d'amidon au niveau du plant entier entre novembre 2004 et avril 2005. Cette baisse d'amidon peut être due à une plus forte respiration de maintenance hivernale. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en sortie de période hivernale, un stock d'amidon plus faible (bien que non significatif) chez les plants défoliés peut constituer un facteur limitant pour la croissance aérienne.

Chez le hêtre, suite à la défoliation de Juillet 2004, la surface foliaire est réduite chez les plants ED alors que les plants ont reconstitué en 4 mois un nombre comparable de feuilles. Ceci suppose que pendant cette période, les feuilles produites ont une plus petite surface individuelle. Dans les organes pérennes, les concentrations en amidon sont comparables pour les plants END et ED. On pourrait envisager que moins de carbone issu de la mobilisation des réserves produites en 2004 serait alloué à ces feuilles plus petites. D'ailleurs, bien que cela ne soit pas significatif, les concentrations en amidon semblent plus élevées dans les organes pérennes des plants ED par rapport aux plants END. Encore une fois, les valeurs de Juin 2005 nous auraient donné plus de renseignements.

Chez le chêne sessile et le hêtre, les concentrations en sucres solubles sont de l'ordre de 3 à 4% de la biomasse au niveau du plant entier. Ce qui est plus faible que les concentrations observées pour l'amidon. Ceci reflète une forte capacité métabolique de ces composés, utilisés directement pour la biosynthèse de très nombreux composés. De plus, cette faible

concentration a l'avantage d'éviter tout problème osmotique. Chez le hêtre, à la différence du chêne sessile, ce sont les parties souterraines qui accumulent le plus de sucres solubles. La concentration dans les tiges est 2 à 3 fois moins importante en novembre 2004.

En novembre 2004, la défoliation de juillet 2004 et l'ombrage ont diminué la concentration en sucres solubles dans la tige et dans les racines fines chez le chêne sessile ce qui peut refléter soit un apport de photosynthétats plus faible (à l'échelle du plant les concentrations semblent effectivement plus faibles, mais de manière non significative) soit une répartition différente des photosynthétats dans les organes du plants au bénéfice des grosses racines et du pivot. En effet, chez ces mêmes plants, les concentrations en sucres solubles y sont comparables à celles des témoins (END). En janvier 2005, cet effet n'est plus observé dans les tiges mais devient significatif dans les pivots.

En janvier 2005, dans tous les organes du chêne sessile témoin (END) et dans la tige du hêtre témoin (O ND), la concentrations en sucres solubles est plus élevée que celle du mois de novembre quel que soit le traitement. Ceci pourrait refléter la mobilisation de sucres osmotiquement actifs pour la résistance des tissus au gel (Sakai et Larcher 1987).

Le pivot est l'organe qui présente les plus grandes concentrations et quantités en composés azotés et carbonés. Ce fait confirme l'importance des racines pour le stockage de l'azote sous forme d'acides aminés et de protéines solubles totales (Titus et Kang 1982, Policarpo *et al* 2002).

Chez le chêne sessile et le hêtre, les concentrations en protéines et en acides aminés sont respectivement de 0,6 et 0,4% de la biomasse au niveau du plant entier. Ce qui est 10 fois plus faible que les concentrations observées pour l'amidon. Les concentrations en protéines solubles totales sont comparables à celles que nous avons observé dans le chapitre 1 pour le chêne sessile adulte (0,60% MS) et le hêtre (0,35%). Par contre, dans l'aubier des chênes pédonculés adultes (chapitre 2), les concentrations sont plus faibles pour les protéines et les acides aminés, soit, respectivement, de 0,2 et 0,1% de la biomasse au niveau du plant entier.

Les protéines et les acides aminés peuvent servir comme composés de stockage de l'azote chez les arbres (Wetzel et Greenwood 1991), mais parfois, une forme biochimique domine sur l'autre. Chez le chêne, les concentrations en protéines et en acides aminés sont comparables (0,7 et 0,6% de la biomasse, respectivement). Chez le hêtre, les concentrations sont également

comparables (protéines 0,4% MS et acides aminés 0,3% MS). Dans le chapitre 1, nous n'avons pas dosé les acides aminés.

Ce résultat a déjà été observé chez de jeunes plants de chêne pédonculé (Vizoso 2004) où la concentration dans les tiges est de 0,69% MS et de 0,53% MS pour les protéines et les acides aminés, respectivement.

Le pommier, le pêcher (Schneider 1958 et Oland 1959 cités dans Zapata 1998 ; Oland 1954, Taylor et Van den Ende 1969 et 1970 cités dans Stepien 1992), la vigne (Kliewer et Cook 1974, Schaller et al 1989 et Kliewer 1991 cités dans Zapata 1998) ou les espèces du genre *Citrus* (Kato 1986) stockent l'azote préférentiellement sous forme d'acides aminés. Chez le chêne pédonculé adulte, nous avons montré (chapitre 2) qu'au contraire, la concentration en protéines solubles est 2 fois plus importante que celle des acides aminés.

En ce qui concerne la distribution entre organes, en novembre, chez les plants témoins, les concentrations en protéines solubles totales sont réparties de manière homogène entre les différents compartiments quelle que soit l'espèce. Par contre, en novembre, chez les plants témoins, les concentrations en acides aminés sont plus importantes dans les grosses racines et le pivot, quelle que soit l'espèce.

Chez le hêtre, suite à la défoliation de juillet 2004, la surface foliaire est réduite chez les plants ED alors que les plants ont reconstitué en 4 mois un nombre comparable de feuilles. Ceci suppose que pendant cette période, les feuilles produites ont une plus petite surface individuelle. Dans les organes pérennes, les concentrations en protéines sont comparables pour les plants END et ED.

Chez le chêne sessile, en novembre, la concentration en protéines solubles totales à l'échelle de l'arbre est diminuée de moitié par la défoliation et l'ombrage (Tableau 3.VI, ED vs END, OND vs E ND). La baisse de la concentration pourrait être un effet de la défoliation sur la disponibilité en azote. Elle pourrait expliquer l'hypothèse émise précédemment d'une densité tissulaire plus faible (ED et O ND) et qui s'exprimerait en juin 2005. En effet, le fait qu'il y ait moins de protéines accumulées en phase hivernale laisse supposer que 1) moins d'azote sera disponible pour permettre l'étalement des feuilles et 2) qu'il y aura probablement des perturbations de l'absorption d'azote au printemps puisque ces mécanismes font appel à des transporteurs protéiques.

L'azote mis en réserve dans les parties pérennes avant l'hiver joue un rôle essentiel pour la reprise de végétation. Il a en effet été montré sur différentes espèces ligneuses que très peu d'azote est absorbé à cette période quelle que soit la disponibilité en azote du sol (Millard & Neilsen 1982, Millard 1996 ; Zapata 1998). Par conséquent, la croissance printanière sera plus affectée par ses stocks internes d'N que par une faible absorption minérale. Or, nous avons pu constater que les stocks d'azote total du chêne et du hêtre disponibles au printemps sont significativement altérés par l'ombrage pour le chêne (Figure 3.2) et la défoliation pour le hêtre (Figure 3.9).

En ce qui concerne le chêne, l'ombrage aboutit au printemps à une augmentation de la concentration en azote total (Figure 3.9) bien que la concentration en acides aminés et protéines solubles dosés ne soit pas affectée (Tableaux 3.VI et 3.VIII). A ce résultat s'ajoute le fait que sous ombrage, l'absorption minérale est drastiquement augmentée (doublée voire triplée pour les plants défoliés) comparativement à celle observée en plein éclaircissement (Figure 3.9). En toute hypothèse, la situation d'ombrage crée un besoin en azote supplémentaire pour la croissance, qui stimule l'absorption d'azote, l'augmentation de la concentration en azote total étant due à des composés non dosés, tels que les nitrates. La défoliation combinée à l'ombrage crée un déficit supplémentaire en acides aminés et protéines solubles (Tableaux 3.VI et 3.VIII). Cependant, malgré le surcroît d'absorption azotée, la biomasse des plants ombrés est diminuée, particulièrement lorsqu'ils ont été défoliés l'année précédente. Les plants ombrés et défoliés présentent donc probablement des diminutions en composés azotés qu'une absorption minérale supplémentaire ne peut combler, limitant alors les possibilités de croissance printanière (Tableau 3.1).

En ce qui concerne le hêtre, l'ombrage ne joue ni sur la quantité ni sur la concentration en azote total à l'échelle du plant entier (Figures 3.2 et 3.9). En revanche, la défoliation aboutit à une diminution marquée de la quantité d'azote totale dans les plants (Figure 3.2). Cette diminution de la quantité d'azote total ne s'accompagne d'aucun changement au niveau des concentrations et des quantités en acides aminés et en protéines solubles totales (Tableaux 3.VII et 3.IX). L'utilisation du marquage ^{15}N nous a permis de montrer que l'absorption minérale par le hêtre est stimulée en situation d'ombrage. Cette stimulation liée à l'ombrage est cependant freinée par la défoliation (Figure 3.9). L'ombrage est la situation qui convient le mieux au hêtre, espèce sciaphile. Il est donc possible qu'à plein éclaircissement, l'absorption minérale soit moins efficace. L'effet stimulant de l'ombrage sur l'absorption minérale par les

deux espèces, n'aurait pas la même cause : pour le chêne elle serait liée à une carence en composés azotés générée par des conditions d'éclaircissement ne correspondant pas à son statut d'espèce héliophile, alors que pour le hêtre, aucune diminution de composés azotés n'étant observée, la stimulation d'entrée d'azote serait davantage liée aux conditions de croissance plus favorables (espèce ombrophile) et à l'augmentation de la surface foliaire des plants observée (Tableau 3.I).

Quel que soit le traitement appliqué, et quelle que soit l'espèce considérée, l'azote nouvellement assimilé est fortement orienté vers les parties aériennes, essentiellement les feuilles en croissance, et les tiges (Figures 3.10 et 3.11). Aucune accumulation particulière de C n'est observée dans les parties racinaires des deux espèces. Chez le chêne, les tiges de l'année, bien qu'étant très concentrées en azote du fait de leur statut d'organe jeune (Figures 3.7 et 3.8) renouvellent moins de 10% de leur azote (Figure 3.12). On peut donc en conclure que leur croissance utilise quasi exclusivement des réserves azotées, alors que les feuilles utilisent toutes les sources d'azote disponibles et ont renouvelé lorsqu'elles sont adultes 20% en moyenne de leur azote (Figure 3.12). En revanche, les tiges de l'année de hêtre ont, en fin de croissance printanière, renouvelé au moins autant leur azote que les feuilles, soit environ 20% de leur azote total en situation d'ombrage (Figure 3.13). Le chêne et le hêtre jeunes diffèrent donc dans leur gestion de l'azote au cours de la croissance printanière, de façon particulièrement visible en situation d'ombrage. Ce résultat est en accord avec la littérature qui montre que le degré de dépendance des nouveaux organes vis-à-vis de l'azote de réserve, est variable selon l'espèce considérée (Millard & Proe 1994, Policarpo et al. 2002).

L'azote chez le chêne sessile en début de croissance printanière est essentiellement localisé dans le pivot, alors que chez le hêtre, les plus grandes quantités d'azote sont trouvées dans les tiges et les racines fines (Figures 3.4 et 3.6). Ce résultat, pour le hêtre issu de semis, indique que toute perte de racines fines accidentelle, peut-être très pénalisante pour la reprise de croissance en forêt, dans le cadre d'une régénération forestière. En accord avec Millard *et al.* (2001) la capacité des arbres à récupérer après une défoliation dépend des sites de stockage et de la disponibilité en azote. On peut donc supposer que le chêne sessile jeune pourra sans trop de dommage, perdre temporairement des racines fines et puiser l'azote nécessaire à sa croissance dans les réserves du pivot, contrairement au hêtre plus vulnérable du fait de la quasi absence d'azote dans son pivot.

L'azote mobilisé à partir des organes de stockage est remplacé par de l'azote nouvellement assimilé, pour les deux espèces et qu'il y ait défoliation et ombrage ou non (Figures 3.12 et 3.13). Ce résultat obtenu grâce à notre marquage ^{15}N explique en partie, les relativement faibles diminutions de concentration en azote observées au cours du temps dans les parties pérennes. Le chêne sessile et le hêtre issus de semis et en deuxième année de croissance ne montrent pas de remobilisation quasi totale de leurs réserves azotées, la part d'azote ancien restant très importante et la concentration en azote total diminuant peu dans les organes de stockage. Ce résultat diffère des observations de certains auteurs dont Millard (1996) qui montre des remobilisations très intenses voire quasi totales à partir des organes de réserve d'arbres fruitiers. Le marquage ^{15}N de jeunes plants de hêtre et de chêne cultivés en pépinière à l'INRA de Champenoux, a permis de montrer que l'absorption minérale joue un rôle non négligeable dans la croissance printanière et qu'elle permet trente jours après débourrement le renouvellement de 5 à 20 % de l'azote total du plant, selon les conditions d'éclaircissement et de défoliation appliqués. Des expériences de marquage menées sur ces deux espèces au stade adulte et sur sols forestiers pauvres en azote, permettraient de comprendre si ce renouvellement important est lié à la jeunesse ou non. Nous pouvons seulement conclure qu'il n'y a pas de différence interspécifique marquée quant au renouvellement de l'azote au sein de jeunes plants bien fertilisés.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Pour conclure, le travail a conduit à mettre en avant différents points de discussion qui synthétisent les travaux réalisés pour les 3 chapitres. Cette synthèse permet de proposer des perspectives et les prochains objectifs du thème « réserves » de l'UMR.

Comparaison interspécifique, comparaison stades adultes / juvéniles

Ce travail de thèse nous permet de comparer la composition de la biomasse en composés azotés (protéines solubles totales, acides aminés) et en composés carbonés (amidon et sucres solubles) pour trois espèces forestières, d'intérêt économique important et qui sont largement répandues en France.

De manière à comparer nos résultats entre eux (en tenant compte de la biomasse des différents plants) et ceux déjà obtenus dans notre équipe (Barbaroux 2002, Vizoso 2004), nous avons regroupé certaines données dans le tableau d.I. Nous avons choisi des valeurs du mois d'octobre ou de janvier, suivant les données disponibles.

Les teneurs en C (g/kg biomasse) sont stables quels que soient l'espèce et l'âge du plant. Nous avons d'ailleurs observé, dans chaque expérience, des relations très fortes entre carbone total et biomasse ($R^2 > 0.99$, non montré). Ce type de relation est couramment observé, la biomasse étant constituée pour près de 50% par du carbone et la croissance relative étant ajustée à l'efficacité photosynthétique (Portsmouth et Niinemets 2006).

Les teneurs en N (g/kg biomasse) sont presque 10 fois plus importantes chez les jeunes plants que chez les arbres adultes, quelle que soit l'espèce. Chez le pommier, les teneurs en azote du tronc et des racines sont aussi d'autant plus élevées que les tissus sont jeunes (Kozłowski et Pallardy 1997). Ce type de résultat est d'une portée générale puisque observé également chez les herbacées (Zhao et Oosterhuis 1999, Fageria 2004) Les plus fortes teneurs en azote se

Tableau d.I. Tableau de comparaison des teneurs en carbone total, de l'azote total, du C-Amidon, de l'N-Protéines exprimées en g par kg de biomasse chez le chêne pédonculé, le chêne sessile et le hêtre à différents âges. Contribution du C de l'amidon au C total (C Amidon %C), contribution de l'N-Protéines à l'azote total (N Prot % N), rapports C/N et rapport C-Amidon/N Protéines.

			Biomasse totale (kg)	g par kg biomasse					
				C	N	C Amidon	N protéines		
chêne ped	tout	3 ans	0.058	374.15	12.70	189.81	2.26	Vizoso 2004	
hêtre	tout	3 ans	0.033	467.27	12.36	57.33	2.44	Valenzuela 2006	
chêne sessile	tout	3 ans	0.072	458.78	13.33	59.17	2.62	Valenzuela 2006	
chêne ped	aubier	20 ans	18.63	460.12	1.73	39.51	0.58	Valenzuela 2006	
hêtre	aubier	45ans	125.5	460.00	1.50	7.01	0.57	Barbaroux 2002	Valenzuela 2006
chêne sessile	aubier	45 ans	156.5	480.00	1.10	15.34	0.91	Barbaroux 2002	Valenzuela 2006

			C Amidon% C	N Prot % N	C/N	C Am/N Prot
chêne ped	tout	3 ans	50.73	17.77	29.5	84.1
hêtre	tout	3 ans	12.27	19.75	37.8	23.5
chêne sessile	tout	3 ans	12.90	19.65	34.4	22.6
chêne ped	aubier	20 ans	8.59	33.62	265.5	67.8
hêtre	aubier	45ans	1.52	37.94	306.7	12.3
chêne sessile	aubier	45 ans	3.19	82.98	436.4	16.8

trouvent toujours dans les tissus ayant une activité physiologique importante tels que le cambium, les apex racinaires et caulinaires. Elles reflètent le besoin en composés azotés nécessaire à la biosynthèse. Les teneurs en N Protéique sont d'ailleurs 3 à 4 fois plus importantes chez les jeunes plants que chez les arbres adultes, quelle que soit l'espèce. L'N protéique représente 17% de l'azote total chez les arbres adultes et 33 à 83% de l'azote total chez les jeunes plants. Ce résultat confirme le lien fort entre teneur en azote et âge du plant.

Le rapport C/N est presque 10 fois plus faible chez les jeunes plants, ce qui est dû à leur teneur élevée en azote total. Les valeurs pour une tranche d'âge donnée sont comparables entre espèces.

Le chêne pédonculé a des teneurs en C-Amidon toujours 3 fois plus élevées que le chêne sessile et le hêtre, quel que soit l'âge. Chez le chêne pédonculé, le C-Amidon représente des fractions de carbone total importantes. De plus, l'amidon contribue au carbone total pour une fraction plus importante chez les jeunes plants : 50% contre 8% chez les arbres adultes. Chez le hêtre et le chêne sessile, les teneurs sont comparables pour un même âge, mais les jeunes plants ont des teneurs en C-Amidon également plus importantes. Chez ces deux espèces, il représente une fraction plus importante du carbone total chez les jeunes plants : 12% contre 1,5-3% chez les arbres adultes. Dans les arbres adultes, une part importante de la biomasse est constituée de composés carbonés structuraux tels que lignine, cellulose qui sont des structures non mobilisables, accumulées d'année en année alors que le stock d'amidon (ou au moins une partie) est utilisé au printemps puis reconstitué en fin de saison de croissance.

Chez le chêne pédonculé, le rapport C-Amidon/N Protéines est plus élevé que celui des autres espèces, quel que soit l'âge. Ceci est dû aux teneurs plus importantes en C-Amidon. Chez le hêtre et le chêne sessile, les rapports C-Amidon/N Protéines sont comparables pour un même âge et deux fois plus importants chez les jeunes plants par rapport aux arbres. Il s'agit peut être d'une différence d'origine génétique que nous ne pouvons expliquer.

Sur les 3 espèces que nous avons étudiées, la principale différence à noter est la concentration plus élevée en amidon dans le chêne pédonculé par rapport aux 2 autres espèces, chêne sessile et hêtre. Cette différence est observée autant chez les plants de 3 ans que chez des arbres adultes. Chez le chêne sessile adulte, les teneurs en N-Protéines et en C-amidon semblent plus élevée que celles du hêtre, c'est ce que nous avons observé dans le chapitre 1.

D'une manière générale, ramenées à la biomasse totale, les teneurs en azote total et en N-Protéines sont comparables pour une tranche d'âge donnée. Des valeurs élevées en azote

total caractérisent un état juvénile. Les rapports C/N sont aussi comparables entre espèces pour une tranche d'âge donnée, des valeurs basses caractérisent un état juvénile.

Enfin, de manière très intéressante, cette comparaison des espèces aux stades juvénile et adulte a permis la mise en évidence de mécanismes physiologiques totalement différents, liés à la phénologie. Cet aspect, rarement considéré, montre clairement les limites des travaux réalisés sur de jeunes plants et renforce la nécessité de multiplier les études à l'échelle de l'arbre.

L'effet de l'âge méritera d'être approfondi, avec en particulier une extension à des âges plus avancés, impliquant des arbres capables de fructifier. Ces recherches viennent de débiter dans le cadre d'une nouvelle thèse, qui s'appuiera sur deux chrono-séquences, l'une en Bretagne pour le hêtre et l'autre en Lorraine pour le chêne. Dans ce dernier dispositif en situation naturelle, l'analyse de l'effet de l'âge sera compliquée par des interactions avec des défoliations récentes et récurrentes par la processionnaire du chêne et les géométrides, qui ont perturbé la dynamique des réserves carbonées (Bréda, comm. pers.). L'hypothèse de travail repose sur une différence d'allocation du carbone entre parties aérienne et souterraine induite par l'âge, couplant à la fois un effet sur les équilibres biomasses et les distributions des concentrations en réserves. Les arbres jeunes auraient une biomasse de racines plus importante, comportant de fortes concentrations en TNC. A l'inverse, les arbres âgés disposeraient de biomasses aériennes nettement supérieures : la plus faible teneur en TNC sera-t-elle compensée par l'effet dimension du compartiment majeur qu'est le tronc ?

Pour étendre les résultats acquis sur jeunes plants, nous envisageons de quantifier l'impact de la fertilité minérale sur des arbres adultes, en s'appuyant sur des dispositifs de fertilisation, récente ou ancienne mais à date connue, permettant de comparer *in situ* des arbres témoins sur station pauvre et des arbres proches, du même âge, soumis à climat et gestion identiques. Nous analyserons comment la fertilisation modifie les règles d'allocation du carbone entre croissance et mise en réserve, en fonction d'indicateur de nutrition minérale. Le recours à de nouveaux indicateurs dans le bois sera développé (dendrochimie), en particulier pour l'azote. La fraction structurale de l'azote, fixée dans les parois cellulaires (extensines) seront recherchées, identifiées et extraites pour dosages isotopiques d'azote attaché à une année particulière (l'année d'élaboration du cerne).

Méthodologies de caractérisation de réserves

Cette étude a également porté sur la caractérisation des réserves carbonées et azotées. Dans ce sens, deux méthodologies ont été mises en œuvre :

Dans les deux premiers chapitres, nous avons estimé les réserves par différences des quantités présentes dans l'arbre à deux dates correspondant aux deux stades phénologiques clés (juste avant chute des feuilles et débourrement).

Ainsi, le chêne pédonculé, âgé de 20 ans, a utilisé, entre octobre et juin, seulement 29% de l'amidon présent en octobre et 54% des protéines présentes à cette date alors que le chêne sessile, âgé de 45 ans, a utilisé 40% de l'amidon présent en octobre et 14% des protéines présentes aux mêmes dates (Tableau 2.XV). Nous avons utilisé, pour cela, des méthodes destructives, lourdes, mais donnant accès à des détails dans tous les compartiments des arbres. Le matériel fourni est abondant, et tous les dosages souhaités sont réalisables. La limite majeure de cette approche est qu'il s'agit d'une description statique d'un état à un moment donné, qui ne permet pas de distinguer ce qui est « ancien », donc qui provient des réserves, ce qui est utilisé pour la respiration de maintenance hivernale et ce qui est nouvellement assimilé, soit par photosynthèse pour le C soit par les racines pour l'azote. Le choix des dates est théoriquement définissable par rapport aux événements phénologiques clés (débourrement, début ou arrêt de croissance, chute des feuilles), la lourdeur des abattages ne permet pas de procéder à 4 abattages par saison. La difficulté réside dans le choix d'une date pour décrire un état instable, où les flux internes et externes de carbone, d'eau et d'azote sont très actifs.

Dans le troisième chapitre, nous avons aussi utilisé la technique de marquage à l'azote ^{15}N , qui a permis de distinguer la part d'azote néo-assimilé de celle provenant de la remobilisation des réserves. Grâce à cette technique de marquage nous pourrions dans un futur proche quantifier dans nos plants marqués la part de chacun des composés (protéines, acides aminés, amides, nitrates) intervenant dans ces flux. En effet, nous disposerons d'un accès à une CG-MS (projet déposé IFR 110) permettant de quantifier le rapport isotopique $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$ de chaque fraction biochimique préalablement purifiée. Par ailleurs, par manque de temps et dans le cas précis de cette expérience, nous n'avons pas pu doser les composés carbonés et azotés sur la cinétique d'avril à juin 2005. De ce fait, nous ne pouvons pas pour l'instant relier des différences éventuelles de mobilisation des réserves carbonées et azotées avec les traitements lumière et défoliation appliqués, ni identifier des protéines de stockage en utilisant la méthodologie retenue pour les deux premiers chapitres..

Afin de pouvoir vérifier et quantifier l'importance de l'absorption minérale en tant que source d'azote pour la croissance printanière chez le chêne et le hêtre, nous avons différencié l'azote issu de l'absorption minérale de printemps de celui des réserves, en le marquant à l'aide de ^{15}N .

Nous avons trois choix de protocoles : soit (1) réaliser un marquage continu toute l'année, afin de marquer l'ensemble de l'azote des plants absorbé l'année n et ainsi conférer un signal isotopique stable à nos réserves formées cette année là comme dans Zapata (1998), soit (2) faire un marquage long d'un ou deux mois à l'automne, lorsque la mise en réserve de l'azote est maximale comme dans Vizoso (2004) , soit enfin (3) marquer l'azote du sol au printemps afin de suivre son absorption dans le plant pendant la croissance printanière, méthode très pratiquée par l'équipe de Peter Millard. Nous avons choisi cette dernière méthode, car c'est la moins contraignante en temps et en manipulation, et financièrement acceptable comparativement à la première méthode. En outre, la deuxième méthode ne nous permet pas de garantir que le signal isotopique de nos réserves ainsi marquées est stable et constant car la période de marquage reste courte. La troisième et dernière méthode est aussi la plus fiable en terme d'interprétation des résultats, les deux sources d'azote (réserves, assimilats) ayant un signal isotopique à la fois distinct et stable dans le temps.

Dans le contexte de l'expérience 3 un marquage ^{13}C aurait permis de voir l'importance de la nouvelle assimilation de C dans le carbone total, et dans sa contribution à la nouvelle croissance et au stockage. Cependant, le plant étant hétérotrophe au printemps du fait de l'absence de feuilles, nous savions pertinemment que les réserves carbonées étaient la source unique de C au moins jusqu'à ce que les nouvelles feuilles deviennent exportatrices de C. Donc l'intérêt d'un marquage ^{13}C dans ce contexte était modéré. Cette connaissance nous ne l'avions pas pour l'azote, car dès le débourrement deux sources d'N sont potentiellement disponibles. Un marquage ^{13}C des plants aurait nécessité un marquage continu jusqu'à l'étalement complet du feuillage pour les deux espèces et les quatre traitements, et nos conditions expérimentales locales (une seule chambre de marquage) ne le permettaient pas.

Enfin, par l'une ou l'autre des approches, la comparaison des réserves carbonée et azotée à l'échelle d'un arbre a mis en avant des difficultés liées à des découplages entre carbone et azote bien que les deux métabolismes soient interdépendants. Le décalage semble, tout d'abord, être lié à une échelle de temps, les mobilisations des réserves carbonées et azotées ne semblent, en effet, pas synchrones. De plus, nous devons tenir compte dans le budget global

de pertes de carbone liées à la respiration de maintenance hivernale alors que l'azote reste relativement stable pendant cette période.

Caractérisation d'une VSP

Nous avons pu caractériser un polypeptide de 25kDa, dans l'aubier du tronc de chêne pédonculé (photo 2.2) et dans les cernes de chêne sessile (photo 2.5). A l'automne, ce polypeptide représente environ 46% des protéines solubles totales à la base du houppier. Ce polypeptide, absent au printemps, présente toutes les caractéristiques d'une protéine de réserve (VSP). Le travail de caractérisation d'une ou plusieurs VSP reste à faire chez le hêtre.

La mise en évidence de cette VSP dans le tronc de chêne pédonculé ouvre de nombreuses perspectives qui permettront d'une part de la caractériser et d'autre part de produire un marqueur de reprise de croissance. Les résultats dans les cernes sont dans ce sens très encourageants puisqu'il est possible de caractériser le polypeptide sur un cerne (Photo 2.5). Il est prévu dans une première étape de réaliser des carotages mensuels dans le tronc d'arbres non défoliés et défoliés avec des degrés d'atteinte variables (jusqu'à des arbres morts) de manière à voir s'il est possible d'associer la présence du polypeptide à la reprise de croissance, l'année suivante.

L'écorce a été montrée dans la littérature comme particulièrement riche en protéines solubles et plus particulièrement en VSP (appelées dans ce cas BSP pour bark storage proteins). Cependant, il nous a été impossible de travailler sur l'écorce de chêne adulte du fait de sa trop grande richesse en tannins interférant avec nos dosages. A ce jour, nous ne pouvons pas dire si des VSP sont également présentes dans l'écorce des chênes pédonculés.

Ce travail démontre la réalité de l'intégration des fonctionnements cellulaires à l'écologie des essences, grâce à une collaboration effective entre trois équipes Ecophysiologie cellulaire, Bioclimatologie et Ecophysiologie et Phytoécologie. La faisabilité des changements d'échelles associés est réelle, elle nécessite une adaptation des stratégies d'échantillonnage et une réflexion sur les compromis réalistes pour chacune des équipes. C'est sur ce point que l'effort devra porter, en particulier pour confier des travaux de recherche doctorale compatibles avec le délai de rigueur de 3 ans.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Académie des Sciences. 1990. L'effet de serre et ses conséquences climatiques, évaluation scientifique – rapport N° 25
- Alberts B.M., Johnson A., Lewis J. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science Editor, 3rd edn.
- Arora R., Wisniewski M. E., Scorza R. 1992. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Physiol.* 99: 1562 – 1568
- Ayres E., Heath J., Possell M., Black H. I. J., Kerstiens G., Bardgett R. D. 2004. Tree physiological responses to above-ground herbivory directly modify below-ground processes of soil carbon and nitrogen cycling. *Ecology Letters* 7: 469 – 479
- Barbaroux C., 2002. : Analyse et modélisation des flux de carbone de peuplements forestiers pour la compréhension de la croissance de 2 espèces feuillues *Quercus petraea* et *Fagus sylvatica*. Thèse de Doctorat, Université de Paris XI – Orsay, 183 p.
- Barbaroux C., Bréda N. 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse porous beech trees. *Tree Physiology* 22: 1201 – 1210
- Barbaroux C., Bréda N., Dufrêne E. 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 157: 605–615
- Bergmeyer H. U., Bernt E. 1974, Methods of enzymatic food analysis using single reagents. *Academic Press*, Ed. Bergmeyer, New York :1176-1179.
- Bollmark L., Sennerby-Forsse L., Ericsson T. 1999. Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting-derived *Salix viminalis* plants. *Can. J. For. Res.* 29: 85-94
- Bond B. J., Farnsworth B. T., Coulombe R. A., Winner W. E. 1999. Foliage physiology and biochemistry in response to light gradients in conifers with varying shade tolerance. *Oecologia.* 120: 183 – 192
- Bory G., Clair-Maczulajtys D. 1988. L'étude des métabolites de réserve. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 135, *Actual. Bot.* 1: 5-8
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dry binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254
- Bréda N. 1994. Analyse du fonctionnement hydrique des chênes sessile (*Quercus petraea*) et pédonculé (*Q. robur*) en conditions naturelles ; effets des facteurs du milieu et de l'éclaircie. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy, 59 p + publications
- Bréda N., Granier A. 1996. Intra an interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak (*Quercus petraea*). *Ann. Sci. For.* 53: 521-536
- Bréda N., Granier A., Aussenac G. 2000. Evolutions possibles des contraintes climatiques et conséquences pour la croissance des arbres. *Revue Forestière Française* N° sp.2000: 73 – 90
- Bréda N., Granier A., Barataud F., Moyne C. 1995. Soil water dynamics in an oak stand. Part I: Soil moisture, water potentials and water uptake by roots. *Plant and Soil* 172: 17 – 27

- Brouquisse R., Fischer A. et Raymond P. 1997. La protéolyse chez les plantes supérieures : nature, fonction et régulation. *In: Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire.* Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Brucciamacchie M., 1982. Structure, croissance et biomasse des régénérations naturelles de chêne rouvre (*Quercus petraea* Liebl.). Mémoire ENITEF, 45 p.
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *Plant Cell*. 7: 845 – 857
- Canton F. R., Suarez M. F., Canovas F. M. 2005. Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* 83: 265 – 278
- Carrodus B. 1967. Absorption of nitrogen by micorhizal roots of beech. II Ammonium and nitrate as sources of nitrogen. *New Phytol.* 66: 1 – 4
- Carrol J. E., Tattar T. A. 1983. Relationship of root starch to decline of sugar maple. *Plant Disease* 67: 1347 – 1349
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80
- Cerasoli S., Scartazza A., Brugnoli E., Chaves M. M., Pereira J. S. 2004. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. *Tree Physiology*, 24: 83-90
- Ceulemans R, Mousseau M. 1994. Effects of elevated atmospheric CO₂ on woody plants. Tansley Review N° 71. *New Phytol.* 127: 425 – 446
- Chaillou S., Lamaze T. 1997. Nutrition ammoniacale des plantes. *In: Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire.* Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Chalot M., Brun A., Finlay R.D., Söderström B. 1994. Respiration of [¹⁴C] alanine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEMS Microbiol Lett.* 121: 87-92
- Chapin F. S., Kedrowski R. A. 1983. Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. *Ecology* 64: 373 – 391
- 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
- Chaves M. M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42 (234): 1-6
- Chemillier P. 1997. L'effet de serre : Pourquoi et comment lutter contre ses conséquences ? *In: Face aux changements climatiques. Aménagement et Nature.* 126: 11 – 18
- Cherbury B., Joffre R., Gillon D., Rambal S. 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. *Tree Physiol.* 21: 9-17
- Calusen S. et Apel K. 1991. Seasonal changes in the concentration of the major storage protein and its mRNA in xylem ray cells of poplar trees. *Plant Molecular Biology.* 17:669-678.
- Coffelt M. A., Schultz P. B., Wolf D. D. 1993. Impact of late-season orange striped oak worm (Lepidoptera Saturniidae) defoliation on oak growth and vigour. *Environmental Entomology* 22 (6): 1318 – 1324

- Coleman GD, Chen THH, Fuchigami L (1992) Complementary DNA cloning of poplar bark storage protein and control of its expression by photoperiod. *Plant Physiology* 98, 687-693.
- Coleman GD, Englert JM, Chen THH, Fuchigami LH (1993) Physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. *Plant Physiology*. 102, 53-59.
- Collet N. G., Neumann F. G. 2002. Effects of stimulated chronic defoliation in summer on growth and survival of blue gum (*Eucalyptus globules* Labill.) within young plantations in northern Victoria. *Australian Forestry*. 65: 99 – 106.
- Conradie W. J. 1986. Utilisation of nitrogen by the grape-vine as affected by time of application and soil type. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 7: 76 – 83
- Conway, E. J. 1950. Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 3rd ed. London: Crosby Lockwood and Son
- Cooke J. E. K., Weih M. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* 167: 19-30
- Cyr D. R., Bewley J. D. 1990. Seasonal variation in nitrogen storage reserves in the roots of leafy spurge (*Euphorbia esula*) and responses to decapitation and defoliation. *Physiol. Plant.* 78: 361-366
- Czaninski Y. 1970. Etude cytologique de la différenciation du bois du Robinier. II Différenciation des cellules du parenchyme (cellules à réserves et cellules associées aux vaisseaux). *J. Microsc.* 9: 389 – 406
- Davies D.D. 1982. Physiological aspects of protein turnover. In *Encyclopaedia of plant physiology: Nucleic acids and proteins in plants*. Edité par Boulter D., Parthier B. Springer-Verlag, Berlin.
- Deléens E, Ferhi A, Queiroz O. 1983. Carbon isotope fractionation by plants using the C4 pathway. *Physiol. Végét.*, 21: 897-905.
- Deléens E, Cliquet JB, Prioul JL. 1994. Using ¹³C and ¹⁵N label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. *Aust. J. Plant Physiol.*, 21: 133-146.
- Dickson R. E. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann. Sci. For.* 46: 631–647
- Dickson R. E. 1991. Assimilate distribution and storage. In: *Physiology of trees*. Edité par Raghavendra AS. Wiley and Sons, Inc. New York.
- Drexhage M., Chauvière M., Colin F., Nielsen C. N. N. 1999. Development of structural root architecture and allometry of *Quercus petraea*. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 600-608
- Dubroca E. 1983. Evolution saisonnière des réserves dans un taillis de châtaigniers, *Castanea sativa* Mill., avant et après coupe. Thèse Université Paris Sud, 209 p + annexes.
- Ebell. L. F. 1969. Specific total starch determinations in conifer tissues with glucose oxidase. *Phytochemistry*, 8:25-36
- Fageria, N.K. 2004. Dry matter yield and nutrient uptake by lowland rice at different growth stages. *Journal of Plant Nutrition* 27 (6): 947-958.

- Faure J. D., Meyer C., Caboche M. 1997. Assimilation du nitrate : nitrate et nitrite réductases. *In: Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire.* Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Ferrario S., Foyer C. H., Morot-Gaudry J. F. 2001. Co-ordination between nitrogen photosynthetic and respiratory metabolism. *Nitrogen Assimilation by Plants.* Enfield, Science Publishers Inc Chapter 15: 269 – 283
- Fotelli M. N., Nahm M., Heidenfelder A., Papen H., Rennenberg H., Geßler A. 2002. Soluble nonprotein nitrogen compounds indicate changes in the nitrogen status of beech seedlings due to climate and thinning. *New Phytologist* 154: 85–97
- France R. C., Reid C. P. P. 1979. Absorption of ammonium and nitrate by miccorhizal and non-miccorhizal roots of pine. Symposium “La physiologie des racines et symbioses” Nancy, France 1978. Edité par Riedacker A&Gagnaire-Michard J.
- Fromard L., Babin V., Fleurat-Lessard P., Fromont J. C., Serrano R., Bonnemain J. L. 1995. Control of vascular sap pH by the Vessel-Associated Cells in woody species. *Plant Physiol* 108: 913 – 918
- Gadal P. 1970. Métabolisme du chêne et de ses zoocécidies. Etude particulière de la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Thèse ès Sciences Naturelles de l'Université Paul Sabatier, Toulouse
- Gallardo F, Fu J, Jing ZP, Kirby EG, Cánovas FM. 2003. Genetic modification of amino acid metabolism in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 587–594
- Gaudillère J. P. 1997. Gestion de l'azote chez les espèces ligneuses. *In: Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire.* Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Genenger M., Jaeggi M., Siegwolf R., Chalot M., Frossard E., Brunner I. 2003. Rapid ¹⁵N uptake and metabolism in fine roots of Norway spruce. *Trees*, 17, 144-152
- Gerhardt K. 1998. Leaf defoliation of tropical dry forest tree seedlings – implications for survival and growth. *Trees* 13: 88 – 95
- Gieger, T., Thomas, F. M., 2002: Effects of defoliation and drought stress on biomass partitioning and water relations of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Basic Appl. Ecol.* 3, 171–181.
- Glad C., Regnard J. L., Quérou Y., Brun O., Morot-Gaudry J. F. 1992. Flux and chemical composition of xylem exudates from Chardonnay grapevine: temporal evolution and effect of recut. *Ann. J. Enol. Vitic.* 43: 275 – 282
- Gleason S. M., Ares A. 2004. Photosynthesis, carbohydrate storage and survival of a native and an introduced tree species in relation to light and defoliation. *Tree Physiology.* 24 : 1087 – 1097.
- Glerum C., Balatinecz J. J. 1980. Formation and distribution of food reserves during autumn and their subsequent utilization in jack pine. *Canadian Journal of Botany* 58: 40-54
- Gojon A., Bussi C., Grignon C., Salsac L. 1992. Distribution of NO₃ reduction between roots and shoots of peach tree seedlings as affected by NO₃ uptake rate. *Plant Physiol.* 82: 505- 512
- 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* 379: 2431-2439

- Goulas E., Le Dily F., Teissendr L., Corbel G., Robin C., Ourry R. 2001. Vegetative storage proteins in white clover (*Trifolium repens* L.): quantitative and qualitative features. *Annals of Botany* 88: 789-795
- Granier A., Biron P., Lemoine D. 2001. Water balance, transpiration and canopy conductance in two beech stands. *Agricultural and Forest Meteorology* 100: 291 – 308
- Grignon C., Thibaud J. B., Lamaze T. 1997. Transport du nitrate par la racine. In: Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Habib R., Millard P., Proe M. F. 1993. Modelling the seasonal nitrogen partitioning in young sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees in relation to nitrogen supply. *Ann. Bot.* 71: 453 – 459
- Haissig B., Dickson R. 1982. Glucose measurement errors in enzymatic starch hydrolysates at high enzyme-glucose weight ratios. *Physiol. Plant.* 54: 244-248
- Hansen P., Grauslund J. 1973. ¹⁴C studies on apple trees. VIII. The seasonal variation and nature of reserves. *Physiol. Plant.* 28: 24 - 32.
- Hansen J., Beck E. 1990. The fate and path of assimilation products in the stem of 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Trees* 4: 16-21
- Hansen J., Beck E. 1994. Seasonal changes in the utilization and turnover of assimilation products in 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris*) trees. *Trees* 8: 172-182
- Hansen J., Vogg G., Beck E. 1996. Assimilation, allocation and utilization of carbon by 3-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris*) trees during winter and early spring. *Trees* 11: 83-90.
- Hansen U., Fiedler B., Rank B. 2002. Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees* 16: 354 – 364.
- Harms U., Sauter J. J. 1991. Storage proteins in the wood of Taxodiaceae and of *Taxus*. *Journal of Plant Physiology* 138: 497-499
- Heilmeyer H., Monson R. K. 1994. Carbon and nitrogen storage in herbaceous plants. In *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. Eds E Garnier et J Roy, SPB Academic publishing, The Hague, pp. 149-171.
- Heller R., Esnault R., Lance C. 1991. Physiologie végétale. I Nutrition. 4^{ème} édition. Eds. Masson
- Henricksson J., Haukioja E., Ruohomäki K. 1999. Impact damage on growth of mountain birch shoots. *New Phytologist* 142: 469 – 474
- Herschbach C, Kopriva S. 2002. Transgenic trees as tools in tree and plant physiology, *Trees* 16: 250 – 261
- Heuvel V., Robidoux J. L., Autio W. R., Neto C. C. 2005. Timing of partial defoliation affects carbohydrate concentration of vegetative tissues and concentration of phenolics in berries of potted de Chaunac (*Vitis sp.*) grapevines. *Canadian Journal of Plant Science.* 85: 703 – 708.
- Hoch G., Richter A., Körner C. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment* 26: 1067-1081

- Höll W. 1985. Seasonal fluctuation of reserve materials in the trunkwood of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) *Journal of Plant Physiology* 117: 355-362
- Höll W. 1997. Storage and mobilization of carbohydrates and lipids. In: *Trees – Contribution to modern Tree Physiology*. Edité par Eschrich W, Ziegler H. Bachuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 197-211
- Jarvis P.G. 1989. Atmospheric Carbon Dioxide and Forests. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B* 324: 369-392
- Kang S.M., Titus J.S. 1980. Qualitative and quantitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of apple. *Physiologia Plantarum* 50: 285-290
- Karlsson P. S., Weih M. 2003. Long-term pattern of leaf, shoot and wood production after insect herbivory in the Mountain Birch. *Functional Ecology* 17: 841 – 850
- Kato T. 1986. Nitrogen metabolism and utilization in *Citrus*. *Hortic Rev.* 8 : 181 – 216.
- Kessler J., Chambraud A. 1990. Météo de la France. Tous les climats localité par localité. JC Lattès Eds.
- Koptur S., Rodriguez M. C., Oberbauer S. F., Weekley C., Herndon A. 2002. Herbivore-free time? Damage to new leaves of woody plants after hurricane Andrew. *Biotropica* 34: 547 – 554.
- Körner C. 2003. Carbon limitation in trees. *Journal of Ecology* 91 (1): 4-17
- Kozlowski T.T., Kramer P.J., Pallardy S.G. 1991. *The Physiological Ecology of Woody Plants*, San Diego, California, Academic Press, inc. 657 p.
- Kramer P. J., Koslowski T. T. 1979. *Physiology of woody plants*. Academic Press, London. 811 p.
- Krueger K. W., Trappe J. M. 1967. Food reserves and seasonal growth of Douglas-fir seedlings. *Forest Sciences* 13(2): 192-202
- Lachaud S. 1981. Xylogénèse chez les Dicotylédones arborescentes. II. Evolution avec l'âge des modalités de la réactivation cambiale et de la xylogénèse chez le Hêtre et le Chêne. *Canadian Journal of Botany* 59 : 2692-2697
- Lachaud S., Bonnemain J. L. 1981. Xylogénèse chez les Dicotylédones arborescentes. I. Modalités de la remise en activité du cambium et de la xylogénèse chez les Hêtres et les Chênes âgés. *Canadian Journal of Botany* 59 : 1222-1230
- Lacointe A. 2001. Gestion et dynamique inter-annuelle des réserves. Premiers Rencontres d'Ecophysiologie de l'Arbre. Ecole thématique (INRA), Autrans, 16 – 19 janvier 2001.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment*. 26: 37 – 56.
- Langheinrich U., Tischner R. 1991. Vegetative storage proteins in poplar: Induction and characterization of a 32- and a 36-kilodalton polypeptide. *Plant Physiology* 97 (3): 1017-1025

- Lawrence S. D., Greenwood J. S., Korhnek T. E., Davis J. M. 1997. A vegetative storage protein homolog is expressed in the growing shoot apex of hybrid poplar. *Planta* 203: 237-244
- Le Blévenec L. 1986 Mise au point d'une solution nutritive pour les cultures annuelles et pérennes. Cahiers des Sciences et Techniques, INRA, 14: 29-32
- Lebourgeois F., Granier A., Bréda N. 2001. Une analyse des changements climatiques régionaux en France entre 1956 et 1997. Réflexions en terme de conséquences pour les écosystèmes forestiers. *Ann. Sci. For.* 58: 733 – 753
- Loomis W.D., 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In "Methods in Enzymology", vol. 31, "Biomembranes", pp 529-543.
- Ludovici K.H., Allen H. L., Albaugh T. J., Dougherty P. M. 2002. The influence of nutrient and water availability on carbohydrate storage in loblolly pine. *Forest Ecology and Management* 159: 261-270
- Maillard P, Guehl JM, Muller JF, Gross P. 2001. Interactive effects of elevated CO₂ concentration and nitrogen supply on partitioning of newly fixed ¹³C and ¹⁵N between shoot and roots of pedunculate oak seedlings (*Quercus robur*). *Tree Physiology* 21 : 163–172.
- Malaguti D., Millard P., Wendler R., Hepburn A. and 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. *J. Exp. Bot.* 52: 1665-1671.
- Mariotti A., Mariotti F., Amarger N., Pizelle G., Ngambi J. M., Champigny M. L., Moysse A. 1980. Fractionnements isotopiques de l'azote lors des processus d'absorption des nitrates et de fixation de l'azote atmosphérique par les plantes. *Physiologie végétale*, 18 : 165-181.
- Marmann P., Wendler R., Millard P., Heilmeyer H. 1997. Nitrogen storage and remobilisation in ash (*Fraxinus excelsior*) under field and laboratory conditions. *Trees* 11: 298-305
- Martins-Loução MA, Cruz C. 1999. Role of nitrogen source in carbon balance. Nitrogen nutrition and plant growth (HS Srivastava, RP Singh Eds.) Chapter 7: 231 – 282
- Merkle SA, Dean JFD. 2000. Forest tree biotechnology, *Curr. Opin. Biotech.* 11: 298–302.
- Meyer, M. M., Splitstoesser W. E. 1971. The utilization of carbohydrate and nitrogen reserves by *Taxus* during its spring growth period. *Physiologia Plantarum* 24: 306-314
- Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant, Cell and Environment* 11: 1-8
- Millard P, Neilsen GH. 1982. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stored N for the seasonal growth of apple trees. *Ann. Bot.* 63: 301-309.
- Radin WJ, Boyer JS. 1982. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants. *Plant Physiol.* 69:771–775.
- Millard P., Thompson C. M. 1989. The effect of the autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. *J. Exp. Bot.* 40(220): 1285 – 1289
- Millard P. 1994. Measurement of the remobilisation of nitrogen for spring leaf growth of trees under field conditions. *Tree Physiol.* 14: 1049 – 1054

- Millard P, Proe MF. 1994. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. *New Phytol.*, 117:587-596.
- Millard P, 1996. Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 159 : 1-10
- 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
- Mortier F. 1995. Le CO₂ et la forêt. Bulletin Technique de l'ONF N° 29.
- Morvan A., Challe G., Prud'Homme M. P., Le Saos J., Boucaud J. 1997. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytologist*. 136: 81 – 88.
- Nahm M., Radoglou K., Halyvopoulos G., Geßler A., Rennenberg H., Fotelli M.N. 2006. Physiological performance of beech (*Fagus sylvatica* L.) at its southeastern distribution limit in Europe: Seasonal changes in nitrogen, carbon and water balance. *Plant Biology* 8 (1): 52-63
- Nelson E. A., Dickson R. E. 1981. Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. *Can. J. For. Res.* 11: 145-154
- Nelson N. D. 1984. Woody Plants are not Inherently Low in Photosynthetic Capacity. *Photosynthetica* 18(4): 600-605
- Noquet C., Avice J.-C., Ourry A., Volenec J.J., Cunningham S.M., Boucaud J. 2001. Effects of environmental factors and endogenous signals on N uptake, N partitioning and taproot vegetative storage protein accumulation in *Medicago sativa*, *Functional Plant Biology* 28 (4): 279-287
- Nykänen H., Koricheva J. 2004. Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect herbivore performance: a metaanalysis. *Oikos*. 104: 247 – 268
- O'Kennedy B. T., Titus J. S. 1979. Isolation and mobilisation of storage proteins from apple shoot bark. *Physiol. Plant.* 45: 419-424
- Obrinck K.J. 1955. A Modified Conway Unit for Microdiffusion Analysis.
- Office National des Forêts. 1997. Bulletin Technique No. 34 La lumière et la forêt. Numéro Spécial. ONF-Direction Technique et Commerciale
- Ourry A., Macduff J.H., Volenec J.J., Gaudillere J.P. 2001. Nitrogen traffic during plant growth and development. *In* Plant nitrogen, PJ Lea and JF Morot-Gaudry Eds., Berlin, Springer-Verlag, 255-273
- Ovaska L., Walls M., Mutikainen. 1992. Change in leaf gas exchange properties of cloned *Betula pendula* saplings after partial defoliation. *J. Exp. Bot.* 43: 1301-1207
- Paemboa, S.A., Hagihari A., Hozumi K 1992. Long-Term Respiration in Relation to Growth and Maintenance Processes of the Aboveground Parts of a Hinoki Forest Tree. *Tree Physiology* 10: 101-110
- Penning de Vries F.W.T. 1983. Modelling of growth and production. *In*: Physiological Plant Ecology IV, pp.118-150 in Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol 12 D. O.L. Lange et al. (Eds.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg

- Penning de Vries F.W.T., Brunsting A.H.M., van Laar H.H. 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis: A quantitative approach. *Journal of theoretical Biology* 45: 339-377
- Petit M. 1997. Activités humaines et effet de serre atmosphérique. In Face aux changements climatiques. *Aménagement et nature* 126: 33 – 40
- Pitel, J.A.& Cheliak, W.M., 1986. Effectiveness of protective agents for increasing the activity of five enzymes from vegetative tissues of white spruce. *Canadian Journal of Botany* 64, 39-44. 99-168
- Policarpo M., Di Marco L., Caruso T., Gioacchini P., Tagliavini M. 2002. Dynamics of nitrogen uptake and partitioning in early and late fruit ripening peach (*Prunus persica*) tree genotypes under a Mediterranean climate. *Plant and Soil*, 239: 207 – 214.
- Ponton S. 2002. Analyse de l'efficacité d'utilisation de l'eau des chênes pédonculé (*Quercus robur* L.) et sessile (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). Relation avec les dépérissements en chênaies. Doctorat Biologie Forestière, Université Henri Poincaré Nancy I, 47 p. + annexes
- Poorter H. 1994. Construction costs and payback time of biomass: A whole plant perspective. In: A Whole Plant Perspective of Carbon-Nitrogen Interactions. SPB Academic Publishing, The Hague: 111-127
- Portsmouth, A., Niinemets, U. 2006. Interacting controls by light availability and nutrient supply on biomass allocation and growth of *Betula pendula* and *B. pubescens* seedlings *Forest Ecology and Management*. 227: 122-134.
- Priestley C.A. 1977. The annual turnover of resources in young olive trees. *J. Hort. Sci.* 52: 105-112
- Quentin C. 1999. Etude de la réserve utile des sols de la forêt de Hesse. Contribution à l'étude du bilan hydrique. DEA Sciences du sol. ENSA Rennes
- Radin WJ, Boyer JS. 1982. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants. *Plant Physiol.*, 69:771–775.
- Renaud J. P., Mauffette Y. 1991. The relationships of crown dieback with carbohydrate content and growth of sugar maple (*Acer saccharum*). *Can. J. For. Res.* 21: 1111 – 1117
- Rennenberg, H., Schupp, R., Glavac, V., Jochheim, H. 1994. Xylem sap composition of beech (*Fagus sylvatica* L.) trees: Seasonal changes in the axial distribution of sulfur compounds. *Tree Physiology* 14 (5): 541-548.
- Roberntz P, Linder S. 1999. Effects of long-term CO₂ enrichment and nutrient availability in Norway spruce. II. Foliar chemistry. *Trees* 14: 17 – 27
- Rochat C. 1997. Transport des acides aminés dans la plante. In Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. Edité par Morot-Gaudry, JF. INRA, 422 p.
- Roubelakis-Angelakis K. A., Kliewer W. M. 1992. Nitrogen metabolism in grapevine. In: Horticultural Review. Edité par Janik J. Wiley & Son Inc. New York, 14: 407 – 452
- Sakai A., Larcher W. 1987. Frost Survival of Plants. Berlin, New York: Springer.
- Salisbury, F.B., Ross C.W. 1978. Plant Physiology 2nd ed., Belmont, California, Wadsworth Publ. Co., 657 p.

- Salsac L., Chaillou S., Morot-Gaudry J. F., Lesaint C., Jolivet E. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805-812
- Sauter J. J., van Cleve B. 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees* 8: 297-304
- Sauter J. J., Wellenkamp S. 1998. Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the twig wood of *Salix caprea* L. *Holzforschung* 52: 255 – 262
- Sauter J. J., Witt W. 1997. Structure and function of rays: storage, mobilisation, transport. In: *Trees – Contribution to modern Tree Physiology*. Edité par Eschrich W, Ziegler H. Bachuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 177-195
- Sauter J.J., Van Cleve B., Apel K. 1988. Protein bodies in ray cells of *Populus x canadensis* Moench 'robusta'. *Planta* 173: 31-34
- Saxe H., Ellsworth D., Heath J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *Transley Review* N° 98. *New Phytol.* 139: 395 – 436
- Scaife A. 1989. A pump/leak/buffer model for plant nitrate uptake. *Plant Soil* 114: 139 – 141
- Schaller A. 2004. A cut above the rest : the regulatory function of plant protease. *Planta* 220:183-197.
- Schneider A., Kreazwieser J., Schums R., Sauter J.J. and Rennenberg H., 1994. Thiol and amino acid composition of xylem sap of poplar trees. *Can. J. Bot.* 72:347-351.
- Sepulchre P. 2000. Estimation de l'hétérogénéité spatiale des paramètres du milieu de quatre parcelles de la forêt de Hesse (57) : approche floristique. IUT Génie de l'Environnement, Tours
- Shim K. K., Titus J. S., Splittstoesser W. E. 1972. The utilization of post-harvest urea sprays by senescing apple leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 552-596
- Sinnott E.W. 1918. Factors determining character and distribution of food reserves in woody plants. *Botanical Gazette* 66: 162–175
- Smith H., Whitelam G. C. 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment.* 20: 840 – 844.
- Stassen PJC, Strydom DK, Stindt HW. 1981. Seasonal changes in carbohydrate fractions of young kakamas peach trees. *Agroplanta.* 13: 47 – 53
- Staswick P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissue. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 303 – 322
- Staswick P.E. 1990. Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell* 2 (1): 1-6
- Stepien V. 1992. Contribution à l'étude des protéines de réserve végétatives du peuplier (*Populus x euramericana*). Thèse de l'Université de Nancy 1. 147 pp
- Stepien V. et Martin F. 1992. Purification, characterization and localisation of the bark storage proteins of poplar. *Plant Physiol. and Biochem.* 30:399-407
- Stepien V., Sauter J. J., Martin F. 1994. Vegetative storage proteins in woody plants. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 185 - 192
- Sundaram A., Sundaram K. M. S., Nott R., Curry J., Sloane L. 1997. Persistence of *bacillus thuringiensis* deposits in oak foliage, after aerial application of Foray® 48B using rotary and pressure atomizers. *J. Environ. Sci. Health* B32 (1): 71 – 105

- Taylor B.K. 1967. The nitrogen nutrition of peach trees. I. Seasonal changes in nitrogenous constituents in mature trees. *Australian Journal of Plant Physiology* 20, 379-387.
- Terziev N., Boutelje J., Larsson K. 1997. Seasonal fluctuations of low-molecular-weight sugars, starch and nitrogen in the sapwood of *Pinus sylvestris* L. *Scand. J. For. Res.* 12: 216 – 224
- Thomas F. M., Blank R., Hartmann G. 2002. Abiotic and abiotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For. Path.* 32: 277 – 307
- Tian W. M., Wu J. L., Hao B. Z., Hu Z. H. 2002. Vegetative storage proteins in Meliaceae. *Acta Botanica Sinica* 44 (2): 242 – 245
- Tian W. M., Han Y. Q., Wu J. L., Hao B. Z. 1998. Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in *Hevea brasiliensis*. *Trees* 12: 153 – 159
- Tian W. M., Han Y. Q., Wu J. L., Hao B. Z. 1998. Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in *Hevea brasiliensis*. *Trees* 12: 153 – 159
- Tian W. M., Wu J. L., Hao B. Z., Hu Z. H. 2003. Vegetative storage proteins in the tropical tree *Swietenia macrophylla*: seasonal fluctuation in relation to a fundamental role in the regulation of tree growth. *Canadian Botanical Journal* 81: 492 – 500
- Tian W.M., Peng S.O., Hao B.Z., Wu J.L., Hu Z.H., Cui K.M. 2005. Poplar Trees (*Populus canadensis* Moench) Initiate Vegetative Storage Protein Accumulation During New Shoot Development in Spring. *Journal of Integrative Plant Biology* 47 (6): 717–725
- Tian W-M, Hu Z-H. 2003. Distribution of vegetative storage proteins in Rosaceae. *IAWA Journal* 24 (4): 421 – 428
- Tian W-M, Hu Z-H. 2004. Distribution and ultrastructure of vegetative storage proteins in Leguminosae. *IAWA Journal* 25 (4): 459 – 469
- Titus J. S., Khang S. M. 1982. Nitrogen metabolism, translocation and recycling in apple trees. *Horticultural Reviews* 4: 204 – 246
- Trethewey R. N, Smith A.M. 2000. Starch metabolism in leaves. In *Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Advances in photosynthesis. Vol. 9*, Leegood RC, Sharkey TD, Von Caemmerer S (eds), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Tromp J. 1970. Storage and mobilization of nitrogenous compounds in apple trees with special reference to arginine. In: *Physiology of trees crops*. Edité par Luckwill LC Cuttings CV. New York Academy
- Tromp J. 1983. Nutrient reserves in roots of fruit trees, in particular carbohydrates and nitrogen. *Plant and Soil* 71: 401-413
- Tromp J., Ovaia I. C. 1973. Spring mobilization of protein nitrogen in apple bark. *Physiol. Plant.* 29: 1 – 5
- Van Bel A. J. E. 1990. Xylem-phloem exchange via the rays: the undervalued route of transport. *J. Exp. Bot.* 41: 631 – 644
- Van Cleve B, Apel K (1993) Induction by nitrogen and low temperature of storage protein synthesis in poplar trees exposed to long days. *Planta* 189, 157-160.
- van Handel E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22: 280-283

- Vanderklein D.W., Reich P. B. 2000. European larch and eastern white pine respond similarly during three years of partial defoliation. *Tree Physiology* 20: 283 – 287
- Vanderklein D.W., Reich P.B. 1999. The effect of defoliation intensity and history on photosynthesis, growth and carbon reserves of two conifers with contrasting lifespans and growth habits. *New Phytologist* 144: 121-132
- Vierstra R. D. 1993. Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44:385 – 410
- Vivin P. 1995. Effets de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et de contraintes hydriques sur l'allocation de carbone et d'azote et sur l'ajustement osmotique chez *Quercus robur* L. Thèse de l'Université de Nancy I, 135 p.
- Vizoso S. 2004. Effets combinés de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ et du niveau de fertilisation azotée sur la gestion du carbone et de l'azote chez le chêne pédonculé (*Quercus robur*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*). Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, p 122
- Wargo P. M., Parker J., Houston D. R. 1972. Starch content in roots of defoliated sugar maple. *Forest Science* 18 (3): 203 – 204
- Wargo, P. M. 1978. Gypsy Moth Handbook. Judging vigour of deciduous hardwoods. USDA. Combined Forest Pest Research and Development Program. Agriculture Information Bulletin No. 418
- Wargo P. M. 1996. Consequences of environmental stress on oak: predisposition to pathogens. *Ann. Sci. For.* 53: 359 – 368.
- Waring, R. H., Schlesinger W. H. 1985. Forest Ecosystems: Concepts and Management, Academic Press, Orlando, Florida, 340p.
- Wetzel S., Greenwood J. S. 1989. Proteins as potential nitrogen storage compounds in bark and leaves of several softwoods. *Trees* 3: 149 – 153
- Wetzel S., Greenwood J. S. 1991. A survey of seasonal bark proteins in eight temperate hardwoods. *Trees* 5: 153-157
- Witt W., Sauter J.J. 1994. Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilization and summer deposition. *Physiologia Plantarum*. 92 : 9 – 16.
- Wullschleger S. D., Jansson S, Taylor G. 2002. Genomics and forest biology: *Populus* emerges as the perennial favourite. *Plant Cell* 14: 2651-2655
- Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H., Dunn M.J. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21 (17): 3666-3672
- Yemm E. W., Cocking E. C. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*. 80: 209-213
- Zapata C. 1998. Suivi pluriannuel de la mise en place de la mobilisation des réserves carbonées et azotées chez deux cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.) présentant une sensibilité différente à la coulure. Thèse de Doctorat. INRA Paris-Grignon.
- Zhao, D., Oosterhuis, D.M. 1999. Dynamics of mineral nutrient element concentrations in developing cotton leaves, bracts, and floral buds in relation to position in the canopy. *Journal of Plant Nutrition* 22 (7): 1107-1122.

ANNEXE

Protocole de préparation de la solution de Le Blevenec pour le marquage au ^{15}N

Chaque plant marqué a reçu 700 mL de la solution de Le Blevenec (1986).

a) Composition des solutions mères en macro-éléments

KNO_3	202 g/L
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	345 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	72.5 g/L
H_2KPO_4	75 g/L
HK_2PO_4	96 g/L
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	270 g/L
NaCl	10 g/L

b) Composition de la solution mère en oligo-éléments :

Solution acide EDTA de Mn à 26 g Mn/L

Solution acide EDTA de Zn à 28.5 g Zn/L

Solution acide EDTA de Cu à 28.5 g Cu/L

Acide borique 2.82 g/L

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ à 0.25 g/L

Suite anexe...

c) Préparation de la solution nutritive à partir d'aliquotes des solutions mères :

A diluer dans l'eau dans l'ordre suivant :

1) NaCl	1 mL/L solution mère
2) KNO ₃	1 mL/L solution mère
3) MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 mL/L solution mère
4) (NH ₄) ₂ SO ₄	1 mL/L solution mère
5) H ₂ KPO ₄	1 mL/L solution mère
6) HK ₂ PO ₄	1 mL/L solution mère
7) Ca(NO ₃) ₂	1 mL/L solution mère
8) Solution acide EDTA de Mn à 26 g Mn/L	0.2 mL/L solution nutritive
9) Solution acide EDTA de Zn à 28.5 g Zn/L	0.2 mL/L solution nutritive
10) Solution acide EDTA de Cu à 28.5 g Cu/L	0.2 mL/L solution nutritive
11) Acide borique 2.82 g/L	0.2 mL/L solution nutritive
12) (NH ₄) ₆ , Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O à 0.25 g/L	0.2 mL/L solution nutritive

Le pH a été ajusté à 6.2.

Le fer est apporté sous forme EDDHA Fe poudre à 6% Fe (sel de l'acide éthylène diamine diorthohydropenyl acétique) à raison de 0.042 g/L de solution nutritive ou de DTPA Fe 2.35% Fe (solution aqueuse du complexe ferrique du sel sodique de l'acide d'éthylène triamine pentacétique) à raison de 0.1 mL par litre de solution nutritive selon la plante cultivée.

Monsieur VALENZUELA NUNEZ Luis Manuel

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER *11°/228*

Nancy, le *14 septembre 2006*

Le Président de l'Université

