



Etude écophysiological temporelle de la gestion des réserves carbonées et azotées par trois génotypes de miscanthus

Julie Leroy

► To cite this version:

Julie Leroy. Etude écophysiological temporelle de la gestion des réserves carbonées et azotées par trois génotypes de miscanthus. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2021. Français. ⟨NNT : 2021AGPT0010⟩. ⟨tel-04223136⟩

HAL Id: tel-04223136

<https://pastel.hal.science/tel-04223136v1>

Submitted on 29 Sep 2023

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

Docteur d'AgroParisTech

Spécialité : Sciences agronomiques

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Julie LEROY

Etude écophysiological temporelle de la gestion des réserves carbonées et azotées par trois génotypes de miscanthus

Directrice de thèse : **Maryse BRANCOURT-HULMEL**

Co-encadrante de thèse : **Marion ZAPATER**

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 10 juin 2021

Composition du jury :

Grégory MOUILLE, Directeur de Recherche, INRAE Versailles

François GASTAL, Directeur de Recherche, INRAE Lusignan

Alain OURRY, Professeur, Université de Caen

Marie-Odile BANCAL, Maître de Conférence, AgroParisTech

Nathalie BREDAS, Directrice de Recherche, INRAE Champenoux

Frédéric DUBOIS, Professeur, Université de Picardie Jules Verne

Marion ZAPATER, Ingénieure de Recherche, INRAE Estrées-Mons

Maryse BRANCOURT-HULMEL, Directrice de Recherche, INRAE Estrées-Mons

Président

Rapporteur & Examinateur

Rapporteur & Examinateur

Examinatrice

Examinatrice

Examinateur

Co-Encadrante & Examinatrice

Directrice de thèse

UMR transfrontalière BioEcoAgro

INRAE 2 chaussée Brunehaut 80200 Estrées-Mons

REMERCIEMENTS

Je me revois encore passer la porte de l'école doctorale ce 3 avril 2018, jour de mon inscription en thèse, et me voilà déjà aujourd'hui arrivée à la dernière étape de la rédaction de ce manuscrit. Ces deux dernières pages, écrites avec beaucoup d'émotion, ne sauront exprimer à quel point je remercie toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse.

En premier lieu, je remercie M. Alexandre Pery, Mme Irina Vassileva, M. Pierre Larraufie, Mme Corinne Fiers et Mme Christine Duvaux-Ponter, pour leur accueil au sein de l'école doctorale.

J'aimerais également remercier M. Jean Tayeb, président du centre INRAE Hauts-de-France, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse à l'INRAE d'Estrées-Mons, ainsi que M. Joël Léonard, directeur adjoint de l'UMRt BioEcoAgro, pour son accueil dans l'unité, son engagement et la confiance qu'il m'a accordée et qui m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je souhaite remercier sincèrement Maryse Brancourt-Hulmel, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis d'intégrer pour la première fois son équipe en deuxième année de licence, et, durant ces trois ans, pour son encadrement, ses conseils et enseignements, sa disponibilité, ses bonnes idées et son travail. Un énorme merci à Marion Zapater, ma co-encadrante de thèse, et bien plus que cela en réalité, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour, pour la confiance qu'elle m'a accordée depuis ma première année de master, son investissement, l'ensemble de ses enseignements et conseils, sa présence, son travail et son soutien de chaque instant.

Merci aux rapporteurs, Messieurs François Gastal et Alain Ourry, et examinateurs de ce travail, Mesdames Marie-Odile Bancal et Nathalie Breda, et Messieurs Frédéric Dubois et Grégory Mouille, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de suivi individuel, qui m'ont accompagnée et m'ont aidée dans la réflexion de mon travail : Delphine Luquet, Fabien Ferchaud, Grégory Mouille et Gaétan Louarn.

Je remercie tous les chercheurs qui m'ont aidée dans l'analyse des résultats et leur valorisation : Catherine Giauffret, Andrea Rau, Isabelle Lejeune, Bruno Mary et Fabien Ferchaud.

Merci à Odile, Valérie, Brigitte, Nicolas, Kevin et Amélie pour leur aide et leur sympathie, qui m'ont permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions.

Merci à Grégory et son équipe à Versailles pour leur accueil et leur aide dans la réalisation des dosages de biochimie et particulièrement, Joan-Onate, Julien et Salem.

Cette thèse n'aurait pas pu être menée sans l'équipe « Biomasse », ces « Miscanthus », dévouées, passionnées et surtout courageuses : Laura et Tiffany, le binôme de choc de la gestion du dispositif en 2016, Emilie, pour sa bonne humeur et les moments de rire, Stéphanie, dont je n'oublierai jamais le cache-oreille légendaire pendant le comptage de racines, Marie et Stéphanie avec qui j'ai eu le privilège de réaliser la dernière manipette au champ et qui s'en souviendront (la bêche aussi), et enfin notre véritable « bible » du miscanthus, notre « mamie » et surtout notre meilleure illustratrice en chef Marie-Chantal. Merci beaucoup aussi à Servan, « Mister – canthus » pour avoir partagé mon bureau pendant mon stage de master 1 et pour son implication dans le dispositif. Un grand merci également à Caroline avec qui travailler a été un véritable plaisir et surtout avec qui j'ai passé d'excellents moments. Je remercie également l'ensemble des personnes qui ont travaillé sur le dispositif BFF WP3, notamment Tiffany et son

dynamisme inoubliable, Benoît et Jean-François pour leur aide pour les mesures instrumentées, l'ensemble des stagiaires, Mathilde, Julia et Damian, qui ont contribué à l'acquisition des données et enfin Stéphane pour la mise en place du dispositif.

Merci à tous mes collègues de l'INRAE, pour leur accueil, leur gentillesse et les échanges que nous avons eut. Un merci tout spécial à Nestor pour tous ses apprentissages plus scientifiques les uns que les autres, toujours prêt à égayer nos journées d'une petite blague ou même d'une discussion plus sérieuse. Merci à Kristelle, Aline et Rosemonde pour leur gentillesse durant ces trois ans et leur soutien des derniers instants. Merci aussi à l'ADAS, et tous ses participants, pour les moments plus récréatifs mais tout aussi riches humainement, les soirées jeux, les repas de Noël, le beaujolais nouveau (petit clin d'œil à Nicolas) et les midis terroir.

Je n'oublie pas Marine Rondeau, avec qui j'ai travaillé à Reims pendant mon stage de master 2, et qui m'a transmis, à l'époque, le virus de la recherche.

Une petite pensée également aux copains de fac Charlotte, Camille, Caroline, Anaëlle et Anthony, qui, après m'avoir accompagnée pendant ces 5 années de formation universitaire, ont pu suivre cette thèse d'un peu plus loin mais en étant toujours disponibles et source de soutien.

Merci à toutes les boules de poils et de plumes, soutiens inconditionnels, m'ayant permis de me ressourcer et d'égayer nos visioconférences. Un grand merci aux créateurs des Schoko-bons® et Nougatti® et aux producteurs de noix de cajou et de café qui m'ont permis de tenir le coup.

Plus sérieusement, je ne vous remercierai jamais assez, Maman et Papa, pour m'avoir appris ce qu'était le sens de la vie, m'avoir permis de mettre en œuvre tous mes projets, m'avoir toujours épaulée, soutenue et poussée à réaliser tous mes rêves.

Merci à tous ceux qui sont devenus mes amis, pour tous les moments de partage, les blagues, les discussions et qui ont contribué à cette bonne ambiance caractéristique des bureaux du sous-sol et pas que : Laura et Laura, Sana, Auberi, Ismérie, Damian, Aurélien et Aurélien, Wei et plus récemment Solenne, Marjolaine et Célestin. Un merci très particulier à Raphaël, mon binôme des Brookies 44, mon futur associé du « El Troquetto's », l'oreille attentive de mes désolations, bonheurs et joies, pour sa présence, son soutien, nos fous rires, tous ces bons souvenirs des trois ans et demi passés ensemble, devenu un véritable et surtout inoubliable ami.

Je remercie particulièrement toute ma famille et mes amis, le centre de mon équilibre, pour leur écoute, leur compréhension et leur soutien, même si j'étais moins présente à leurs côtés ces dernières semaines, particulièrement mon grand frère Ludo, Phinou, Justine, Pierre et Léonie. Ne vous inquiétez pas, on va maintenant pouvoir se rattraper ! Merci aussi aux ptits bouts Rose et Raphaël, et toute l'équipe des marmots, qui m'ont fait prendre conscience de la raison pour laquelle je faisais tout ce travail : donner un monde meilleur aux futures générations.

Finalement, un immense merci à toi Jérémy, qui m'a aidée, réconfortée, m'a concocté de bons petits plats et a vécu cette thèse, avec tous ses bons et aussi difficiles moments, à mes côtés chaque jour et chaque nuit ces dernières semaines. A nous la vie maintenant !

Encore une fois, merci à tous, qui m'avez accompagnée tout au long de cette superbe aventure, enrichissante, ponctuée de tant d'événements inattendus et qui m'a faite grandir. Je n'oublierai jamais aucun de ces moments passés à vos côtés et votre soutien sans faille dans toutes les épreuves de la thèse et de la vie que j'ai traversé. Tout ce travail a été permis grâce à vous, et n'aurai jamais pu avoir lieu sans vous. Du fond du cœur, un grand merci !

A Maman

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES FIGURES	8
ABREVIATIONS	11
GLOSSAIRE.....	13
Partie I – Contexte et enjeux de l'étude	14
1.1. Développer des ressources renouvelables pour diminuer l'utilisation des ressources fossiles.....	14
L'utilisation des ressources fossiles présente des conséquences néfastes sur l'environnement et la société.....	14
La bioénergie, une solution durable pour pallier la dépendance aux ressources fossiles	14
Les cultures pérennes : de nombreux atouts pour produire de la biomasse lignocellulosique	16
1.2. <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> : un hybride interspécifique déjà cultivé pour la production de biomasse lignocellulosique.....	18
Généralités	18
La recherche sur le miscanthus : récente mais déjà conséquente	19
Des pratiques culturales simples mais qui pourraient être encore améliorées	20
La biomasse lignocellulosique du miscanthus est polyvalente et alimente de nombreux débouchés.....	24
Avantages et inconvénients de la culture actuelle du <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i>	26
1.3. Besoin d'élargir l'offre variétale du miscanthus : <i>Miscanthus sinensis</i> , une autre espèce d'intérêt	31
<i>Miscanthus sinensis</i> , plus tolérant aux stress, peut contribuer à élargir la zone de production du miscanthus en permettant d'adapter les variétés aux régions	31
La variabilité intra-spécifique de la composition de biomasse chez <i>Miscanthus sinensis</i> améliorera l'adaptation de la biomasse aux débouchés	32
Les coûts d'implantation par le semis de <i>Miscanthus sinensis</i> ou d'hybrides stériles seront diminués	33
Le fonctionnement de <i>Miscanthus sinensis</i> est encore à étudier	33
1.4. Le stockage et la remobilisation des nutriments : mécanismes clés participant aux faibles impacts environnementaux	35
Rôles du stockage et de la remobilisation des nutriments.....	36
Définition du stockage des nutriments chez les plantes	37
L'amidon et le saccharose sont les formes de stockage du carbone majoritaires chez le miscanthus et l'azote est mis en réserve sous forme de protéines et d'acides aminés	37
La constitution des réserves d'azote, de phosphore, de potassium et de magnésium est surtout issue de la remobilisation automnale des parties aériennes.....	38
La constitution des réserves carbonées dans le rhizome est majoritairement issue de l'accumulation des photosynthétats	40
1.5. Objectif de la thèse et questions de recherche.....	42
Partie II - Cadre expérimental	45
2.1. Présentation du site expérimental	45
2.2. Implantation du dispositif et itinéraire cultural	46
2.3. Suivi de la croissance et du développement des plantes	48

2.4. Caractérisation de la biomasse lignocellulosique produite	49
Partie III - Résultats et discussions.....	52
Chapitre 1 : Morphologie et développement de <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> et <i>Miscanthus sinensis</i>	52
3.1.1. Morphologie	52
3.1.2. Rendement et composantes du rendement.....	54
3.1.3. Interception des rayonnements et production de biomasse	58
3.1.4. Cycle de croissance et développement	60
Chapitre 2 : Fonctionnement azoté de <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> et <i>Miscanthus sinensis</i> ..	66
<i>Miscanthus sinensis</i> is as efficient as <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> for nitrogen recycling in spite of smaller N fluxes.....	68
Introduction	72
Material and methods	75
Results	80
Comment optimiser l'étude du fonctionnement azoté ?.....	99
Chapitre 3 : Stockage et remobilisation du carbone chez <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> et <i>Miscanthus sinensis</i> et comparaison avec l'azote	102
Carbon and nitrogen storage and their remobilisation in two miscanthus species.....	103
Introduction	107
Materials and methods	113
Results	117
Discussion	122
Conclusion.....	130
Comment optimiser l'étude de l'évolution des réserves carbonées et azotées ?.....	139
Partie IV - Discussion générale	141
Corrélations entre les variables clés impliquées dans le stockage de l'azote et du carbone et les variables environnementales et développementales	144
Types de fonctionnement des trois géotypes étudiés	147
Pistes de travail à destination de la sélection variétale et de l'agronomie pour optimiser la production de biomasse	153
Partie V - Conclusion et perspectives	158
5.1. Conclusion	158
5.2. Perspectives.....	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Avantages et inconvénients de la culture du miscanthus actuelle

Tableau 2. Moyennes mensuelles des principales variables climatiques de 2016 à 2018

Tableau 3. Synthèse des expérimentations et mesures réalisées en troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Tableau 4. Récapitulatif des variables morphologiques de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus déterminées sur la zone de référence et la zone de prélèvement pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Tableau 5. Récapitulatif des variables d'interception des rayonnements et de production de biomasse

Tableau 6. Date d'apparition de la feuille étandard et de la sortie des panicules, ainsi que la durée en degrés jours cumulés entre la FE et la SPan chez *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus notée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Tableau 7. Date et temps thermique du stade « 50% de hauteur relative de tige sénescence de première cohorte » et du moment où les tiges de première cohorte sont totalement sénescences

Chapter 2 - Table 1. Observed dates 1 (Below-ground N stock is minimum) and 2 (Above-ground N stock is maximum) for *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years.

Chapter 2 - Table 2. Endogenous N fluxes in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

Chapter 2 - Table 3. Exogenous N fluxes and N balance in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

Chapter 2 - Table 4. Nitrogen Use Efficiencies (NUE) by *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

Chapter 3 - Table 1. Analysis of variance for starch, sucrose, soluble proteins and nitrogen concentrations and contents for each compartment

Chapter 3 - Table 2. Comparison of maximum carbon and nitrogen reserves molecules concentration and content in the four compartments in November or February of the next-year according to the genotype

Chapter 3 - Table 3. Analysis of variance for starch, sucrose and nitrogen concentrations between Rhi_m and Rhi_buds for each genotype, and Rhi_m and Rhi_SB for each genotype

Tableau 8. Description des variables utilisées dans les ACP

Tableau 9. Contributions et \cos^2 des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au fonctionnement azoté des plantes

Tableau 10. Contributions et \cos^2 des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au stockage du carbone des plantes

Tableau 11. Contributions et \cos^2 des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au type de fonctionnement des plantes

Tableau 12. Classement fonctionnel des trois génotypes étudiés

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Parts des différentes sources d'énergies renouvelables (ER) dans l'approvisionnement mondial en énergie primaire en 2008
- Figure 2.** Schéma d'une plante de *Miscanthus* durant la floraison
- Figure 3.** Carte de l'origine géographique des différentes espèces de *Miscanthus*
- Figure 4.** Historique non exhaustif de la recherche sur le *Miscanthus*
- Figure 5.** Mulch présent sur une parcelle de *Miscanthus* × *giganteus* âgé de 5 ans
- Figure 6.** Comparaison du métabolisme photosynthétique en C3 et en C4
- Figure 7.** Essai illustrant la diversité des espèces de *Miscanthus*
- Figure 8.** Localisation du dispositif (à gauche) et vues aériennes du dispositif
- Figure 9.** Températures journalières minimales, moyennes et maximales, Rayonnement global journalier, Evapotranspiration potentielle de Penman journalière, déficit de pression de vapeur d'eau journalier et cumul des précipitations journalier de 2016 à 2018
- Figure 10.** Implantation de l'essai (à gauche) par plantation de fragment de rhizome présentant quelques bourgeons en cours de développement (à droite)
- Figure 11.** Plan du dispositif expérimental complet
- Figure 12.** Récolte de l'essai en février à la motofaucheuse
- Figure 13.** Plan détaillé des zones « année 3 » et « année 4 »
- Figure 14.** Réalisation des tranchées à l'aide d'une pelleteuse pour l'étude des profils de sol et racinaires
- Figure 15.** Prélèvement des parties aériennes et souterraines
- Figure 16.** Découpage des différents compartiments dits « fonctionnels » du rhizome et les bas de tiges
- Figure 17.** Faces supérieures et inférieures et zoom de rhizomes entiers de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus
- Figure 18.** Cartographie et profils racinaires de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et Malepartus en novembre et décembre lors de la quatrième année de culture (2017)
- Figure 19.** Parties aériennes de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus pendant la cinquième (2018) année de culture
- Figure 20.** Gîte estival de rat des moissons observé dans une plante de *Miscanthus sinensis* Goliath
- Figure 21.** Evolution des proportions des biomasses aérienne et souterraine par rapport à la biomasse totale de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus pendant la troisième (2016) et la quatrième (2017) années de culture
- Figure 22.** Evolution de la hauteur de la dernière feuille ligulée de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus mesurée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Figure 23. Evolution du nombre de tiges par plante de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus mesuré sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Figure 24. Evolution du Leaf Area Index (LAI) de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus durant les deux années de culture calculé d'après les mesures de SLA effectuées au LI-3100C Area Meter (LI-COR®)

Figure 25. Evolution de l'efficacité d'interception du rayonnement ϵ_i de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus durant les deux années de culture

Figure 26. Efficacité d'interception du rayonnement ϵ_i en fonction du Leaf Area Index (LAI) permettant de déterminer le coefficient d'extinction de la culture (k) chez *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus durant les deux années de culture

Figure 27. Production de biomasse aérienne en fonction du PAR intercepté permettant de déterminer la RUE chez *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et Malepartus durant les deux années de culture

Figure 28. Evolution de la partie nord du dispositif durant la quatrième (2017) année de culture.

Figure 29. Evolution de la hauteur relative de tige sénescence de première cohorte de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus calculée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Figure 30. Exemple de modélisation de courbe sigmoïde de la hauteur relative de tige sénescence de première cohorte chez *Miscanthus × giganteus* bloc 3 en 2016 pour déterminer la date où 50% de la hauteur de tige est sénescence (équivalent à b dans l'équation)

Figure 31. Parties aériennes présentant des tiges restées vertes correspondant à une cohorte tardive chez les *Miscanthus sinensis* Goliath et Malepartus en janvier 2018, non présente chez *Miscanthus × giganteus*

Figure 32. Résultat de la modélisation des quantités d'azote des parties souterraines modélisées par le modèle linéaire segmenté grâce à la méthode « segmented » chez *Miscanthus sinensis* Goliath en 2017

Figure 33. Résultat de la modélisation des quantités d'azote des parties souterraines modélisées par le modèle linéaire segmenté grâce à la méthode « segmented » chez *Miscanthus × giganteus* en 2016

Chapter 2 – Fig1. Seasonal evolution of the nitrogen stocks in the above-ground and below-ground parts during the key periods for N recycling over the course of one year in *Miscanthus × giganteus* (based on Strullu (2011) and Dierking et al. (2017))

Chapter 2 - Fig2. Seasonal dynamics of above-ground, below-ground and total biomass in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years

Chapter 2 - Fig3. Seasonal dynamics of shoot numbers in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years

Chapter 2 - Fig4. Seasonal dynamics of above-ground, below-ground and whole plant nitrogen content in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years

Chapter 2 - Fig5. Nitrogen sources at date 3 (around September) in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

Chapter 3 - Fig1. Schematic representation of the different functional compartments according to their source or sink role.

Chapter 3 - Fig2. Seasonal dynamics of the proportions (%) of the different belowground functional compartments (Rhi_buds, Rhi_m and Rhi_SB) relative to the total biomass of the below-ground parts of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years.

Chapter 3 - Fig3. Seasonal dynamic of carbon and nitrogen reserve molecules concentrations in the four functional compartments of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third and fourth growing years

Chapter 3 - Fig4. Seasonal dynamics of nitrogen and soluble proteins concentrations in the main rhizome of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and *Miscanthus sinensis* Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years

Chapter 3 - Fig5. Seasonal dynamics of starch, sucrose and nitrogen concentrations in the main rhizome of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and *Miscanthus sinensis* Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years

Figure 34. Corrélations de Spearman entre les teneurs en molécules de réserve de l'azote et du carbone dans le rhizome principal, la hauteur relative de tige sénescence et les principales variables environnementales pour *Miscanthus × giganteus* en 2016, *Miscanthus sinensis* Goliath en 2016 et 2017 et *Miscanthus sinensis* Malepartus en 2016 and 2017.

Figure 35. Dynamique saisonnière de la concentration en amidon et en azote dans le rhizome principal de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus en 2016 et 2017

Figure 36. Projection des 9 variables et des individus colorés selon 3 clusters selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative au fonctionnement azoté des plantes (ACP 1).

Figure 37. Projection des 10 variables et des individus colorés selon 3 clusters selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative au stockage du carbone des plantes (ACP 2).

Figure 38. Projection des 17 variables et des individus colorés selon 3 clusters selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative au type de fonctionnement des plantes (ACP 3).

Figure 39. Projection des 19 variables selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative aux variables clés (ACP 4)

Figure 40. Corrélations de Spearman entre les variables de l'ACP 4 pour les trois génotypes pendant les deux années de culture.

Figure 41. Schéma récapitulatif du fonctionnement des trois génotypes étudiés

ABBREVIATIONS

$\delta^{15}\text{N}$: Signature isotopique en azote 15 (‰)

^{15}N : Azote 15

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADAS : Agricultural Development and Advisory Service

Amp : Amplitude thermique journalière (°C)

AR_a/NA₂ : Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes remobilisée à l'automne (%)

AR_b/NA₂ : Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes mise en réserve dans les parties souterraines à l'automne (%)

CH₄ : Méthane

CO₂ : Dioxyde de carbone

DJC : Degrés jours cumulés

DM : *Dry matter*, matière sèche

ETPP : Evapotranspiration Potentielle de Penman (mm jour⁻¹)

Excès ^{15}N : Excès isotopique en azote 15 (‰)

FE : Feuille étendard

GES : Gaz à Effet de Serre

GIEC : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat

HDFL : Hauteur de la dernière feuille ligulée (cm)

HS : Hauteur de tige sénescence (cm)

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

K : Potassium

k : coefficient d'extinction de la culture

LDAR : Laboratoire D'Analyses et de Recherche

L/NT₃ : Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière perdue pendant l'hiver (%)

M×g : *Miscanthus* × *giganteus*

Mg : Magnésium

MS : Matière sèche

Msac : *Miscanthus sacchariflorus*

Msin : *Miscanthus sinensis*

Msin Goliath : *Miscanthus sinensis* Goliath

Msin Malepartus : *Miscanthus sinensis* Malepartus

N₂O : protoxyde d'azote

N : *Nitrogen*, azote

Nbr_tiges : Nombre de tiges par plante

Nbr_feuilles : Nombre de feuilles par tige

Ndff : *Nitrogen derived from* fertilizer, quantité d'azote dérivée de la fertilisation (kg N ha⁻¹)

Ndff/NT₃ : Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption de la fertilisation marquée (%)

NH₄⁺ : Ammonium

NO₂⁻ : Nitrites

NO₃⁻ : Nitrates

N_{other} : Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption d'azote hors fertilisation marquée (%)

N_{rec} : proportion of fertilizer-N recovered in the plant (%), proportion de l'engrais retrouvée dans la plante

O₃ : Ozone

P : Phosphore

PAR : *Photosynthetic Active Radiation*, lumière photosynthétiquement active, entre 400 et 700 nm

PP : Cumul des précipitations (mm)

PRg : Perennial Rhizomatous Grasses = plantes pérennes rhizomateuses

Prop_Reserve_amidon : Proportion de la teneur en amidon parmi la teneur en glucides de réserves max (%)

Prop_Reserve_saccharose : Proportion de la teneur en saccharose parmi la teneur en glucides de réserves max (%)

Qte_15N_Nmin : Quantité d'azote 15 minéral dans le sol (kg N ha^{-1})

Rhi_SB : les quatre centimètres de rhizome des tiges considérées comme autotrophes portant au moins deux feuilles ligulées

Rhi_buds : les quatre centimètres de rhizome des bourgeons

Rhi_M : le reste du rhizome

Rg : Rayonnement Global (MJ m^{-2})

Rgcum : Rayonnement global cumulé (MJ m^{-2})

RUBISCO : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase

RUE : *Radiation Use Efficiency*, efficacité d'utilisation des rayonnements (g MJ^{-1})

SB : les sept centimètres du bas des tiges autotrophes portant au moins deux feuilles ligulées

Senes_50_Rgcum : Rayonnement global cumulé pour atteindre 50% de hauteur relative de tige de la première cohorte sénescence

Senes_50_TT : Degrés jours cumulés pour atteindre 50% de hauteur relative de tige de la première cohorte sénescence

SP_{an} : Sortie de panicules

SP_{an}_Rgcum : Rayonnement cumulé jusqu'à la sortie de la panicule

SP_{an}_TT : Degrés jours cumulés jusqu'à la sortie de la panicule

SR/NA₂ : Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes issue de la remobilisation de l'azote du rhizome au printemps (%)

t : tonne

Teneur_glucides_max : Teneur en glucides de réserve maximale dans le rhizome pendant l'hiver (mg g^{-1})

Teneur_N_max : Teneur en azote maximale dans le rhizome pendant l'hiver (mg g^{-1})

Teneur_N_PA_P16 : Teneur en azote dans les parties aériennes au prélèvement 16, à la fin de l'hiver en février (mg g^{-1})

Tiges_juin : Proportion du nombre maximal de tiges déjà émises en juin, au prélèvement 4 (%), nous renseigne sur le type d'émission de tiges des plantes (continue ou non, nombre)

Tiges_vertes_fevrier : Proportions du nombre de tiges vertes parmi les parties aériennes totales en février de l'année n+1 (%)

T_{max} : Température maximale ($^{\circ}\text{C}$)

T_{min} : Température minimale ($^{\circ}\text{C}$)

T_{moy} : Température moyenne ($^{\circ}\text{C}$)

T_{moy_nuit} : Température moyenne nocturne ($^{\circ}\text{C}$)

U/NT₃ : Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption d'azote exogène (%)

VPD : *Vapour Pressure Deficit*, déficit en pression de vapeur (Kpa)

WA : Biomasse aérienne (t MS ha^{-1})

WA_{max} : Rendement maximal des parties aériennes (t MS ha^{-1})

WB : Biomasse souterraine (t MS ha^{-1})

WT : Biomasse totale (t MS ha^{-1})

GLOSSAIRE

Biomasse lignocellulosique : la biomasse lignocellulosique est l'ensemble de la matière fournie par le vivant (biomasse) composée entre autre de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Elle est fournie par les déchets agricoles, forestiers et d'élevage ainsi que les déchets ménager compostables, et également par les cultures agricoles et forestières dédiées à la production de celle-ci.

Caduques (feuilles) : feuilles qui sénescent et tombent à la fin de la saison de végétation.

Caulinaires (feuilles) : feuilles attachées directement sur la tige sans pédoncule.

Culture pérenne : culture caractérisée par une absence de rotation et dont l'occupation du sol dure plusieurs années.

Efficience d'utilisation de l'eau : ratio entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau utilisée. Plus l'efficience d'utilisation de l'eau est élevée, moins les besoins en eau sont importants pour produire de la biomasse.

Feuille étendard : dernière feuille ligulée émise, précédant l'épiaison.

Gaz à Effet de Serre : les gaz à effet de serre sont des gaz naturels présents dans l'atmosphère de la planète, qui permettent de garder une température raisonnable à la surface de celle-ci en maintenant l'effet de serre.

Génotype : ensemble des caractères génétiques définissant un individu.

Ligulée (feuille) : feuille développée dont la ligule est visible.

Mulch : paillage sur le sol formé par les parties aériennes (feuilles et tiges) sénescentes qui sont tombées et restées au sol.

Productivité : quantification de la production par rapport à une surface et un temps donné.

Ressources fossiles : ressources limitées formées par la méthanisation d'êtres vivants et de matière organique enfouis dans le sol depuis des millions d'années.

Ressources renouvelables : ensemble des ressources naturelles dont les réserves sont inépuisables si elles sont correctement gérées car elles se régénèrent continuellement.

Rhizome : ensemble de tiges souterraines modifiées constituant, avec les racines, les parties souterraines du miscanthus et d'autres plantes pérennes.

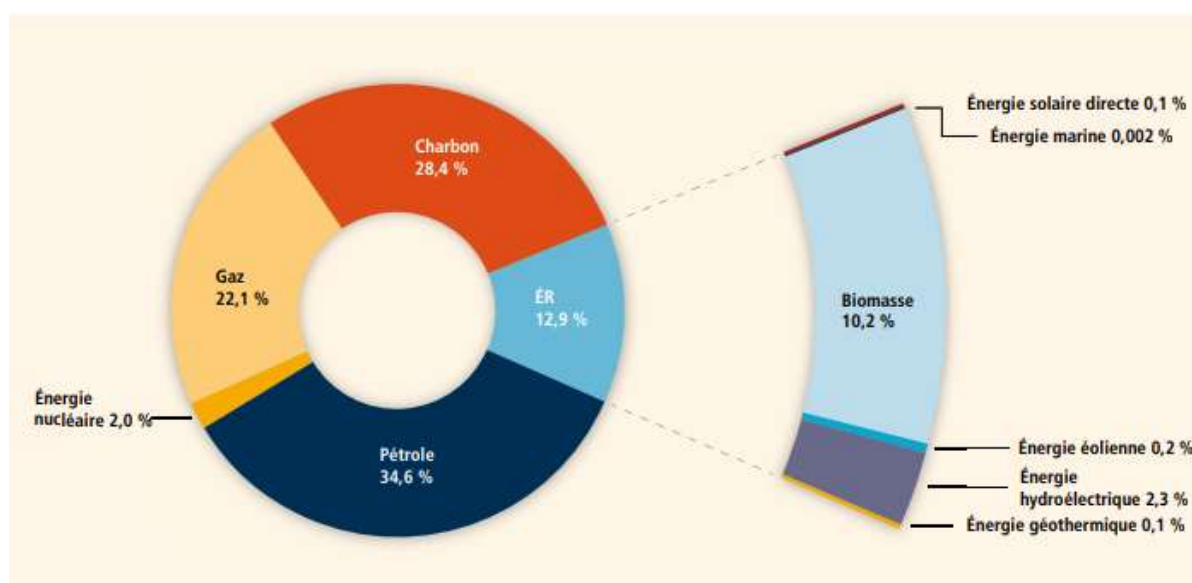


Figure 1. Parts des différentes sources d'énergies renouvelables (ER) dans l'approvisionnement mondial en énergie primaire en 2008 (GIEC, 2011)

Partie I – Contexte et enjeux de l'étude

1.1. Développer des ressources renouvelables pour diminuer l'utilisation des ressources fossiles

L'utilisation des ressources fossiles présente des conséquences néfastes sur l'environnement et la société

Selon le Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC, 2011), l'usage des ressources fossiles telles que le pétrole (représentant 34,6% de l'énergie primaire mondiale en 2008), le charbon (28,4%) et le gaz naturel (22,1%) présente des contraintes économiques, politiques, sociétales, sanitaires et climatiques (Figure 1). En effet, l'emploi de ces ressources est à l'origine de la majorité des émissions de gaz à effet de serre (GES). Le dioxyde de carbone (CO₂), le méthane (CH₄), le protoxyde d'azote (N₂O) et l'ozone (O₃), principaux GES, amplifient le phénomène naturel d'effet de serre, engendrent une augmentation de la température globale planétaire et accélèrent le réchauffement climatique (GIEC, 2011). La température globale terrestre a ainsi augmenté de 1,5°C entre 1920 et 2018 alors qu'elle était restée stable entre 1850 et 1920 (GIEC, 2019). Les événements climatiques extrêmes tels que les tempêtes de poussières, les sécheresses, les inondations ou encore les incendies incontrôlés se sont multipliés, impliquant une migration des populations, des conflits locaux pour les ressources et une aggravation de l'insécurité alimentaire (GIEC, 2019). Pour pallier toutes ces contraintes, il est nécessaire de développer des ressources renouvelables (GIEC, 2011), d'autant plus que la date d'épuisement des gisements des ressources primaires est proche, estimée à 50 à 150 ans (Abas *et al.*, 2015).

La bioénergie, une solution durable pour pallier la dépendance aux ressources fossiles

Une solution pour pallier l'utilisation des ressources fossiles est le développement des énergies renouvelables. Les ressources renouvelables peuvent être définies comme l'ensemble des ressources naturelles dont les réserves sont inépuisables si elles sont correctement gérées car elles se régénèrent continuellement. En 2008, les énergies renouvelables ne représentaient que 12,9% de l'approvisionnement mondial en énergie primaire (GIEC, 2011) (Figure 1). L'objectif n'est pas d'éliminer totalement l'usage des ressources fossiles, mais de combiner leur utilisation avec celle des ressources renouvelables. Six types d'énergies renouvelables sont

actuellement développées : l'énergie solaire, géothermique, hydroélectrique, marine, éolienne et la bioénergie (GIEC, 2011). La bioénergie, préconisée par le GIEC (GIEC, 2019), peut être issue de productions agricoles dédiées (productions forestières à rotation courte, algues, cultures lignocellulosiques...) ou de l'exploitation des déchets culturels ou d'élevage. L'utilisation des déchets permet de les recycler, mais leur volume est limité et leur usage plutôt que de les rendre au sol pourrait entraîner une dégradation des sols (GIEC, 2019). La production de biomasse lignocellulosique par des cultures dédiées est une bonne alternative mais doit être pensée pour ne pas entrer en compétition avec les surfaces alimentaires. La culture sur des terres marginales, c'est-à-dire les terres où une production alimentaire durable n'est pas possible, est fortement conseillée (GIEC, 2019). Les futures surfaces mondiales qui pourraient être dédiées à la bioénergie varient selon les scénarios climatiques et sont comprises entre 0,1 millions de kilomètres carrés, pour un scénario limitant le réchauffement planétaire à 3°C, à 7 millions de kilomètres carrés, pour un scénario limitant le réchauffement planétaire à 1,5°C (GIEC, 2019). La biomasse lignocellulosique peut être utilisée pour la production d'électricité, de chaleur, mais également de matériaux bio-sourcés ou entrer dans la chimie verte pour remplacer la pétrochimie. Afin d'obtenir une production durable, les espèces végétales choisies doivent répondre à certains prérequis :

- limiter les émissions de GES et stocker du carbone. Le secteur de l'agriculture, foresterie et autres usages des terres, est responsable de 23% des émissions mondiales anthropiques des GES avec 44% des émissions de CH₄ (dus à l'élevage des ruminants et à l'expansion de la riziculture), 13% des émissions de CO₂ et 82% des émissions de N₂O (dus à l'épandage d'azote) (GIEC, 2019) ;

- ne pas entrer en compétition avec les ressources alimentaires, c'est-à-dire ne pas être une culture alimentaire et ne pas utiliser les surfaces dédiées à l'alimentation ;

- présenter une forte productivité avec l'utilisation de la plus faible surface agricole possible. En effet, avec une population mondiale grandissante estimée à 7 à 13 milliards d'âmes en 2100, la surface planétaire utilisée par l'homme va s'étendre, engendrant une augmentation des GES mais aussi une perte des écosystèmes naturels et de la biodiversité (GIEC, 2019) ;

- posséder une forte capacité d'adaptation et de tolérance vis-à-vis des variations environnementales et notamment une tolérance aux stress abiotiques (résultant de contraintes climatiques et environnementales) et biotiques (résultant de l'action d'un organisme vivant)

pour assurer une sécurité de production face aux aléas climatiques qui se multiplient et s'intensifient ;

- avoir une efficience d'utilisation de l'eau élevée, autrement dit produire beaucoup de biomasse en utilisant peu d'eau. En effet, actuellement, l'agriculture est responsable de 70% de l'utilisation mondiale de l'eau douce (GIEC, 2019) et l'accroissement de la population mondiale renforcera la pénurie d'eau actuellement existante ;

- avoir une efficience d'utilisation de l'azote élevée ;

- rendre des services écosystémiques, ne pas impacter voire favoriser la biodiversité. Parmi ceux-ci, limiter la dégradation des sols puisque la vitesse d'érosion des terres agricoles est 10 à 100 fois supérieure à la vitesse de formation des sols, érosion aggravée par le changement climatique (GIEC, 2019) ;

- ne pas présenter de risque invasif pouvant être lié à l'introduction de nouvelles cultures ;

- réaliser une production à l'échelle locale pour éviter les coûts environnementaux liés aux déplacements à longue distance et favoriser l'indépendance énergétique locale.

Les cultures pérennes : de nombreux atouts pour produire de la biomasse lignocellulosique

Les cultures pérennes combinent nombre de ces prérequis et présentent de nombreux autres avantages, notamment des pertes d'azote réduites par rapport aux cultures annuelles (MacIssac *et al.*, 2010 ; Smith *et al.*, 2013; Lesur *et al.*, 2014) hormis durant la période d'établissement de la culture (Christian et Riche, 1998; Lesur *et al.*, 2014, cités par Ferchaud, 2015), une productivité importante, une potentielle séquestration du carbone (Poeplau et Don, 2014, cités par Ferchaud, 2015) et une économie d'énergie mécanique notamment car elles n'ont pas à être réimplantées chaque année (Schwartz et Amasino, 2013). De plus, les coûts de production estimés en Europe d'ici 2030, combinés à la stabilité de la production, rendra la production de biomasse lignocellulosique issues des plantes pérennes compétitive par rapport aux prix du pétrole et du gaz naturel et limitera l'émission des GES (Smeets *et al.*, 2009).

Parmi celles-ci, le miscanthus, et particulièrement *Miscanthus × giganteus* (*M×g*) est reconnu pour sa production de biomasse lignocellulosique grâce à sa forte productivité combinée à de faibles impacts environnementaux (Cadoux *et al.*, 2014 ; Tubeileh *et al.*, 2016).

En effet, *M×g* a présenté des rendements en biomasse aérienne ($19\text{--}24\text{ t ha}^{-1}\text{ an}^{-1}$) supérieurs au switchgrass, à la fétuque, la luzerne ou encore au triticale ($10\text{--}15\text{ t ha}^{-1}\text{ an}^{-1}$) pendant quatre années consécutives sur un sol fertile et profond du Nord de la France (Cadoux *et al.*, 2014). L'efficacité de conversion des radiations solaires d'une plante représente l'efficacité d'une plante à capter et transformer l'énergie lumineuse reçue en production de biomasse. La productivité importante de *M×g* est due en partie à sa meilleure efficacité de conversion des radiations solaires (2%) que le switchgrass (0,9%), engendrant une meilleure production de biomasse que le maïs en ne possédant que 70% de l'efficacité photosynthétique de ce dernier. Cette meilleure efficacité photosynthétique est liée à son anatomie, sa surface foliaire ainsi que de la durée de vie de ses feuilles qui lui permettent de présenter une meilleure efficacité de (Tubeileh *et al.*, 2016). Sa capacité photosynthétique à de faibles températures (Beale *et al.*, 1996 ; Naidu *et al.*, 2001 ; Naidu et Long, 2004) et son système racinaire profondément développé (Ferchaud *et al.*, 2015) sont en effet des atouts par rapport aux autres cultures. L'efficacité d'utilisation des rayonnements ou *Radiation Use Efficiency* (RUE) est une mesure de la biomasse produite par unité de rayonnement intercepté. La RUE est variable chez le miscanthus en fonction des sites : entre 2,3 et 4 g MJ⁻¹ pour *M×g* et 1,66 et 1,90 g MJ⁻¹ pour *Msin* Goliath (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Tayot *et al.*, 1994 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Vargas *et al.*, 2002 ; Strullu *et al.*, 2013 ; Davey *et al.*, 2017). En comparaison avec le switchgrass, la RUE de *M×g* est plus faible que certains cultivars (2,24 à 3,71 g MJ⁻¹ contre 3,20 à 4,30 g MJ⁻¹) ou équivalente (3,70 g MJ⁻¹) (Kiniry *et al.*, 2012). Le miscanthus permettait d'éviter l'émission de 8,6 t eq CO₂ ha⁻¹ an⁻¹, résultat supérieur au switchgrass, triticale, sorgho fibre, à la luzerne ou encore fétuque (entre 1 et 7 t eq CO₂ ha⁻¹ an⁻¹) avec un plus fort potentiel de production d'éthanol (entre 5 et 6 t ha⁻¹ an⁻¹) comparé aux cultures citées précédemment (1 à 4 t ha⁻¹ an⁻¹) (Cadoux *et al.*, 2014).

En résumé, l'utilisation des ressources fossiles a des conséquences néfastes sur l'environnement et sur la société. Pour diminuer leur usage, il est possible de développer des ressources dites renouvelables et parmi elles, la biomasse lignocellulosique issue de cultures dédiées semble être une bonne alternative pour produire des biomatériaux, de la bioénergie ou de la chimie verte. A cause de leur volume limité, les déchets végétaux ne peuvent être utilisés pour la production de bioénergie à grande échelle, et la production de biomasse via les plantes pérennes est une solution intéressante. Leur culture doit répondre à plusieurs critères pour que leur production soit durable : limiter les émissions de GES, ne pas entrer

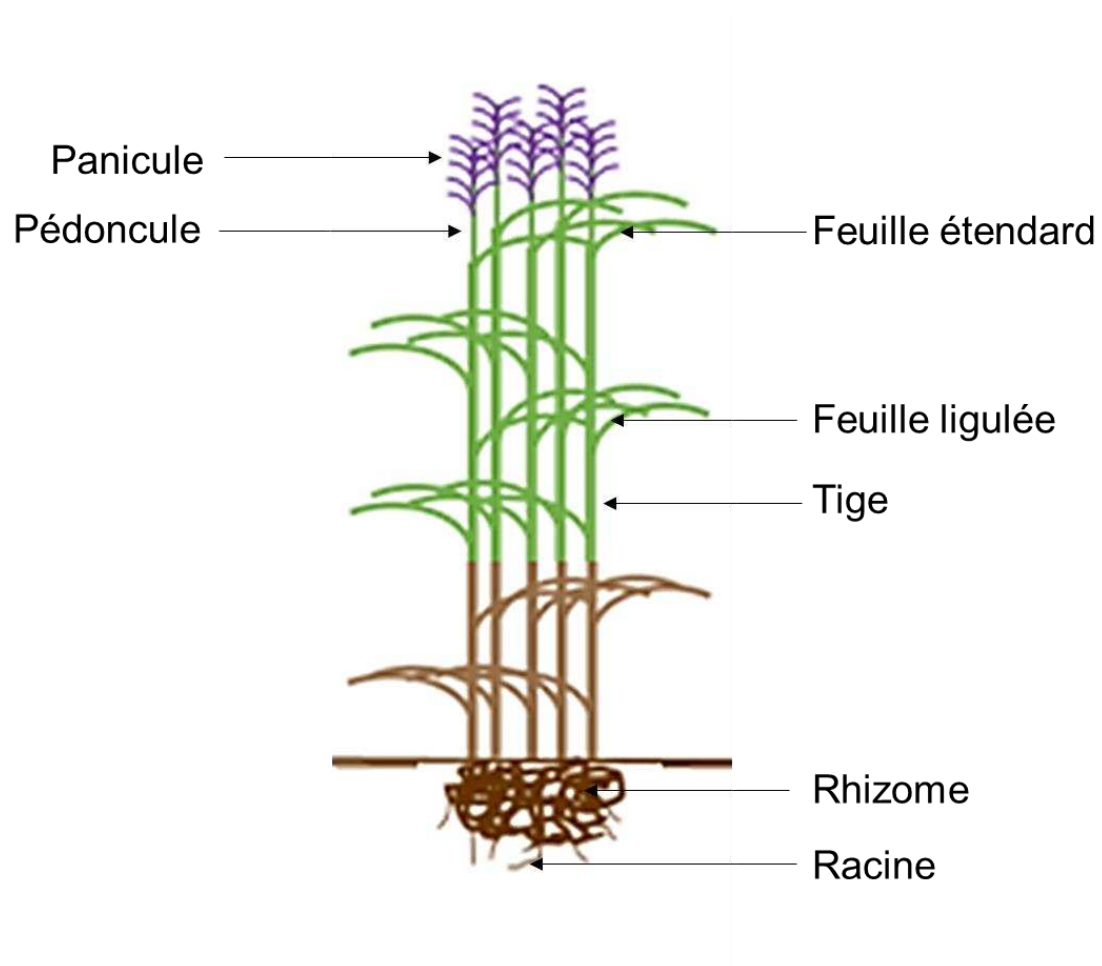


Figure 2. Schéma d'une plante de miscanthus durant la floraison

en compétition avec les ressources alimentaires, c'est-à-dire ne pas être une culture alimentaire et ne pas utiliser les surfaces dédiées à l'alimentation, présenter de fortes productivité et efficience d'utilisation de l'eau, une bonne tolérance aux stress et rendre de nombreux services écosystémiques en ne dégradant pas voire même en participant à la restauration des écosystèmes. Miscanthus × giganteus grâce à sa productivité élevée, alliée à de faibles impacts environnementaux, répond à ces nombreux prérequis.

1.2. Miscanthus × giganteus : un hybride interspécifique déjà cultivé pour la production de biomasse lignocellulosique

Généralités

Le miscanthus appartient à la famille des *Poaceae*, tribu des *Andropogoneae*, du genre *Miscanthus*. Le terme *Miscanthus* est dérivé du grec « *mischos* » faisant référence au pédoncule qui porte l'inflorescence, et « *anthos* » qui fait référence à la fleur (Clifton-Brown *et al.*, 2008). Cette plante pérenne, implantée pour une vingtaine d'années, possède un rhizome c'est-à-dire un ensemble de tiges souterraines modifiées (Mitros *et al.*, 2020) accompagné de racines constituant les parties souterraines (Figure 2). Les parties aériennes sont composées d'un ensemble de 25 à 75 tiges feuillées par plante (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015), terminées par une inflorescence de type panicule au moment de la floraison. La sortie de la panicule et la floraison sont dépendantes des génotypes et des localisations (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Lewandowski *et al.*, 2016 ; Jensen *et al.*, 2017). Le rhizome est un organe de stockage à long terme qui permet au miscanthus de réaliser le recyclage des nutriments, une des raisons pour laquelle le miscanthus possède des besoins en fertilisation azotée faibles si l'on respecte cette période de recyclage (*cf.* section 1.4). La dernière révision taxonomique (Sun *et al.*, 2010) fait état de six espèces du genre *Miscanthus* : *M. floridulus*, *M. sinensis* (*Msin*), *M. sacchariflorus* (*M sac*), *M. nepalensis*, *M. paniculatus* et *M. nudipes* qui se distinguent par leur hauteur, le diamètre de leurs tiges et les caractéristiques de leurs panicules. Ces espèces sont originaires de différents milieux en Asie (Figure 3). *Miscanthus sinensis* 'Giganteus' (Greef et Deuter, 1993), maintenant connu sous le nom *Miscanthus × giganteus* (*M×g*) (Hodkinson *et al.*, 2002a) est un hybride triploïde stérile issu de plusieurs croisements spontanés entre *M. sacchariflorus* (*M sac*) tétraploïde et *M. sinensis* (*Msin*) diploïde (Linde-Laursen, 1993 ; Hodkinson *et al.*, 2002b ; Mitros *et al.*, 2020). C'est cette vigueur hybride qui permet à *M×g* de présenter une forte productivité (Heaton *et al.*, 2010). De plus, le métabolisme photosynthétique en C₄ du

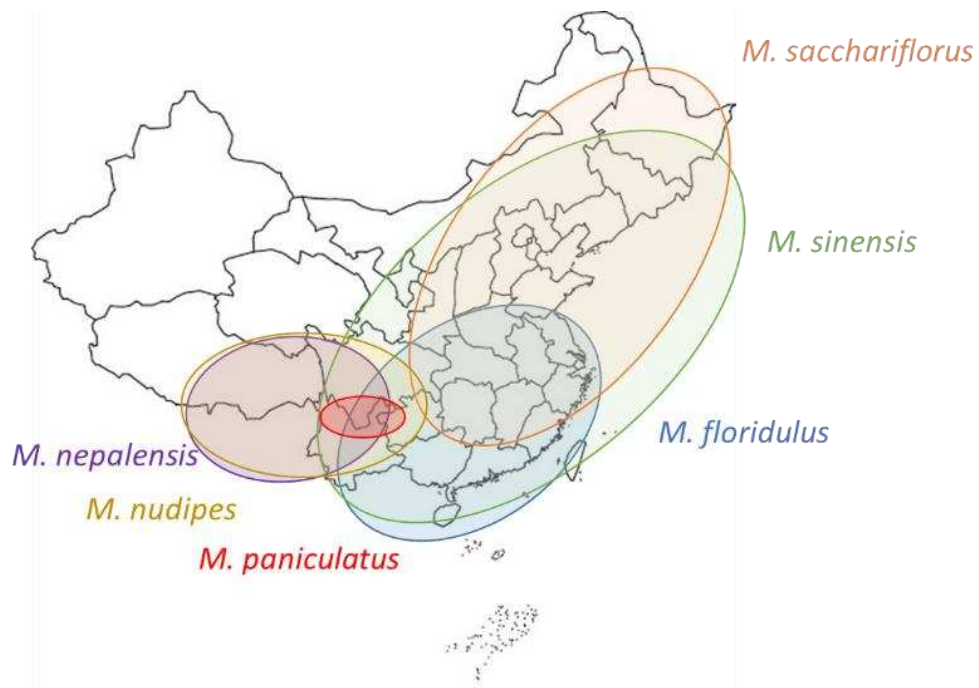


Figure 3. Carte de l'origine géographique des différentes espèces de miscanthus d'après
 Sun *et al.* (2010)
 (Source carte : carte-du-monde.net)

miscanthus, et sa tolérance au froid lui permettent d'allonger sa période végétative et participent à une meilleure efficacité de production (Dohleman et Long, 2009 ; Heaton *et al.*, 2010). Il a été introduit au Danemark en 1935 par le botaniste Aksel Olsen à des fins ornementales (Linde-Laursen, 1993), puis a ensuite été cloné et distribué dans toute l'Europe pour devenir commun en ornement (Clifton-Brown *et al.*, 2015). *M×g* a été reconnu comme intéressant pour la production de biomasse lignocellulosique en Europe dès les années 1960 par un homme d'affaires danois qui installa une première parcelle de 1000 m² en 1967 dans le Jutland pour produire du papier (Clifton-Brown *et al.*, 2015). Actuellement la culture de *M×g* est en pleine expansion : en 2019, il était cultivé sur 6 441 ha en France contre 4 032 ha quatre ans plus tôt soit une progression de 13% des surfaces cultivées par an qui sont principalement localisées dans la moitié nord de France (chiffres communiqués par France Miscanthus).

La recherche sur le miscanthus : récente mais déjà conséquente

Dans les années 60, l'horticulteur allemand Ernst Pagels débute la création variétale en créant une collection de miscanthus qui fleurissent et produisent des graines viables sous nos latitudes. C'est de cette collection que sont nés les clones hybrides actuellement bien connus en ornement tels que Silber Fed, Zebrinus ou encore Goliath (Clifton-Brown *et al.*, 2015). La recherche concernant la production de biomasse a véritablement débuté en Europe dans les années 1980 (Figure 4). En effet, l'augmentation des prix de l'énergie à cette époque engendre le développement de projets de recherche en Europe sur la production de biomasse lignocellulosique. Les différents thématiques de recherche ont été développées au rythme des politiques européennes et internationales. Les premiers projets de recherche avaient pour objectif de caractériser la production de biomasse de *M×g* dans différents contextes pédoclimatiques. De plus, présentant une qualité de biomasse unique, la qualité de biomasse fournie par *M×g* n'est pas toujours la plus adaptée à certains débouchés. Pour pallier cela, d'autres espèces de miscanthus sont étudiées et la sélection variétale se développe. De nombreux chercheurs ont organisé des collectes de ressources génétiques en Asie pour les cultiver et les étudier en Europe (Clifton-Brown *et al.*, 2015 ; Clifton-Brown *et al.*, 2018). L'étude de ces différentes espèces en contextes pédoclimatiques variables a montré que certaines étaient plus adaptées à certaines zones de production que d'autres car plus tolérantes à certains stress (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Lewandowski *et al.*, 2016). De 1990 à 2010, la nécessité de réduire les émissions des GES a accéléré la recherche sur la production de bioénergie par le miscanthus, basée maintenant sur la productivité, les différents stress biotiques

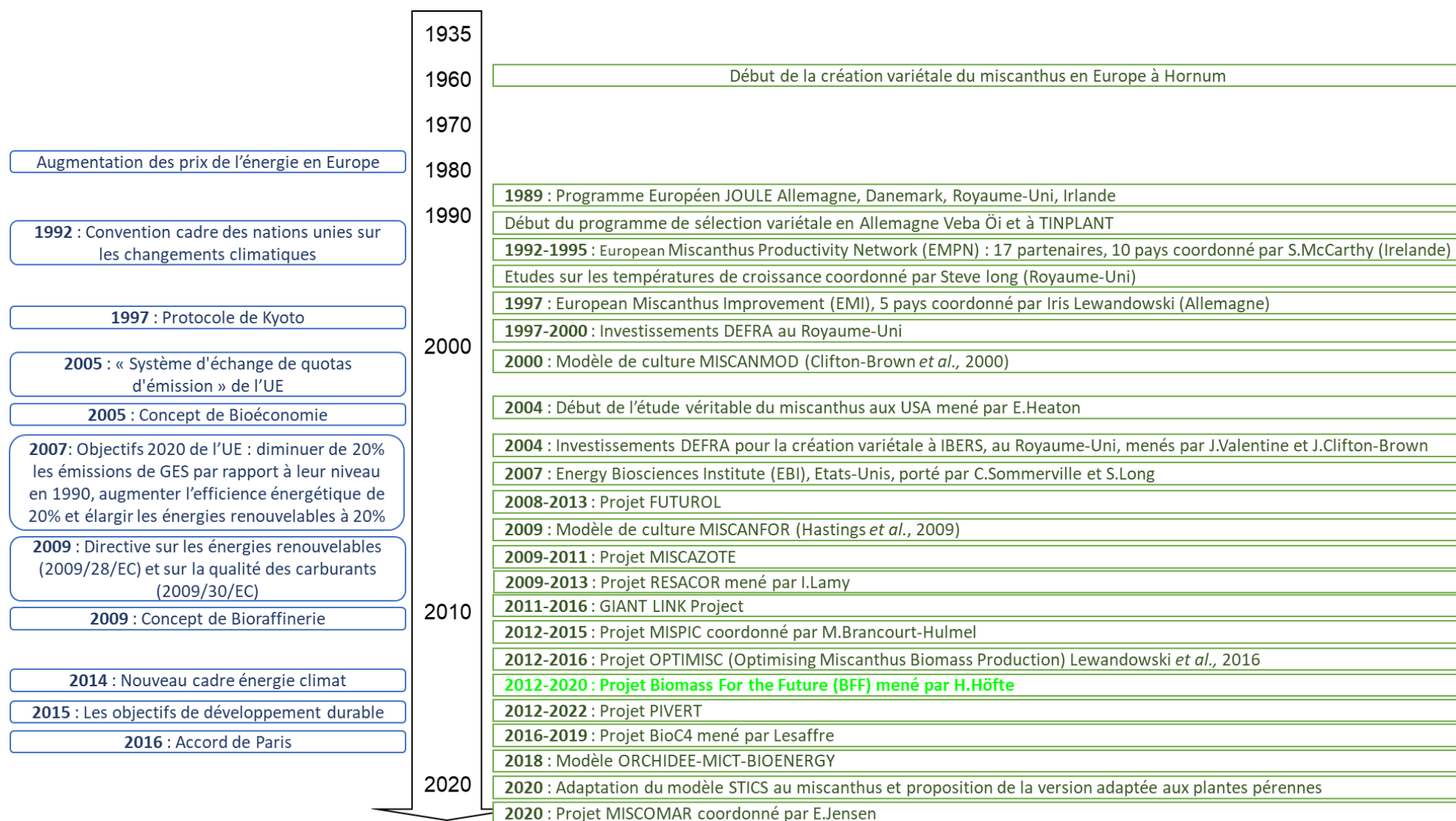


Figure 4. Historique non exhaustif de la recherche sur le miscanthus d'après Heaton *et al.* (2010) et Ben Fradj *et al.* (2020)

et abiotiques, les pratiques culturales, la gestion du caractère invasif et le fonctionnement azoté (Ben Fradj *et al.*, 2020). A partir des années 2000, les outils de modélisation sont mis en œuvre et le premier modèle de fonctionnement du miscanthus voit le jour : MISCANMOD (Clifton-Brown *et al.*, 2000). Il sera amélioré en 2009 grâce à la création de MISCANFOR (Hastings *et al.*, 2009). Le modèle plante-sol-atmosphère STICS, permettant l'étude des impacts environnementaux de la culture, a été adapté au miscanthus avec une version 10 présentée en 2020 (Strullu *et al.*, 2020) tout comme le modèle ORCHIDEE, devenu ORCHIDEE-MICT-BIOENERGY (Li *et al.*, 2018). Depuis 2010, la bioéconomie se développe et les différents débouchés sont étudiés. Bien entendu, pour limiter la compétition avec les surfaces pouvant être dédiées à la production alimentaire, l'étude de la culture de différentes espèces de miscanthus sur des terres dites marginales, c'est-à-dire où la production alimentaire n'est pas envisageable de manière durable, est toujours au cœur de la recherche. Récemment, des études sur le potentiel de phytoremédiation du miscanthus ont été initiées comme le projet français RESACOR (2009-2013), l'étude de croissance de différents génotypes sur des terres polluées dans le second workpackage du projet français Biomass For the Future (BFF) (2012-2020) ou encore le projet européen MISCOMAR (2020-2023).

Des pratiques culturales simples mais qui pourraient être encore améliorées

Bien que la plantation sur des terres dites marginales et des sols non valorisables pour d'autres cultures (sols peu profonds, peu fertiles, très caillouteux, pollués, ...) soit un enjeu à l'avenir, les sols profonds (60 cm minimum) et bien alimentés en eau favorisent l'obtention d'un rendement maximal. Le choix de la parcelle est réalisé en fonction de l'accessibilité de celle-ci : en effet, le sol doit présenter une portance suffisante pour la récolte en fin d'hiver. Il est recommandé d'implanter le miscanthus au printemps (mars-avril) dans un sol ressuyé et réchauffé (8°C), de pH compris entre 5,5 et 7,5 (RMT Biomasse, 2012) même si l'implantation peut se réaliser avec succès à l'automne (Brancourt-Hulmel, communication personnelle). Le sol est préparé finement comme pour la plantation de pomme de terre ou le semis de maïs, sur une grande profondeur à l'aide d'un déchaumeur à disques, d'une charrue, d'un vibroculteur puis d'une herse rotative par exemple (RMT Biomasse, 2012). Toutefois, une étude récente a montré qu'il est possible de réaliser directement l'implantation sur un sol non travaillé en éliminant la végétation préexistante, par exemple par coupe à 5 cm pour une prairie, et de s'assurer par la suite que la repousse de végétation ne concurrence pas les jeunes pousses de miscanthus (Xue *et al.*, 2017). Il est à noter que dans ce cas, la présence de taupins due à une

culture prairiale précédente peut réaliser des dégâts importants sur les nouveaux rhizomes (RMT Biomasse, 2012). Il existe plusieurs possibilités pour l'implantation du miscanthus (Xue *et al.*, 2015). La plantation de fragments de rhizomes est la solution la plus couramment utilisée et la moins onéreuse (1904–3376 € ha⁻¹) (Xue *et al.*, 2015). Des fragments de rhizomes de petite taille (au minimum 20 g, l'optimal se situant autour de 30-40 g) portant trois à cinq bourgeons sont déposés dans la terre à une profondeur de 10 cm par une planteuse spécialisée ou planteuse à pomme de terre modifiée, adaptée à partir d'un châssis de semoir ou semi-automatique (RMT Biomasse, 2012 ; Gumentyk et Kharytonov, 2018). Des rhizomes issus de pieds-mères âgés de deux à cinq ans donnent des résultats optimaux (RMT Biomasse, 2012). Il est également possible d'implanter des plantules dérivées de la culture de rhizome en serre ce qui améliore le taux d'implantation grâce au système racinaire déjà développé (Xue *et al.*, 2017) : Ouattara *et al.* (2020) observent respectivement un taux d'implantation et un taux de reprise des plantules de 87% et 94% significativement supérieurs aux 77% et 86% obtenus à partir de fragments de rhizome. Cette solution est plus onéreuse que la première (4241-4401 € ha⁻¹) à cause du plus important travail du sol nécessaire et de la culture des plantules en serre en amont (Xue *et al.*, 2017). La qualité des rhizomes s'est améliorée aujourd'hui et avoisine un taux de reprise de 95% (De Maupeou, communication personnelle). Pour ces deux premières solutions, la densité de plantation est de 1 à 2 plants m² soit 10 000 à 20 000 pieds ha⁻¹ (pour une densité de peuplement finale de 10 000 à 15 000 pieds ha⁻¹) avec un inter-rang de 80 cm (RMT Biomasse, 2012). La micropropagation en culture *in-vitro* suivie du repiquage des plantes en serre puis au champ permettrait d'augmenter le taux de division des plantes et fournir beaucoup de matériel végétal mais cette solution est la plus onéreuse (6320.8 € ha⁻¹) donc non utilisée pour le moment (Xue *et al.*, 2017). Enfin, le semis de graines de miscanthus est la solution la plus économique (1508.5€ ha⁻¹) mais n'est pas adaptée pour *M×g* qui est un hybride stérile qui se reproduit de manière végétative. En revanche, le développement d'espèces pouvant être semées sans risque invasif est en cours et un individu de ce type a déjà été créé par Sacks *et al.* (2013). Si des dégâts de gel interviennent la première année, il est possible de devoir procéder à une replantation des rhizomes détruits pour une culture de *M×g*, ce qui a un coût supplémentaire et est moins facile à réaliser car la mécanisation n'est pas possible en cas de dégâts hétérogènes dans la parcelle (Huisman *et al.*, 1997). En effet, des gelées tardives peuvent causer des dégâts importants, d'autant plus si de jeunes parties aériennes sont déjà développées, puisque la température létale des tiges est de -8°C (Farell *et al.*, 2006) et celle des rhizomes est comprise entre -2,6°C et -3,4°C pour *M×g* (Clifton-Brown et Lewandowski, 2000b ; Fonteyne *et al.*, 2016). Des



Figure 5. *Mulch* présent sur une parcelle de *Miscanthus × giganteus* âgé de 5 ans
(Source : INRAE – Julie LEROY)

températures de sol inférieures à $-4,5^{\circ}\text{C}$ ont entraîné la destruction totale d'un essai planté avec différents génotypes de $M \times g$ (Clifton-Brown *et al.*, 2001).

Le désherbage est réalisé de manière chimique avec des produits homologués sur le maïs en vérifiant la sélectivité du miscanthus type pendiméthaline ou mécanique en utilisant une herse étrille ou une bineuse durant les deux premières années uniquement puisque le miscanthus n'est pas assez compétitif avec les adventices à ces stades (Lewandowski *et al.*, 2000). Par la suite, les feuilles tombées au sol l'hiver forment un *mulch* qui limite l'enherbement de la culture (Figure 5). L'irrigation de la culture en première année est également recommandée pour assurer une bonne implantation étant donné que le système racinaire est très peu développé. Il n'y a pas de consensus concernant la fertilisation azotée recommandée chez $M \times g$: alors que certains auteurs rapportent un effet positif de la fertilisation sur le rendement, d'autres ne l'observent pas (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015). L'effet de la fertilisation azotée chez $M \times g$ semble être amplifié par l'irrigation (Cadoux *et al.*, 2014). Cependant le miscanthus nécessite 18% d'azote en moins que le maïs ou le sorgho pour produire la même quantité de biomasse (Zapater *et al.*, 2017). Ces faibles besoins dépendent certainement du type de sol et du type de récolte (Witzel et Finger, 2016) et la fertilisation doit être réfléchie en fonction de ces paramètres. Il est important de noter que le soin apporté à l'implantation et aux premières années de culture déterminera les futurs rendements.

Le miscanthus est récolté chaque année, une fois par an, à l'exception de la première année, où il est classiquement broyé et restitué au sol en février ou mars de l'année suivant l'implantation. La récolte réelle avec exportation de biomasse ne débute qu'à partir de la deuxième année de culture et peut être réalisée à deux stades. La récolte dite « en vert » a lieu à l'automne, souvent en octobre, avant la sénescence complète de la plante grâce à une ensileuse qui ensile les plantes dont l'ensilage est ensuite transporté en remorque vers les lieux de stockage et d'utilisation. Le taux de matière sèche (MS) est alors de 40 à 50% et le rendement varie de 15 à 25 t ha⁻¹ an⁻¹ (Zub et Brancourt, 2010). Ce type de récolte induit une perte de production de biomasse au fil des années en cas de non fertilisation car le recyclage de l'azote mais aussi des autres nutriments contenus dans les parties aériennes n'est pas complètement abouti (Strullu *et al.*, 2011 ; Ruf *et al.*, 2017 ; Parrish *et al.*, 2021). D'ailleurs, une fertilisation azotée seule ne permet pas de réduire l'écart de rendement entre une culture récoltée « en vert » et une culture récoltée « en sec » après la sénescence (Parrish *et al.*, 2021). La récolte dite « en sec », la plus couramment pratiquée, a lieu à la fin de l'hiver, avant l'apparition des premiers bourgeons de l'année en février ou mars, grâce à une faucheuse ou une ensileuse. En cas

d'ensilage, les fragments de miscanthus sont également transportés en remorque vers les lieux de stockage et d'utilisation. En cas de fauche, des ballots sont réalisés sur place grâce à une presse puis transportés sur des plateaux vers les lieux de stockage ou d'utilisation. Le taux de matière sèche est alors de 70 à 85%, le rendement varie de 5 à 30 t MS ha⁻¹ et les proportions de cellulose, hémicellulose et lignine sont respectivement comprises entre 40 et 50% MS, 25% et 35% MS et 7 à 11% MS (Zub et Brancourt, 2010 ; Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015). Ce type de récolte respecte complètement le recyclage des nutriments, limite l'exportation de ceux-ci lors de la récolte de la biomasse et préserve la durée de vie de la culture (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Schwartz et Amasino, 2013). La diminution du rendement entre la récolte d'automne et celle de la fin d'hiver est due à la chute des feuilles, la dégradation des parties aériennes restantes mais également à la remobilisation des nutriments des parties aériennes vers les parties souterraines (voir section 1.4). Cette diminution du rendement pendant l'hiver est accrue en cas de neige ou de précipitations (Gauder *et al.*, 2012). En fonction des localisations, une récolte en décembre pourrait être envisagée : Heaton *et al.* (2009) ont montré que la concentration et la quantité d'azote dans les parties aériennes ne diminuait plus vraiment ou très peu entre décembre et février ; ils suggèrent ainsi que la remobilisation de l'azote est déjà terminée. De plus Jensen *et al.* (2017) suggèrent que chez certains génotypes, la récolte en décembre ne diminuerait pas la qualité de combustion de la biomasse. Cette récolte en décembre permettrait de limiter la perte de rendement qui a lieu en hiver mais nécessite un sol assez sec et portant pour ne pas abîmer la parcelle en récoltant dans de mauvaises conditions. La hauteur de coupe préconisée pour obtenir un bon rendement et laisser au sol le *mulch* nécessaire est de 15 à 20 cm (Besnard *et al.*, 2013).

La production de biomasse de *M×g* présente trois phases : une phase d'établissement du rendement, un plateau de production de biomasse puis un déclin de la production (Lewandowski *et al.*, 2000 ; Lewandowski *et al.*, 2003 ; Clifton-Brown *et al.*, 2007 ; Christian *et al.*, 2008 ; Lesur *et al.*, 2013 ; Larsen *et al.*, 2014). La phase d'établissement du rendement dure 3 à 6 ans à partir de l'implantation en fonction de la localisation, du climat et de la densité des plantes (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015), le rendement maximal peut même s'obtenir dès la deuxième année lors d'années très favorables (Brancourt-Hulmel, communication personnelle). Durant cette phase, la stratégie de croissance est différente par rapport aux plantes plus âgées : les jeunes plantes (1 an) ont tendance à émerger plus tardivement mais présentent une croissance plus rapide, contrairement aux plantes plus âgées (2 et 3 ans) qui émergent plus tôt mais grandissent moins vite (Tejera *et al.*, 2021). Vient ensuite le plateau de production de

biomasse où les rendements varient entre années en fonction des conditions climatiques mais restent tout de même à leurs maxima (Lesur *et al.*, 2013). Finalement la production de biomasse décline au bout d'une vingtaine d'années en fonction du site de production (Lewandowski *et al.*, 2003 ; Lesur *et al.*, 2013).

La destruction de la culture, au bout de quinze à vingt ans, est réalisée en trois étapes. La première consiste en un broyage de la biomasse aérienne en juin, une grande partie des ressources nutritives étant alors stockée dans les feuilles et tiges, cette action a pour but d'épuiser le rhizome. Puis quinze jours à trois semaines après le broyage, une fragmentation du rhizome à l'aide d'un rotovator est réalisée. Enfin, un dernier passage de cet outil ainsi qu'un à deux passages de chisel fin-juillet début-août permettent de remonter à la surface les derniers fragments de rhizomes et entraînent leur dessèchement (RMT Biomasse, 2012).

La biomasse lignocellulosique du miscanthus est polyvalente et alimente de nombreux débouchés

Historiquement, le miscanthus, et notamment *Msin*, était connu et utilisé en Asie depuis des décennies pour la construction des maisons traditionnelles (notamment les toitures), pour produire de la teinture jaune et des sacs pour le transport de charbon, comme aliment pour le bétail et fertilisant organique (rapporté dans Stewart *et al.*, 2009). Voici une liste non exhaustive des différents débouchés actuels développés ou à l'étude à partir de la biomasse de miscanthus : production de chaleur et d'énergie par combustion, litière animale, paillage horticole, alimentation bovine, matériaux de construction biosourcés (biociments, bétons allégés, panneaux de fibres...), méthanisation, production de bioéthanol, chimie verte entrant dans l'alimentation ou la pharmacologie, plastiques biosourcés (industrie automobile, pots de fleurs...), production de pâte à papier, de géotextiles biodégradables, phytoremédiation ou encore pour l'utilisation du biochar issu de la pyrolyse de la biomasse comme amendement (Ben Fradj *et al.*, 2020). Actuellement en France, le débouché chauffage ou biocombustible représente les 2/3 de l'utilisation de la production, et la litière animale et le paillage horticole constituent les deuxième et troisième débouchés majoritaires (chiffres communiqués par France Miscanthus). La biomasse récoltée étant différente en termes de composition et de teneur en matière sèche en fonction du type de récolte, les débouchés dépendent de la date de récolte.

La récolte en « vert » permet une utilisation en alimentation bovine : incorporé à la ration à hauteur de 0,6 à 0,9 kg/vache/jour, il favorise la rumination et augmente le taux

butyreux ou teneur en matière grasse du lait. Des filières de méthanisation sont en cours de développement (Brosse *et al.*, 2012). La production de bioéthanol à partir de miscanthus récolté en « vert » ou en « sec » est également étudiée. La quantité d'éthanol obtenue par quantité de MS est supérieure lors de la récolte en « sec » par rapport à la récolte en « vert », cependant la récolte en « vert » proposant de meilleurs rendements, la quantité d'éthanol produite par hectare est meilleure lors de la récolte précoce (Hayes, 2013). *M×g* présente des rendements en éthanol théorique plus importants (~5 600 L ha⁻¹) que le switchgrass (~3 700 L ha⁻¹) par exemple (Scagline-Mellor *et al.*, 2018).

La récolte en « sec » permet une valorisation en combustible, pour la production de chaleur ou d'électricité. Avec une quantité d'énergie fournie de 17 GJ t MS⁻¹, équivalente à celle du peuplier et du saule, un rendement moyen plus élevé que ces espèces (20,3 t ha⁻¹ an⁻¹ contre 10 t ha⁻¹ an⁻¹ pour le peuplier et le saule) et des coûts de production moindres (76-83,3 € par temps de séchage contre 101,1-143,4 pour le peuplier et 69,4-75,4 pour le saule), le miscanthus pourrait remplacer la biomasse ligneuse (Diamantidis et Koukios, 2000). Il est également possible de produire des pellets à partir du miscanthus (récolte en sec), et ceux-ci ont l'avantage de présenter des impacts environnementaux globalement plus faibles que ceux du bois, notamment grâce au fait qu'il n'a pas besoin d'être séché par rapport au bois avant d'être mis en pellet, avec un potentiel de réchauffement climatique estimé dans cette étude à 121,6 kg de CO₂ pour une tonne de pellets produits, 8% plus faible que le bois (Fusi *et al.*, 2021). La litière de miscanthus dépoussiérée est également très plébiscitée en élevage équin, caprin et de volailles car le miscanthus est trois fois plus absorbant que la paille de blé (Valbiom, 2009). Les produits de récolte en sec sont également utilisés en paillage horticole, ou incorporés pour la fabrication de bioplastiques (exemple : Biomiscanthus®). Elle offre également la possibilité de fabriquer des matériaux de construction (béton léger, briques de miscanthus, toits en chaume, murs anti-bruits ...). En effet, un bloc porteur en béton constitué de 60% de broyats de miscanthus en substitution aux granulats naturels a été créé par l'entreprise Ciments Calcia et Alkern (Workpackage 1 du projet BFF). *M×g* est un candidat potentiel pour la phytoremédiation des sols contaminés au cadmium, mercure, zinc, chrome et plomb car sa production de biomasse n'est pas impactée par la présence de ces métaux lourds qui sont accumulés dans ses parties aériennes (Barbosa *et al.*, 2015 ; Nsanganwimana *et al.*, 2016 ; Krzyzak *et al.*, 2017 ; Andrejic *et al.*, 2018 ; Zgorelec *et al.*, 2020). Il est d'ailleurs possible d'allier phytoremédiation et pharmacologie : en effet, à partir de miscanthus cultivé sur des sols contaminés aux métaux lourds, deux biocatalyseurs peuvent être créés et utilisés pour produire

Tableau 1. Avantages et inconvénients de la culture du miscanthus actuelle d'après Jørgensen (2011) et Mc Calmont *et al.* (2017)

*avantages ou inconvénients démontrés uniquement sur *Miscanthus × giganteus*

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • *Productivité élevée : <ul style="list-style-type: none"> ○ Métabolisme photosynthétique en C4 ○ Tolérance au froid • Efficience d'utilisation de l'eau élevée • Impacts environnementaux limités : <ul style="list-style-type: none"> ○ Besoins en fertilisation azotée réduits ○ Emission de N₂O du sol limitée ○ Lixiviation des NO₃⁻ limitée ○ Emission de CO₂ limitée ○ Stockage de carbone dans le sol ○ Protection phytosanitaire non nécessaire ○ Peu d'intervention mécanisée en parcelle • Services écosystémiques : <ul style="list-style-type: none"> ○ Améliore la biodiversité en termes de micro et de macro faunes ○ Eligible aux Surfaces d'Intérêt Ecologique depuis 2018 ○ Améliore la qualité de l'eau de drainage ○ Couvert hivernal limitant les érosions hydrique et éolienne du sol • Culture non alimentaire • *Stérile et non invasif 	<ul style="list-style-type: none"> • *Culture monoclonale donc qualité de biomasse peu variable • Densité faible donc coûts de transport et de stockage élevés • *Culture monoclonale donc risque sanitaire • Sensibilité aux incendies quand la culture est sénescence • Réservoir possible de pathogènes d'autres cultures • Absence de marché bien établi pour la valorisation • Champ dédié à une seule culture pendant 20 ans • *Coûts d'implantation élevés

du moclobémide une substance active utilisée dans le traitement de la dépression (Guérin *et al.*, 2021). La production de papier à partir de fibres de miscanthus, déjà pratiquée depuis longtemps en Asie, est envisagée en Europe (Ververis *et al.*, 2004 ; Stewart *et al.*, 2009). Le miscanthus peut également être utilisé comme substrat pour faire pousser des légumes en hydroponie (Kraska *et al.*, 2018). Enfin, plus étonnant encore, les fibres de miscanthus pourraient aussi remplacer les fibres pour la fabrication des croquettes à destination des chiens (Donadelli et Aldrich, 2019).

Avantages et inconvénients de la culture actuelle du *Miscanthus* × *giganteus*

Les avantages et inconvénients de la culture actuelle de miscanthus pour la production de biomasse lignocellulosique sont présentés dans le Tableau 1. Les avantages et inconvénients marqués d'un astérisque (*) ont été démontrés pour le moment uniquement sur *M*×*g*.

La forte productivité du miscanthus, et notamment de *M*×*g*, est liée à une forte production de biomasse, grâce à son métabolisme photosynthétique en C₄ de type NADP-ME, une forte RUE et une efficacité d'interception maximale proche de 1 entre juin et août (Greef et Deuter, 1993 ; Van der Werf *et al.*, 1993 ; Tayot *et al.*, 1994 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Vargas *et al.*, 2002 ; Strullu *et al.*, 2013 ; Davey *et al.*, 2017). L'assimilation du carbone se fait la journée *via* la photosynthèse (Barnes, 1893 ; Smith et Stitt, 2007). Elle se déroule en 2 phases : une phase photochimique qui résulte en la production d'énergie sous forme d'ATP et de NADPH. Ces molécules alimentent ensuite la phase sombre, ou cycle de Calvin-Benson-Bassham, aussi connu sous le nom de cycle de Calvin, lors duquel le CO₂ est incorporé dans une molécule à trois carbones (métabolisme en C₃), formant des trioses-phosphates à partir desquels sont synthétisés les glucides. Alors que toutes ces étapes sont réalisées uniquement dans les chloroplastes des cellules du mésophylle chez les plantes en C₃, les plantes en C₄ présentent une anatomie particulière appelée anatomie de Kranz (Figure 6). Dans ce cas, les cellules de la gaine périvasculaire sont entourées de cellules du mésophylle à l'intérieur desquelles la PhosphoEnolPyruvate carboxylase (PEP carboxylase) incorpore le CO₂ en oxaloacétate (une molécule à quatre carbones) qui alimente ensuite le cycle de Calvin. Cette voie d'assimilation du CO₂, appelée voie de Hatch et Slack (Hatch et Slack, 1966), permet une assimilation supplémentaire de CO₂ en parallèle du cycle de Calvin qui se déroule dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire et engendre un rendement photosynthétique supérieur (Lal, 2018b). De plus, la tolérance au froid du miscanthus et sa capacité

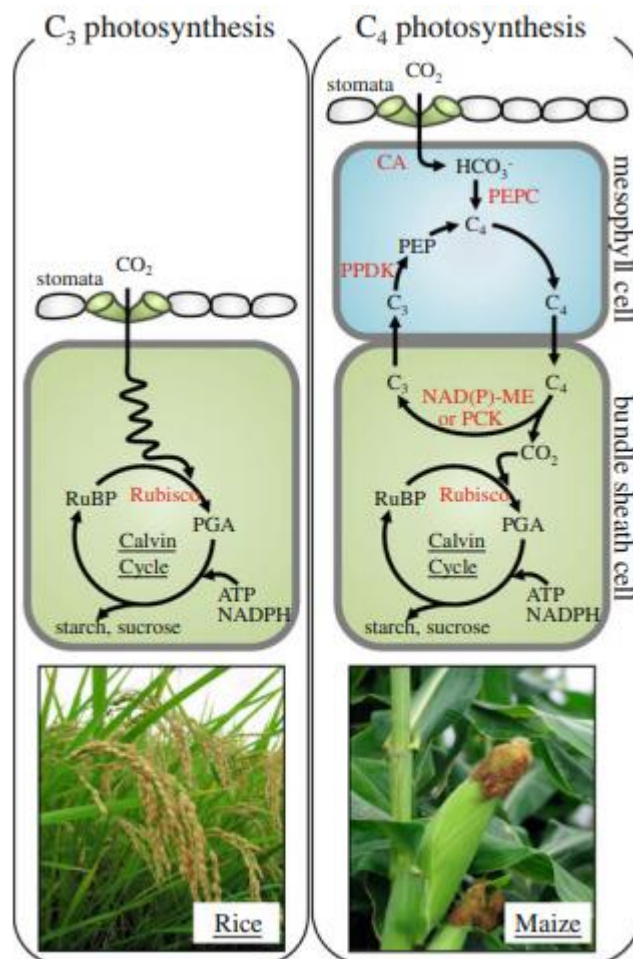


Figure 6. Comparaison du métabolisme photosynthétique en C₃ et en C₄
(Yamori *et al.*, 2014)

photosynthétique conservée à basses températures lui permettent d'allonger considérablement sa saison végétative par rapport à d'autres espèces comme le maïs (Beale *et al.*, 1996 ; Dohleman et Long, 2009). En effet, à 6°C l'expansion foliaire a toujours lieu chez *M×g* et les feuilles restent photosynthétiquement actives (Clifton-Brown et Jones, 1997 ; Clifton-Brown et Jones, 1999 ; Wang *et al.*, 2008). Par rapport au maïs, le miscanthus peut donc démarrer plus tôt en saison sa photosynthèse et la poursuivre plus tardivement. Actuellement la culture française de miscanthus est basée sur l'utilisation d'un seul clone de *M×g*. Cette culture monoclonale résulte en une composition de biomasse unique qui, même si elle est assez polyvalente, ne se montre pas forcément plus compétitive que la biomasse issue d'autres végétaux pour tous les débouchés. Il existe différents génotypes de *M×g* mais la variabilité génétique qu'offre cet hybride est assez limitée (Greef *et al.*, 1997 ; Heaton *et al.*, 2004 ; Heaton *et al.*, 2010). L'efficacité d'utilisation de l'eau, c'est-à-dire le ratio entre la quantité de biomasse produite et la quantité d'eau utilisée, de *M×g* est également plus importante que celle d'autres espèces (Beale *et al.*, 1999 ; Van Looke *et al.*, 2012 ; Hamilton *et al.*, 2015). Avec une production de biomasse supérieure pour une même quantité d'eau, *M×g* présente une efficacité d'utilisation de l'eau supérieure à *Spartina cynosuroides* qui est une espèce potentiellement intéressante pour la production de biomasse en climat tempéré, respectivement comprise entre 9,1 et 9,5 g kg⁻¹ contre 7,4 à 8,2g kg⁻¹ (Beale *et al.*, 1999). Van Looke *et al.* (2012) ont simulé des valeurs supérieures pour le miscanthus, comprises entre 24 et 44 kg MS ha⁻¹ mm⁻¹ H₂O, comparé à 2 à 20 kg MS ha⁻¹ mm⁻¹ pour le maïs et le sorgho aux Etats-Unis. Hamilton *et al.*, 2015 ont déterminé que les valeurs pour *M×g* et le maïs étaient semblables, comprises entre 40 et 67 kg MS ha⁻¹ mm⁻¹ lors des années normales et 29 et 43 kg MS ha⁻¹ mm⁻¹ lors d'une sécheresse, mais supérieures à celles du switchgrass, des herbacées natives d'Amérique et du peuplier (20 et 30 kg MS ha⁻¹ mm⁻¹). Selon Stephenson *et al.* (2021), le miscanthus et le switchgrass consomment la même quantité d'eau mais le miscanthus, grâce à sa production de biomasse supérieure (29,1 t ha⁻¹ contre 14,2 t ha⁻¹) présente encore une fois une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau (33 kg mm⁻¹ ha⁻¹). Cependant, dans cette même étude, le maïs et le sorgho produisent moins de biomasse que le miscanthus (respectivement 23,6 et 22 t ha⁻¹), utilisent moins d'eau mais le calcul de l'efficacité d'utilisation de l'eau donne de meilleurs résultats que le miscanthus (36,8 et 36 kg mm⁻¹ ha⁻¹), ce qui reste du même ordre de grandeur.

Le second atout du miscanthus est le fait qu'il présente des impacts environnementaux limités. Le recyclage des nutriments, et notamment de l'azote, lui permettent de constituer une

source d'azote endogène et de ce fait, de dépendre moins de l'apport d'azote exogène pour produire de la biomasse (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Schwartz et Amasino, 2013). La fixation d'azote par des bactéries symbiotiques pourrait également constituer une source d'azote pour la plante qui nécessite alors moins d'apport azoté chimique. En effet, la présence de bactérie fixatrice telle qu'*Azospirillum* a été mise en évidence chez *Mxg* dans plusieurs études mais la contribution à la nutrition azotée de la plante n'a pas été réellement caractérisée (Eckert *et al.*, 2001 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Keymer et Kent, 2014 ; Tubeileh *et al.*, 2016). La fertilisation azotée est un poste important de pollution en agriculture car la synthèse des fertilisants est source de pollution et une mauvaise gestion de la fertilisation engendre également des pertes sous forme de lixiviation de nitrates (NO_3^-) dans le sol et des émissions de protoxyde d'azote (N_2O). Sous une culture de *Mxg*, la lixiviation des nitrates qui sont entraînés dans le sol par les eaux d'infiltration à la suite de pluie ou d'irrigation, est, elle aussi, amoindrie par rapport aux cultures conventionnelles annuelles ou bisannuelles, exceptée pour la première année de culture. Les quantités de NO_3^- dans le sol à la fin de l'hiver sont inférieures à 20 kg N ha^{-1} sous du miscanthus, ce qui est bien plus faible que les 35 à 56 kg N ha^{-1} retrouvés sous de la fétuque, luzerne, du triticale ou sorgho, suggérant ainsi que le miscanthus peut améliorer la qualité de l'eau de drainage (Ferchaud et Mary, 2016). Les émissions de N_2O du sol sont également respectivement 5 à 100 fois moins importantes sous *Mxg* que sous des cultures annuelles ou une prairie cultivée de manière intensive (Mc Calmont *et al.*, 2017). Le stockage du carbone dans le sol est également un atout avec de $0,4$ à $3,8 \text{ t C stocké dans le sol ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, la variabilité des résultats pouvant être expliquée par les différentes méthodologies utilisées, l'historique de la parcelle et le contexte pédoclimatique (Poeplau et Don, 2014 ; Ferchaud *et al.*, 2016 ; Mc Calmont *et al.*, 2017). Dans le Nord de la France, un essai a montré qu'il n'y avait pas de changement significatif du stock de carbone dans le sol sous une culture de *Mxg* en coupe tardive au bout de 6 ans mais que ce stock avait augmenté significativement ($+0,28 \text{ t ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) au bout de 12 ans (Ferchaud *et al.*, 2016 ; Ferchaud *et al.*, 2020). Les impacts environnementaux limités de *Mxg* sont aussi permis grâce à la quasi-absence d'utilisation de produits phytosanitaires. Excepté pour les deux premières années de culture où le désherbage de la culture doit être mené pour limiter la compétition avec les adventices, aucun usage de produit phytopharmaceutique n'est à signaler sur le miscanthus. De plus, le désherbage peut également être réalisée de manière mécanique au début de la saison de croissance. Pour le moment, quelques pathogènes et phytopathologies ont été recensés sur le miscanthus tels que le « Miscanthus Blight » et le « Barley Yellow Dwarf Luteovirus », le virus de la mosaïque du switchgrass, le virus de la mosaïque du sorgho et le « Miscanthus yellow

fleck virus » sur *Msin*, quelques aphides comme *Rhopalosiphum maidis*, *Rhopalosiphum padi*, *Melanaphis sacchari* Zehntner ou *Sipha flava* et des nématodes mais tous ont peu d'impact sur la production de biomasse pour le moment (Huggett *et al.*, 1999 ; Ahonsi *et al.*, 2010 ; Bradshaw *et al.*, 2010 ; Mekete *et al.*, 2010 ; Grisham *et al.*, 2012 ; Agindotan *et al.*, 2013 ; Witzel et Finger, 2016 ; Bolus *et al.*, 2020 ; Harris-Shultz et Ni, 2021). En revanche, des cas de *Fusarium* avec des dégâts importants entraînant le pourrissement des rhizomes au moment de l'implantation ont été rapportés en Belgique, en Italie (Beccari *et al.*, 2010 ; Scauflaire *et al.*, 2013) et en France (De Maupeou, communication personnelle). Si les surfaces de miscanthus cultivées s'étendent et qu'elles ne comprennent qu'un seul clone de *M×g* alors le risque sanitaire s'accroît (Jørgensen, 2011). Une attention particulière doit également être portée sur le fait que même si certaines espèces observées de ravageurs ne causent pas de dégâts notables chez *M×g*, elles peuvent cependant s'en servir comme hôte et le miscanthus devient alors réservoir de pathogènes pour d'autres cultures : ce pourrait être le cas de la chrysomèle des racines du maïs (*Diabrotica virgifera virgifera*), de *Rhopalosiphum maidis* ou *Rhopalosiphum padi* qui sont vecteurs de la jaunisse nanisante de l'orge (Spencer et Raghu, 2009) ou encore de *Melanaphis sacchari* Zehntner qui peut être responsable de 50 à 100% de perte du rendement chez les hybrides sensibles du sorgho (Harris-Shultz et Ni, 2021). D'ailleurs, une étude a montré que même si la durée de vie et la capacité de reproduction de *R. padi* sur miscanthus étaient limitées, cette espèce de puceron peut cependant transmettre des virus au miscanthus non pathogène pour lui, mais il servirait alors de réservoir à ces virus (Coulette *et al.*, 2013). Cette absence d'utilisation de produits phytopharmaceutiques et d'engrais diminue aussi les coûts de production de la culture par rapport à d'autres espèces végétales : ainsi Heaton *et al.* (2004) rapportent un coût total de la culture du miscanthus de 4 626 \$ ha⁻¹ soit 3 791 € ha⁻¹ (taux de conversion de l'année 2004) sur 10 ans, inférieur à celui d'une rotation maïs/soja de 6 686 \$ ha⁻¹ soit 5 480 € ha⁻¹ (taux de conversion de l'année 2004). Finalement, les interventions mécanisées en parcelle étant très limitées, l'émission de CO₂ des engins agricoles est également réduite par rapport à d'autres cultures qui nécessitent des interventions plus régulières. La destruction du miscanthus est plus simple que celle d'autres cultures énergétiques pérennes comme les taillis à courte (TCR) ou très courte rotation (TTCR) de peuplier, saule ou eucalyptus qui demandent un dessouchage complet (Heaton *et al.*, 2004).

En terme de services écosystémiques, le couvert permanent du miscanthus est un réservoir de biodiversité pour de nombreux insectes arboricoles, papillons, coléoptères, oiseaux et autres animaux de la macrofaune (Semere et Slater, 2007). Plusieurs études ont montré que

la diversité et l'abondance de petits oiseaux est plus importante dans les cultures de miscanthus que dans d'autres cultures conventionnelles. L'attrait pour cette culture réside en partie dans la diversité des insectes qu'elle abrite, notamment sur les adventices présentes pendant les premières années de culture, cet attrait pouvant diminuer avec l'augmentation du *mulch* (Bellamy *et al.*, 2009). Depuis 2018, le miscanthus est une culture éligible aux Surfaces d'Intérêt Ecologique et aux Zones de Non Traitement. Implantée le long des cours d'eau et/ou des habitations elle peut faire office de barrage contre les effluents et les dérives des produits phytosanitaires. Enfin, le miscanthus permet de lutter contre l'érosion éolienne et hydrique du sol. De plus, le rhizome non traçant et la stérilité de *Mxg* lui permettent d'être non invasif.

Finalement d'autres facteurs économiques freinent aussi les agriculteurs dans le choix du miscanthus. Les coûts de la production de biomasse de miscanthus dépendent des coûts d'implantation et de récolte (Weger *et al.*, 2021). Pour une culture implantée à partir de rhizomes (pratique la plus courante), le coût d'implantation dépend principalement du coût des rhizomes représentant 80% du coût total (Witzel et Finger, 2016). 16% sont attribués à la mécanisation de l'implantation, et 4% à la maintenance de la culture (contrôle des adventices par exemple). Les coûts de transport et de stockage, qui peuvent être importants au vu de la faible densité du produit récolté, dépendent du type de conditionnement lors de la récolte : si des ballots sont réalisés, le coût de récolte est plus important mais les coûts de transport et de stockage sont amoindris. (Huisman *et al.*, 1997 ; Witzel et Finger, 2016). L'occupation de la parcelle, dédiée à une seule culture pendant 20 ans, freine également les agriculteurs pour l'implantation puisqu'ils n'ont pas la liberté de changer de production pendant plusieurs années et ne peuvent donc pas réagir rapidement aux changements du marché agricole (Witzel et Finger, 2016). Enfin, l'absence de filière bien développée de valorisation à proximité de l'exploitation agricole ne rend pas la culture attrayante économiquement.

En résumé, Miscanthus × giganteus produit une grande quantité de biomasse lignocellulosique grâce à sa productivité élevée permise par son métabolisme photosynthétique en C₄, sa capacité photosynthétique à basse température, sa forte efficience d'utilisation des rayonnements lumineux et sa longue durée de croissance végétative. Malgré des pratiques culturales simplifiées, les coûts de production restent élevés, notamment à cause des coûts d'implantation dus aux prix des rhizomes. Le développement de nouvelles techniques d'implantation, notamment par le semis pourrait diminuer ces coûts mais



Figure 7. Essai illustrant la diversité des espèces de miscanthus
(Source : INRAE – Julie LEROY)

nécessite le développement d'espèces de miscanthus adaptées. De plus, même si M×g présente de nombreuses qualités, d'autres inconvénients subsistent, en particulier une composition de biomasse peu variable, un risque sanitaire dû à la culture monoclonale actuelle et une faible tolérance à certains stress. A cet égard, Miscanthus × giganteus est moins tolérant que d'autres espèces de miscanthus. L'élargissement de l'offre variétale par d'autres espèces de miscanthus pourrait résoudre ces contraintes et ainsi favoriser l'expansion de la culture du msicanthus. Ainsi, la sélection variétale intègre l'ensemble de ces caractéristiques dans sa recherche de nouveaux génotypes ou hybrides à cultiver.

1.3. Besoin d'élargir l'offre variétale du miscanthus : *Miscanthus sinensis*, une autre espèce d'intérêt

Comme nous l'avons vu précédemment il existe différentes espèces de miscanthus, qui ont été étudiées au fur et à mesure des années pour déterminer celles qui pourraient être intéressantes pour l'amélioration variétale du miscanthus (Figure 7). Parmi elles, *Msin* a montré des qualités intéressantes (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Clifton-Brown *et al.*, 2008 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Lewandowski *et al.*, 2016 ; Clifton-Brown *et al.*, 2019).

***Miscanthus sinensis*, plus tolérant aux stress, peut contribuer à élargir la zone de production du miscanthus en permettant d'adapter les variétés aux régions**

Grâce à sa tolérance à la sécheresse, la salinité et au froid, il pourrait permettre d'élargir la zone potentielle de culture du miscanthus de l'Europe méditerranéenne (Clifton-Brown et Lewandowski, 2000a ; Clifton-Brown et Lewandowski, 2000b ; Lewandowski *et al.*, 2016) jusqu'aux régions plus froides du nord comme la Suède (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Farrell *et al.*, 2006 ; Zub *et al.*, 2012 ; Fonteyne *et al.*, 2016). Alors que la température létale des rhizomes de *M×g* et *Msac* lors de l'implantation est comprise entre -2,6°C et -3,4°C, certains génotypes de *Msin* ont montré une résistance au gel allant jusqu'à -6,5°C (Clifton-Brown et Lewandowski, 2000b ; Fonteyne *et al.*, 2016). La tolérance au froid des parties aériennes, plus importante chez les pousses portant 6 à 7 feuilles ligulées que celles qui n'en porte que 3 à 5, est variable mais surtout plus importante chez *Msin* que chez *M×g* (Zub *et al.*, 2012) : après une période de gel, les *Msin* ne présentent que quelques feuilles gelées alors que les *M×g* présentent une destruction de l'ensemble des parties aériennes, qui repoussent ensuite. Ainsi dans des essais en Suède et

au Danemark, alors que 93 à 100% des rhizomes de quatre génotypes de *M×g* ont été détruits par le gel lors de l'implantation, certains hybrides de *Msin* ont montré une résistance au gel avec un taux de survie d'environ 50% (Clifton-Brown *et al.*, 2001). *Msin* est d'ailleurs utilisé en création variétale pour l'amélioration de la tolérance au froid des cannes à sucre en créant des *miscanes* par hybridation entre *Msin* et *Saccharum* (Kar *et al.*, 2019). Cette meilleure tolérance aux stress rend certains hybrides de *Msin* compétitifs par rapport à la production de biomasse de *M×g* selon les localisations (Gauder *et al.*, 2012 ; Weger *et al.*, 2021) : un hybride de *Msin* × *Msac* produit 2,6 t MS ha⁻¹ de plus que le clone actuellement cultivé de *M×g* à Moscou (Russie) (Kalinia *et al.*, 2017). Les réponses à la sécheresse sont également différentes : alors que les feuilles de *M×g* deviennent sénescentes lors d'un déficit hydrique, ce phénomène n'est pas observé chez *Msin* (Clifton-Brown et Lewandowski, 2000a). *Msin* présente aussi un mécanisme d'exclusion du sel, retrouvé chez le riz et le blé, qui lui permet de croître sur un sol salé contrairement à *M×g* (Lewandowski *et al.*, 2016). De plus, la création d'hybrides entre *Msin* et *Msac* permet d'obtenir des génotypes présentant des caractéristiques similaires à *M×g* mais avec des tolérances aux stress plus importantes (Clifton-Brown et Lewandowski, 2002).

La variabilité intra-spécifique de la composition de biomasse chez Miscanthus sinensis améliorera l'adaptation de la biomasse aux débouchés

L'importante variabilité intra-spécifique de la composition de biomasse de *Msin* (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015 ; Van der Weijde *et al.*, 2016) lui permet d'être plus performant pour certains débouchés que *M×g*. *Msin* présente un plus haut potentiel de production de méthane (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015 ; Thomas *et al.*, 2019) et un rendement de conversion de la cellulose après pré-traitement plus élevé, 63,2 - 68,9% contrairement à 52% pour *M×g* (Belmokhtar *et al.*, 2017). Enfin *Msin* peut aussi être utilisé pour la phytoremédiation des sols pollués au mercure, plomb, zinc et chrome comme *M×g* (Barbosa *et al.*, 2015 ; Zhao *et al.*, 2019) avec une meilleure tolérance à la pollution par le zinc par rapport à *M×g* pour qui le rendement est diminué alors qu'il ne l'est pas pour *Msin* (Barbosa *et al.*, 2015).

Les coûts d'implantation par le semis de *Miscanthus sinensis* ou d'hybrides stériles seront diminués

Les coûts d'implantation de la culture peuvent être réduits par le semis de clones de *Msin* ou d'hybrides non invasifs et stériles (Lewandowski *et al.*, 2016). En effet, utiliser des nouvelles variétés non-invasives est essentielle car certaines espèces comme *Msin* et *Msac* peuvent être invasives, ce qui n'est pas recommandé pour la plantation au champ (Weger *et al.*, 2021). Des graines viables germées de *Msin* peuvent se disséminer jusqu'à 80 m d'un essai (Weger *et al.*, 2021). *Msac* privilégie la reproduction végétative grâce à son rhizome dit « traçant » (expansion de 1,5 à 2 m), étant donné que leur floraison est généralement tardive. La gestion du caractère « rhizome traçant » est difficile pour le moment en amélioration variétale, ce qui privilégie l'étude du *Msin* ou alors l'hybridation de *Msin* et *Msac* en sélectionnant les descendants n'ayant pas hérité du caractère « rhizome traçant », ce qui est d'autant plus intéressant que les hybrides entre ces deux espèces montrent de plus hauts potentiels de production de biomasse que les espèces parentales elles-mêmes (Kalinina *et al.*, 2017). Deux voies peuvent donc être considérées pour l'obtention de génotypes stériles : le travail sur variétés dont la floraison ne pourrait pas avoir lieu au vu des conditions climatiques de la zone de culture, ce qui semble être risqué au vu du changement climatique, ou alors l'obtention de génotypes stériles par l'édition du gène diplogamète pour produire des triploïdes à graines stériles (Clifton-Brown *et al.*, 2019, Workpackage 5 du projet BFF).

Le fonctionnement de *Miscanthus sinensis* est encore à étudier

Tout comme *Mxg*, *Msin* réalise le recyclage de ses nutriments (Stewart *et al.*, 2009 ; Purdy *et al.*, 2015a). Ce mécanisme, beaucoup moins bien étudié pour *Msin* que *Mxg*, lui permet de limiter ses besoins d'absorption d'azote exogène. Ces faibles besoins azotés sont identiques à ceux de *Mxg* puisque ces deux espèces présentent la même courbe de dilution de l'azote, c'est-à-dire que la concentration en azote minimum nécessaire dans les parties aériennes à un temps donné pour maximiser la production de biomasse aérienne est identique entre espèces (Gastal et Lemaire, 2002 ; Zapater *et al.*, 2017). Une symbiose avec d'autres espèces comme des endomycorhizes du genre *Glomus sp.*, observées dans les prairies naturelles de *Msin* au Japon (Stewart *et al.*, 2009), pourrait également être à l'origine de ses faibles besoins en fertilisation azotée. Ces trois caractéristiques sont à l'origine des faibles besoins en fertilisation azotée, cependant alors que pour *Mxg* il n'y a pas de consensus quant à l'effet de la fertilisation sur le

rendement, celle-ci a un effet positif sur le rendement de *Msin* (Himken *et al.*, 1997 ; Danalatos *et al.*, 2007 ; Stewart *et al.*, 2009 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Larsen *et al.*, 2014).

Des différences concernant le développement et la croissance des *Msin* par rapport au *M×g* sont toutefois observées. La durée de la saison végétative (6 à 9 mois) et les dates d'apparition des stades de développement sont variables par rapport à *M×g*, au sein de l'espèce *Msin* et aussi en fonction des conditions climatiques (Zub et Brancourt-Hulmel, 2010). *Msin* fleurit en juin-juillet au Portugal, 2 à 3 mois avant *M×g*, et en juillet-août en Suède (Clifton-Brown *et al.*, 2001). De plus, alors que la floraison semble dépendante d'un nombre de degrés jours particulier pour *M×g* (>2800 degrés jours cumulés avec une température de base de 0°C), elle ne l'est pas pour *Msin* (Nunn *et al.*, 2017). La dynamique d'émission des tiges est également différente pour *Msin* : il émet de nouvelles tiges tout au long de la saison végétative (appelées « cohortes ») en fonction des conditions climatiques, et les tiges émises tardivement restent de petite taille et vertes durant l'hiver puis reprennent leur croissance au printemps suivant (Kobayashi et Yokoi, 2003a ; Stewart *et al.*, 2009 ; Kobayashi et Yokoi, 2017). Ce phénomène n'est pas observé chez *M×g* et 80% des tiges de *M_{sac}* sont émises au printemps (Lewandowski *et al.*, 2003).

En résumé, avec une meilleure tolérance aux stress hydriques, salin et thermique que M×g, Miscanthus sinensis permettrait d'élargir la zone de production et de mieux adapter les variétés aux régions. Sa variabilité intra-spécifique de composition de biomasse pourrait permettre de produire différentes qualités de biomasse permettant de mieux répondre aux besoins des différents débouchés. La production de graines et le semis de celles-ci réduiraient les coûts d'implantation à condition de produire des génotypes stériles. Finalement, même si Msin présente un phénomène de recyclage des nutriments comme M×g, un développement et une croissance contrastés ainsi qu'une réponse différente à la fertilisation azotée suggèrent quelques différences pouvant être importantes sur le plan écophysologique.

1.4. Le stockage et la remobilisation des nutriments : mécanismes clés participant aux faibles impacts environnementaux

Le stockage des nutriments et leur remobilisation permettent aux plantes d'être plus autonomes vis-à-vis des ressources du milieu et ainsi être moins dépendantes des apports en nutriments, notamment en azote, exogènes. La dépendance plus faible vis-à-vis des apports exogènes de nutriments engendre des besoins en fertilisation moindres si l'on respecte les dynamiques de stockage et de remobilisation dans les pratiques culturales. Tout ceci participe aux faibles impacts environnementaux des cultures. D'autre part, cela permet aux plantes pérennes de débiter leur croissance très tôt au printemps et ainsi d'allonger leur saison végétative, surpassant ainsi les plantes annuelles (Schwartz et Amasino, 2013).

Le stockage des molécules de réserve varie dans l'espace et dans le temps. Il peut avoir lieu à court-terme et de manière transitoire : les glucides générés pendant la journée par la photosynthèse sont stockés sous forme d'amidon transitoire dans les chloroplastes pour être remobilisés la nuit, transportés sous forme de saccharose vers les lieux d'utilisation et alimenter les processus de croissance et métaboliques comme la respiration nocturne (Chapin *et al.*, 1990 ; Smith et Stitt, 2007). Un stockage à plus long terme peut par exemple être réalisé dans l'écorce et le feuillage des arbres à feuillage persistant ou caduque, ainsi que dans leurs racines, et dans les rhizomes et stolons des autres plantes pérennes (Dickson, 1989 ; Wyka *et al.*, 2014). 54% de l'azote des aiguilles matures de *Pinus radiata* sont remobilisés vers les nouvelles aiguilles lors de leur formation (Nambiar et Fife, 1987 cité dans Dickson, 1989). Il y a également un transfert de l'azote entre les vieilles tiges complètement sénescentes et les nouvelles tiges chez l'agrostide commune (*Agrostis capillaris*) et la fétuque rouge (*Festuca rubra*) ainsi que chez la fétuque élevée (Bausenwein *et al.*, 2001 ; Reimley, 2010). C'est également le cas pour les glucides de réserves : chez le chêne rouge, les feuilles du deuxième « flush » bénéficient d'une grande partie du carbone des feuilles émises plutôt lors de la première cohorte et seule une petite partie est stockée dans les tiges basses et les racines (Dickson, 1989).

Rôles du stockage et de la remobilisation des nutriments

Tout d'abord, le stockage et la remobilisation des nutriments chez les plantes permettent de répondre à l'asynchronie possible entre le temps de l'approvisionnement en ressources et le moment où la plante en a besoin (Chapin *et al.*, 1990). La maintenance hivernale des organes souterrains des plantes pérennes ou semi-pérennes nécessite également l'utilisation de glucides qui ne sont produits que pendant la saison végétative par les parties aériennes photosynthétiques. Chez les plantes pérennes, l'amidon est l'énergie primaire qui permet le maintien en vie des méristèmes primaires pendant l'hiver, et sert peut-être même à maintenir un niveau de dessiccation conséquent pendant la dormance hivernale dans les rhizomes (Sarath *et al.*, 2014).

Les réserves de nutriments servent également à fournir des ressources pour pallier un éventuel accident climatique tels que le gel, la sécheresse ou un accident dû à un ravageur comme la défoliation (Dickson, 1989 ; Chapin *et al.*, 1990).

Enfin, les réserves permettent de fournir les ressources nécessaires lors de la modification du statut des plantes, par exemple le passage de l'état végétatif à l'état reproducteur (Chapin *et al.*, 1990) ou encore le passage de l'état de dormance à la reprise de végétation. Les arbres à feuilles caduques utilisent les glucides et l'azote stockés pour renouveler leurs feuilles au printemps (Dickson, 1989 ; El Zein *et al.*, 2011). L'importance de la mobilisation des réserves pour alimenter l'état reproductif dépend des espèces (Chapin *et al.*, 1990). Chez les plantes pérennes, le stockage d'azote et de carbone domine la reproduction (Schulze *et al.*, 2019). Chez les espèces qui se disséminent plutôt par voie reproductrice, le recyclage de l'azote favorise le stockage dans les graines, alors que celles qui favorisent la multiplication végétative stockent plus favorablement l'azote dans leurs parties souterraines : c'est le cas de *Urtica dioica* qui favorise la propagation par stolons, contrairement à son homologue *Urtica urens* qui favorise la dissémination par graines et qui est une plante annuelle (Rosnitschek-Schimmel, 1982).

Définition du stockage des nutriments chez les plantes

Le stockage des nutriments est défini comme la constitution d'une réserve de molécules qui peuvent être mobilisées dans le futur pour supporter la croissance de la plante ou d'autres métabolismes (Chapin *et al.*, 1990). Il est important de noter que l'acquisition des nutriments et leur utilisation reste privilégiée par rapport à la remobilisation des réserves lorsqu'elle est possible (Chapin *et al.*, 1990).

Il existe trois types de stockage (Chapin *et al.*, 1990 ; Lambers *et al.*, 2008) :

- le stockage par accumulation de molécules, lorsque les ressources dépassent les besoins de la plante. Dans ce cas, il n'y a pas de compétition pour les ressources ;

- le stockage par formation de réserves conduit à un partage des ressources disponibles entre la mise en réserve, la croissance et le métabolisme général et de défense de la plante, mettant en compétition ces différentes voies entre elles ;

- le stockage par recyclage, correspondant au démantèlement des molécules de structure ou de défense pour les stocker et les réutiliser ensuite, par exemple lors de la sénescence.

L'amidon et le saccharose sont les formes de stockage du carbone majoritaires chez le miscanthus et l'azote est mis en réserve sous forme de protéines et d'acides aminés

Les molécules de stockage sont principalement retrouvées dans les vacuoles et les plastides pour les isoler des autres voies métaboliques (Chapin *et al.*, 1990). Le carbone est stocké sous forme d'amidon, de fructanes, de saccharose et d'acides organiques, avec des proportions variant en fonction des espèces végétales (Chapin *et al.*, 1990). Lors de la remobilisation, le transport est réalisé *via* le saccharose. L'amidon, qui a l'avantage d'être osmotiquement inactif, et dans une moindre mesure, le saccharose sont les formes majoritaires chez le miscanthus (Lebas, 2012 ; Purdy *et al.*, 2015a ; Hartmann et Trumbore, 2016). L'azote est stocké sous forme de protéines et d'acides aminés (surtout arginine, proline, asparagine et glutamine) chez les plantes pérennes (Dickson, 1989) et sous forme d'alcaloïdes, de nitrates et d'acides nucléiques chez d'autres espèces végétales (Chapin *et al.*, 1990). Le stockage de l'azote sous forme de protéines implique le coût de la synthèse des protéines (Lambers *et al.*, 2008). Certaines protéines possèdent un rôle fonctionnel mais également de stockage : c'est le cas de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase ou RUBISCO qui intervient dans la

photosynthèse et est démantelée et recyclée lors de la sénescence (Dickson, 1989 ; Chapin *et al.*, 1990 ; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Des protéines de stockage spécifiques ou *Vegetative Storage Proteins* (VSP) sont également accumulées chez certaines espèces (Dickson, 1989 ; Ourry *et al.*, 2001 ; Fujiwara *et al.*, 2002 ; Avice *et al.*, 2003 ; Lambers *et al.*, 2008). Caractérisées par une variation saisonnière dans les organes végétatifs non reproducteurs avec une accumulation avant l'hiver et une remobilisation au printemps, elles possèdent une masse moléculaire comprise entre 15 et 57 kDa, sont stockées dans des corps protéiques et jouent également un rôle de défense contre les stress abiotiques et biotiques (Avice *et al.*, 2003). Elles peuvent représenter jusqu'à 30 à 40% du pool de protéines solubles (Avice *et al.*, 1997 ; Avice *et al.*, 2003). Le transport de l'azote est réalisé grâce aux acides aminés tels que l'asparagine, la glutamine, le glutamate, l'aspartate, l'arginine et la proline et les uréides, l'allantoïne, l'acide allantoïque et la citrulline chez les arbres et de nombreuses plantes dans le xylème (Dickson, 1989). Chez *M×g*, le stockage de l'azote se fait sous forme de protéines et d'acides aminés, particulièrement l'asparagine et l'arginine (Lebas, 2012). La présence de VSP est discutée : en effet, les variations d'azote dans les parties souterraines n'étant pas dues aux variations des protéines et le fait qu'aucun corps protéique n'ait été observé par l'examen cytologique, Lebas (2012) conclut dans sa thèse l'absence de VSP. Cependant la variation des protéines au cours de la saison dans le rhizome fait suggérer à Dierking *et al.* (2017) que des VSP pourraient être présentes. Le phosphore est stocké sous forme de phosphate inorganique ou de polyphosphate et le potassium et magnésium sont stockés sous forme d'ions (Chapin *et al.*, 1990). Le calcium n'est pas mis en réserve (Chapin *et al.*, 1990).

La constitution des réserves d'azote, de phosphore, de potassium et de magnésium est surtout issue de la remobilisation automnale des parties aériennes

Le recyclage est à l'origine de la proportion importante d'azote, de phosphore et de potassium stocké (Chapin *et al.*, 1990). Ainsi, le stockage de l'azote est lié à la phénologie de la plante, a lieu durant la sénescence et dépend des sources d'azote (Millard et Grelet, 2010). La remobilisation de l'azote des parties aériennes semble être liée à la floraison et la sénescence chez de nombreuses espèces et notamment le switchgrass (Sarath *et al.*, 2014). La sénescence se traduit par la remobilisation des nutriments des parties aériennes et leur transfert vers d'autres sites (Bahtla *et al.*, 2018). Elle débute par le déclin de la photosynthèse et l'augmentation de la

respiration, puis se poursuit par la dégradation des chloroplastes et de la chlorophylle qui restent maintenus en fonctionnement au début de la remobilisation pour permettre le transport des molécules issues de la dégradation (Bahtla *et al.*, 2018). Lors de la sénescence, la principale source d'azote remobilisée est ainsi constituée par le démantèlement des chloroplastes et notamment de la RUBISCO (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). L'importance du recyclage de l'azote varie entre espèces. Ainsi, 3 à 61% de l'azote des parties aériennes est remobilisé durant l'automne chez le switchgrass (Yang *et al.*, 2009 ; Wayman *et al.*, 2014), 58% chez le Big Bluestem (Hayes, 1985). Concernant la contribution des réserves hivernales à la croissance de la plante, 34% de l'azote total utilisé pour la croissance chez la fétuque rouge provient de la remobilisation des réserves hivernales, ce qui est inférieur aux 45% de l'agrostide commune (Bausenwein *et al.*, 2001) et 48% du poirier (Sanchez *et al.*, 1991). Ces proportions varient aussi entre espèces d'arbres : 21 à 40% de l'azote des nouvelles feuilles sont issus de la remobilisation chez le frêne, 18 à 87% chez le pommier, 45 à 60% pour l'érable sycomore, 48 à 76% pour le bouleau et presque 90% chez le chêne sessile (Millard, 1996 ; El Zein *et al.*, 2011). Elles varient également en fonction de l'âge des plantes chez les plantes pérennes, comme le pin noir (*Pinus nigra*) qui devient de plus en plus autonome avec une part d'azote totale provenant de la remobilisation qui augmente avec l'âge : 16% à 10 ans, 50% à 40 ans (Millard, 1996). Dans leur recueil basé sur une trentaine d'études concernant plus de 20 espèces d'arbres à feuillage persistant et caduque âgés de 1 à 9 ans, Millard et Grelet (2010) rapportent que la proportion d'azote des nouvelles tiges issue du stockage varie de 3 à 100%.

Même si un mécanisme de recyclage peut être majoritaire pour la formation des réserves de certains nutriments, d'autres mécanismes peuvent entrer en jeu. Ainsi, chez les arbres, l'augmentation du stock d'azote à l'automne n'est pas uniquement dû au recyclage de l'azote des parties aériennes mais peut provenir également de l'absorption d'azote du sol par les racines à cette période où la croissance de l'arbre a cessé (Millard, 1996), attribuant ce mécanisme à de l'accumulation. En effet, lorsque l'absorption de l'azote est supérieure aux besoins de croissance de la plante, des nitrates et des acides aminés peuvent s'accumuler (Pate, 1983 cité dans Dickson, 1989).

Chez le miscanthus, le recyclage des nutriments et particulièrement de l'azote a été caractérisé pour *M×g* (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Christian *et al.*, 2006 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Roncucci *et al.*, 2015) : la remobilisation automnale permet le transfert des nutriments contenus dans les parties aériennes pour les stocker dans le rhizome et les racines pendant l'hiver. Ces nutriments stockés sont ensuite de nouveau remobilisés au printemps pour

être transférés vers les nouvelles parties aériennes en cours de développement. Concernant l'azote, 23 à 98 kg d'azote ha⁻¹ sont remobilisés des parties souterraines vers les parties aériennes au printemps, et 45 à 134 kg d'azote ha⁻¹ sont recyclés des parties aériennes pour être stockés dans les parties souterraines durant l'hiver (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Christian *et al.*, 2006 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Roncucci *et al.*, 2015). D'autres nutriments sont recyclés de la même manière chez *Mxg* : 6 à 8 kg P ha⁻¹, 30 à 39 kg K ha⁻¹ et 11 kg Mg ha⁻¹ sont remobilisés au printemps, soient 18 à 36% du P, 7 à 14% du K et 24% du Mg maximal des parties aériennes : 9 à 11 kg P ha⁻¹, 61 à 81 kg K ha⁻¹ et 8 kg Mg ha⁻¹ sont stockés dans le rhizome en hiver, soient 30 à 50% du P, 15 à 30% du K et 24% du Mg maximal des parties aériennes (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997). Le recyclage des nutriments pour les autres espèces de miscanthus, notamment *Msin*, a été très peu étudié et les données concernant les flux sont assez rares. Stewart *et al.* (2009) rapportent que jusqu'à 47% du phosphore des parties aériennes de *Msin* sont retrouvés dans les parties souterraines durant l'hiver.

La constitution des réserves carbonées dans le rhizome est majoritairement issue de l'accumulation des photosynthétats

Le recyclage constitue une grosse proportion de l'azote, du phosphore ou du potassium stocké, mais n'est à l'origine que d'une petite proportion de carbone mis en réserve (Chapin *et al.*, 1990 ; Scwhartz et Amasino, 2013). L'accumulation du carbone n'est pas une priorité et a surtout lieu à la fin de l'été chez les arbres, lorsque la croissance des parties aériennes et les besoins en photoassimilats des feuilles diminuent, ils sont alors transférés vers les tiges basses et les racines (Dickson, 1989). Chez le miscanthus également, les glucides de réserve sont surtout accumulés pendant la saison végétative et cette accumulation n'est pas spécifiquement liée à la sénescence (Purdy *et al.*, 2015a). Le stockage des glucides produits par la photosynthèse dans d'autres lieux que les chloroplastes, permet d'éviter la régulation négative de la photosynthèse par l'accumulation des glucides (Millard et Grelet, 2010). Ainsi, le stockage du carbone est influencé par la photosynthèse et les besoins de la plante (Millard et Grelet, 2010). La dynamique d'accumulation des glucides de réserve varie en fonction des stratégies de fonctionnement des espèces (Kanai et Masuzawa, 1993 ; Maslova *et al.*, 2010 ; Furze *et al.*, 2018). Par exemple, l'épinette noire, qui est un conifère à feuillage persistant réalise la photosynthèse rapidement en début de saison grâce à ses aiguilles déjà en place et toujours fonctionnelles, et accumule de l'amidon rapidement, atteignant une concentration maximale en juin, de manière plus précoce que le mélèze occidental qui est un conifère à feuilles caduques

qui n'atteint sa concentration maximale qu'à l'automne (Furze *et al.*, 2018). Autre exemple, les génotypes de miscanthus à hauts rendements et à forte croissance présentent de faibles concentrations en amidon mais de fortes concentrations en saccharose et fructose dans leurs parties aériennes, suggérant le fait qu'ils privilégient la croissance à l'accumulation des glucides de réserve (Purdy *et al.*, 2015b ; Maddison *et al.*, 2017 ; De Vega *et al.*, 2020). Les différentes stratégies de fonctionnement peuvent également être liées à des lieux de stockage différents des glucides : chez neuf espèces tropicales d'arbres étudiées, les espèces à croissance rapide présentant une espérance de vie courte stockent préférentiellement l'amidon dans le parenchyme, alors que les espèces à croissance lente et à durée de vie plus longue stockent l'amidon au sein des fibres de bois (Herrera-Ramírez *et al.*, 2021). Ces lieux différents de stockage relèvent de la stratégie et de la facilité de remobilisation : ainsi stocker de l'amidon dans les fibres de bois permet de ne pas sacrifier de zones pour le stockage au profit de la résistance mécanique, et stocker de l'amidon dans le parenchyme permet de faciliter l'accès à celui-ci pour la remobilisation (Herrera-Ramírez *et al.*, 2021).

En résumé, les plantes pérennes stockent et remobilisent leurs nutriments pour différentes raisons : répondre à l'asynchronie entre la ressource et la demande, fournir des ressources lors de la modification du statut des plantes, pouvoir répondre à un accident. Les formes de stockage et les lieux dépendent de la stratégie de fonctionnement chez de nombreuses espèces. Chez le miscanthus, le stockage et la remobilisation des nutriments permet la maintenance des organes souterrains durant l'hiver et l'apport de ressources au printemps pour la croissance des nouvelles parties végétatives. Ainsi, à la fin de saison végétative, l'azote contenu dans les parties aériennes est recyclé et stocké sous forme de protéines et d'acides aminés dans le rhizome. Au printemps suivant, cet azote est remobilisé pour alimenter les nouvelles parties aériennes en cours de développement. Un stockage de carbone est également réalisé sous forme d'accumulation d'amidon et de saccharose dans le rhizome tout au long de la saison végétative. Le stockage et la remobilisation de l'azote et du carbone sont assez bien documentés chez M×g mais ne le sont que très peu chez les autres espèces de miscanthus, or ces mécanismes peuvent être importants pour limiter les impacts environnementaux de la production.

1.5. Objectif de la thèse et questions de recherche

Le projet français Biomass For the Future (BFF), dans lequel s'insère cette thèse a pour finalité le développement de nouveaux débouchés de biomasse ainsi que la création de nouvelles variétés de miscanthus et de sorgho présentant une faible empreinte environnementale. De nombreuses études ont pointé l'importance d'élargir l'offre variétale pour permettre d'optimiser la production de biomasse lignocellulosique (Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Jørgensen, 2011 ; Weger *et al.*, 2021). En effet, la diversification des espèces de miscanthus cultivées permettra d'obtenir des compositions de biomasse plus adaptées aux différents débouchés, d'étendre la zone de culture potentielle et surtout de réduire le risque sanitaire posé par l'actuelle culture monoclonale (Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015 ; Lewandowski *et al.*, 2016 ; Clifton-Brown *et al.*, 2019). *Msin* présente toutes les qualités requises, notamment grâce à son important potentiel de production et son importante variabilité intra-spécifique de composition de biomasse et de tolérance aux différents stress abiotiques (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015 ; Lewandowski *et al.*, 2016 ; Belmokhtar *et al.*, 2017 ; Thomas *et al.*, 2019). Les faibles impacts environnementaux de la culture de *Mxg* sont en partie dus à l'efficacité de son recyclage des nutriments, notamment de l'azote (Cadoux *et al.*, 2012). Le carbone est également un élément essentiel à la croissance des plantes (Khatpalia et Bahtla, 2018) et il est un constituant majoritaire de la biomasse lignocellulosique. C'est pourquoi la connaissance du fonctionnement azoté et carboné de *Msin* est primordiale pour assurer une production de biomasse lignocellulosique avec des impacts environnementaux aussi limités que ceux de *Mxg*. Cependant, alors que le recyclage de l'azote est bien documenté pour *Mxg* (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Dierking *et al.*, 2017), il n'a jamais été étudié pour *Msin*. Le stockage et la remobilisation des molécules carbonées ont été très peu étudiés chez le miscanthus et peu d'études caractérisent plusieurs espèces (Masuzawa et Hogetsu, 1977 ; Lebas, 2012 ; De Souza *et al.*, 2013 ; Purdy *et al.*, 2015a). De plus, seule une de ces références (Lebas, 2012) étudie en même temps le stockage et la remobilisation du carbone et de l'azote chez *Mxg* sans jamais analyser leur possible coévolution. Pourtant, la sénescence et la remobilisation des nutriments semblent être liées à un statut C/N des feuilles donc à la variation à la fois du carbone et de l'azote dans la plante (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Guiboileau *et al.*, 2010). Par ailleurs, les différences de croissance et de développement entre *Msin* et *Mxg* (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015) suggèrent un fonctionnement variable qui ne permettrait pas d'appliquer à *Msin* les connaissances acquises

sur $M \times g$. Par exemple, un lien entre le métabolisme des glucides et la floraison est sous-entendu dans les résultats de Purdy *et al.* (2015a) chez $M \times g$ et $Msin$. Mais Nunn *et al.* (2017) ont montré que la floraison chez ces deux espèces n'était pas déclenchée par les mêmes facteurs, à savoir que celle de $M \times g$ semble dépendante du nombre de degrés cumulés alors qu'elle ne le serait pas chez $Msin$ (Kobayashi et Yokoi, 2017).

L'objectif de ma thèse est de caractériser la gestion des réserves carbonées et azotées chez $Msin$, par rapport à $M \times g$, en lien avec le développement de la plante et la production de biomasse.

Notre démarche pour atteindre cet objectif consiste en l'étude du développement, de la production de biomasse et du recyclage de l'azote et du carbone de trois génotypes de $Msin$ et de $M \times g$. Dans cette étude menée au champ durant deux années consécutives, un suivi de la croissance et du développement des plantes et la réalisation de nombreux prélèvements de plantes entières au cours de la saison végétative nous permettent de caractériser la croissance et la biomasse produite en lien avec leur environnement.

La suite de ce mémoire de thèse est rédigée de la manière suivante :

- Dans le premier chapitre, nous caractérisons la morphologie et l'architecture, le cycle de développement et la production de biomasse de $Msin$ et $M \times g$ pour répondre à la question suivante :

Existe-t-il des différences de morphologie, d'architecture et de croissance entre $Msin$ et $M \times g$ qui pourraient avoir un lien avec des fonctionnements différents ?

- Dans un second temps, l'étude de l'évolution des stocks d'azote dans les parties aériennes et souterraines des plantes au cours du temps nous permet de calculer les flux et efficacités de recyclage de l'azote, ainsi que les flux exogènes d'azote entre les plantes et leur environnement. Ce second chapitre correspond à un premier manuscrit d'article scientifique soumis au journal *BioEnergy Research*. Il répond aux questions suivantes :

Le recyclage de l'azote de $Msin$ est-il aussi performant que celui de $M \times g$?

Les flux exogènes d'azote, correspondant aux acquisitions et pertes d'azote par la plante, sont-ils similaires chez $Msin$ et $M \times g$?

- Le troisième chapitre présente le manuscrit d'un second article scientifique en préparation pour le journal *BioEnergy Research*. Il vise à caractériser le stockage du carbone

par l'étude de l'évolution des teneurs et stocks des glucides non structuraux dans les parties souterraines des deux espèces de miscanthus étudiées. Il vise également à comparer le stockage et la remobilisation du carbone et de l'azote :

Existe-t-il des différences concernant le stockage et la remobilisation du carbone en terme de molécules et de dynamiques entre Msin et M×g ?

Est-ce que les dynamiques de stockage et de remobilisation du carbone et de l'azote diffèrent en fonction du statut (source ou puits) des différents tissus du rhizome et des bas de tige ?

Les dynamiques de stockage d'azote et de carbone sont-elles identiques ?

-Enfin, dans la discussion générale, nous essayons de mettre en lien l'ensemble des variables étudiées dans les chapitres précédents pour répondre aux trois dernières questions :

Peut-on établir des corrélations entre les variables environnementales, phénologiques et de gestion des réserves carbonées et azotées ?

Peut-on proposer des types fonctionnels, qui correspondraient aux trois géotypes étudiés, pour produire de la biomasse en tenant compte des réserves endogènes des plantes ?

Quelles sont les variables clés pouvant être proposées aux sélectionneurs et les caractéristiques à prendre en compte pour optimiser la production de biomasse d'un point de vue agronomique ?

En conclusion, après avoir résumé l'ensemble des connaissances acquises de par notre étude, nous proposons des pistes d'amélioration et des expérimentations complémentaires pour compléter et consolider les connaissances acquises.

La rédaction des protocoles ainsi que la réalisation de l'ensemble des expérimentations ont été menés avant le début de ma thèse, à l'exception des dosages de biochimie et de la micro-diffusion de l'azote du sol des échantillons de quatrième année. En effet, j'ai pu participer à l'élaboration des protocoles et réaliser ces dosages au cours de mon doctorat. J'ai également participé à l'expérimentation au champ de mai à septembre 2016 lors de mon stage de 1^{ère} année de Master ainsi qu'aux expérimentations pendant le déroulement de ma thèse.

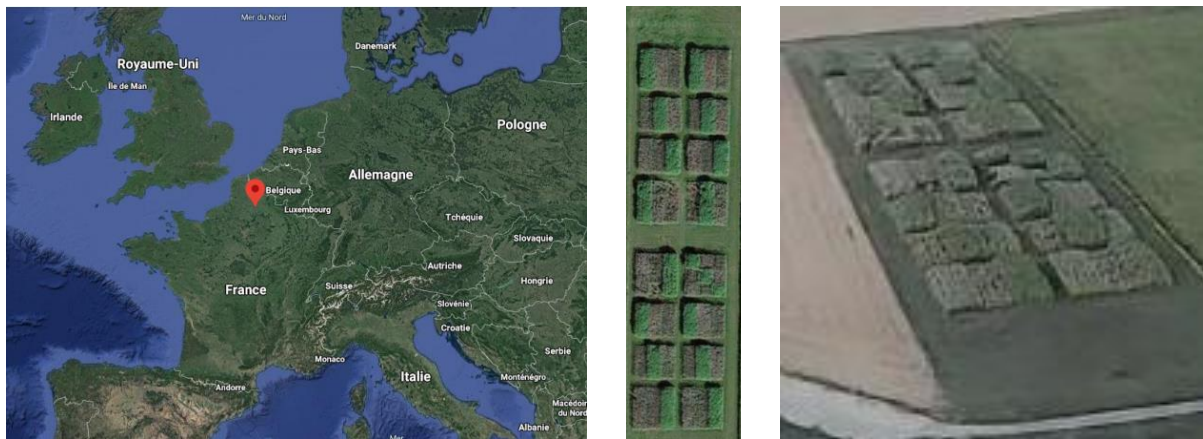


Figure 8. Localisation du dispositif (à gauche) et vues aériennes du dispositif
 (Sources : Google Maps, Mathilde BRANCOURT)

Partie II - Cadre expérimental

2.1. Présentation du site expérimental

Le dispositif expérimental est situé sur le site de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) à Estrées-Mons (49°52'20'' N ; 3°00'58'' E ; altitude 60m) en région Hauts-de-France (Figure 8).

Le climat océanique dégradé (Joly *et al.*, 2010) est caractérisé par une température annuelle moyenne de 11°C et un cumul de précipitations (PP) annuel moyen de 640 mm au cours des dix dernières années (2007-2017). Les températures moyennes annuelles et les PP annuels des quatre années de culture (2014, 2015, 2016 et 2017) correspondent à ces moyennes, respectivement de 11,9, 11,3, 11,0 et 11,4 °C et 755, 631, 675 et 531 mm. Les dynamiques d'évolution des températures minimales (T_{\min}), moyennes (T_{moy}) et maximales (T_{\max}), du PP, du rayonnement global journalier (R_g), de l'évapotranspiration potentielle de Penman (ETPP) et du déficit de pression partielle de vapeur d'eau (VPD) paraissent similaires entre années (Figure 9) à partir de données climatiques obtenues par une station météorologique INRAE située sur la station d'expérimentation (base de données CLIMATIK, INRAE AGROCLIM, 2021). Cependant, les températures, le R_g , l'ETP et la VPD de mars à juillet 2016 semblent plus faibles qu'en 2017 (Tableau 2). En revanche, les mois d'août et septembre 2016 semblent avoir été un peu plus chauds qu'en 2017. Les PP ont été deux à six fois plus importants entre janvier et juin 2016 mais deux à quatre fois moins importants entre octobre et décembre par rapport à 2017.

L'essai a été implanté sur un sol brun lessivé limoneux d'une profondeur de 3 à 4 m dont la roche mère est la craie (Haplic Luvisol, IUSS Working Group WRB, 2006). Chaque année, des reliquats azotés réalisés en mars ou avril avant la reprise de la végétation ont permis de mesurer des quantités d'azote minéral dans le sol de 85, 85, 53 et 54 kg ha⁻¹ sur l'horizon 0-150 cm de 2014 à 2017. Lors de l'expérimentation, un suivi de micro-diffusion de l'azote dans le sol a été réalisé à l'aide d'azote marqué. Le principe de la micro-diffusion de l'azote 15 (¹⁵N) contenu dans des échantillons de sol consiste dans un premier temps en la quantification de la part d'azote ¹⁵N contenu dans le NH₄⁺, puis dans un second temps de quantifier la part d'azote ¹⁵N contenue dans les NO₃⁻ et NO₂⁻. Des prélèvements de sol ont ainsi été entrepris en parallèle des prélèvements de plantes, sur chaque ligne de prélèvement, sur 0-30cm de profondeur. Après avoir extrait l'azote minéral des échantillons de sol au KCl, les teneurs en nitrates (NO₃⁻) et en ammonium (NH₄⁺) ont été déterminées par colorimétrie en flux continu (SKALAR). Nous

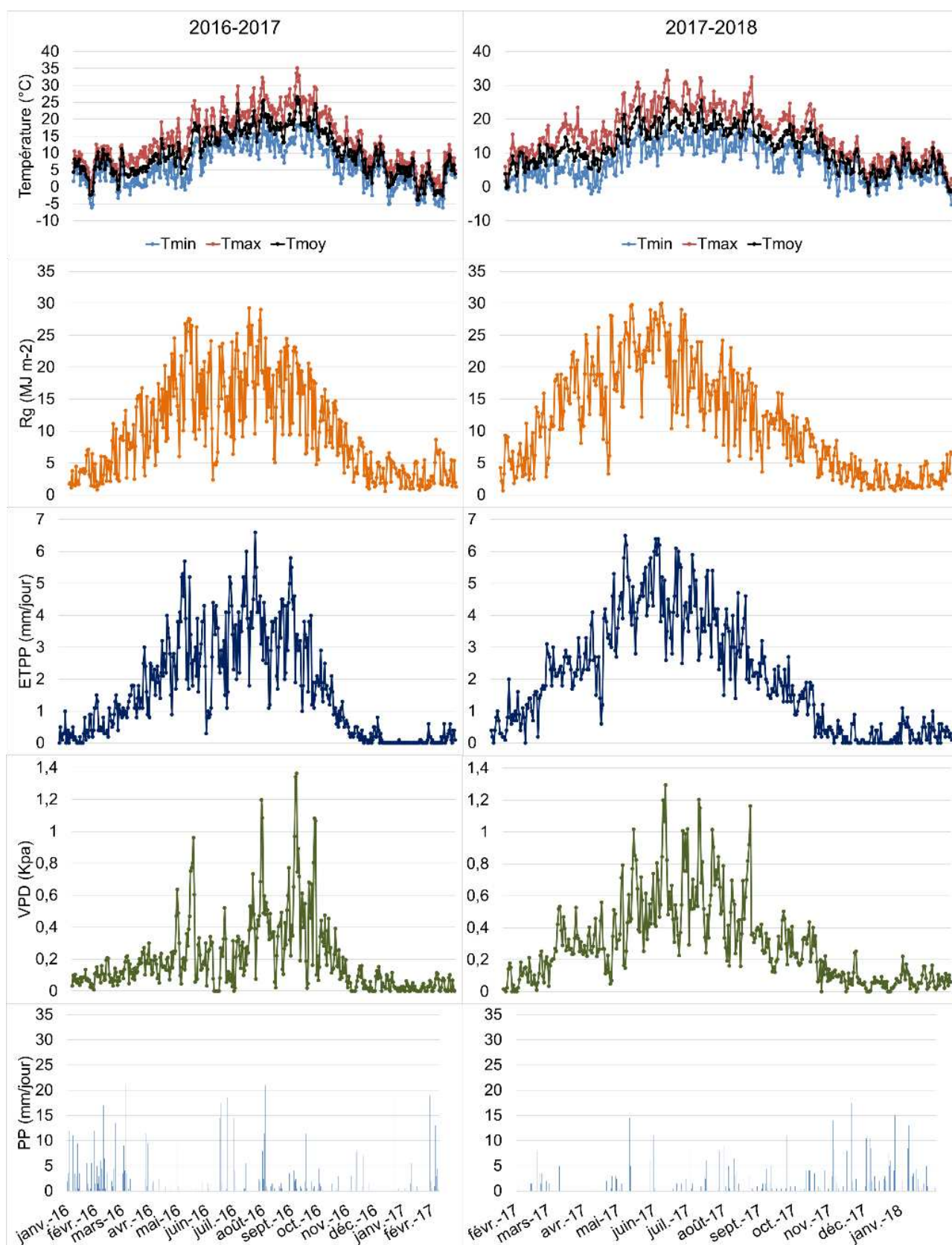


Figure 9. Températures journalières minimales (T_{\min}), moyennes (T_{moy}) et maximales (T_{\max}), Rayonnement global journalier (R_g), Evapotranspiration potentielle de Penman journalière (ETPP), déficit de pression de vapeur d'eau journalier (VPD) et cumul des précipitations (PP) journalier de 2016 à 2018

(Données Agroclicm INRAE, CLIMATIK, station d'Estrées-Mons)

avons ensuite réalisé la micro-diffusion de l'azote ^{15}N des solutions de sol pour déterminer la signature isotopique en ^{15}N du sol. Lors de la première étape de micro-diffusion, l'oxyde de magnésium (MgO) ajouté à la solution constituée de sol et de KCl , transforme l'ammonium en ammoniac volatile qui se fixe sur un filtre acidifié par de l'acide sulfurique (H_2SO_4) sous forme de sulfate d'ammoniaque ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$). Lors de la seconde étape de micro-diffusion, l'Alliage de Devarda réduit les nitrates en ammoniac (Mesplède et Saluzzo, 2004). Le réactif de Brij ajouté permet de modérer le dégagement de dihydrogène (H_2) dû à la réduction de l'eau par l'alliage de Devarda. L'ammoniac issu des nitrates et des nitrites se fixe alors sur le nouveau filtre acidifié par le H_2SO_4 sous forme de sulfate d'ammonium ($\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$). Les filtres sont ensuite analysés pour déterminer l'abondance en ^{15}N grâce à un analyseur élémentaire (EURO EA 3000, Eurovector, Milan, Italie) connecté en ligne à un spectromètre de masse isotopique (Delta Plus Advantage, THERMO Electron, Bremen, Allemagne).

Des capteurs PAR-LE (Solems®) ont été placés au sol au sein de la parcelle d'expérimentation pour déterminer le PAR (*Photosynthetic Active Radiation* ou rayonnement photosynthétiquement actif) transmis au sol. Le PAR incident a été mesuré par un capteur du même type porté par un mât à l'entrée de la parcelle.

2.2. Implantation du dispositif et itinéraire cultural

Deux géotypes de *Msin* (*Msin* Goliath et *Msin* Malepartus) et un géotype de $M \times g$ ont été choisis pour mener cette étude. $M \times g$, espèce la plus étudiée et actuellement cultivée pour la production de biomasse, servira de référence. Les deux géotypes ornementaux de *Msin* présentent des caractéristiques intéressantes : *Msin* Goliath possède un bon potentiel de production, *Msin* Malepartus présente une composition pariétale contrastée par rapport à $M \times g$ (Arnoult, 2014) et il est un des deux parents de la population étudiée en génétique au sein de notre unité de recherche.

Des fragments de rhizomes avec quelques bourgeons en cours de développement ont été plantés individuellement à la main au début du mois d'avril 2014 sur une parcelle labourée d'environ 6 700 m^2 à une densité de 2,08 plantes m^{-2} (Figure 10). $M \times g$ triploïde provient de l'Agricultural Development and Advisory Service (ADAS) au Royaume-Uni, *Msin* Malepartus (diploïde) et *Msin* Goliath (tétraploïde) proviennent tous deux de la pépinière Chombart à Hombleux (80) qui se fournit chez Plant Estate aux Pays-Bas. L'essai est divisé en quatre zones correspondant aux quatre années d'étude, permettant ainsi de réaliser chaque année des prélèvements de

Tableau 2. Moyennes mensuelles des principales variables climatiques de 2016 à 2018
(Données Agrocliclim INRAE, CLIMATIK, station d'Estrées-Mons)

Année	Mois	T _{min} (°C)	T _{max} (°C)	T _{moy} (°C)	R _g (MJ m ⁻² jour ⁻¹)	ETPP (mm jour ⁻¹)	VPD (Kpa jour ⁻¹)	PP (mm)
2016	Janvier	2,4	7,3	4,8	3,2	0,22	0,07	76
	Février	3,1	8,1	5,6	5,9	0,72	0,12	70
	Mars	2,5	9,7	6,1	9,8	1,34	0,16	82
	Avril	4,3	13,4	8,9	15,0	2,24	0,21	46
	Mai	9,4	18,8	14,1	17,5	3,17	0,30	105
	Juin	12,7	20,6	16,7	15,1	2,91	0,17	111
	Juillet	13,7	24,2	18,9	19,6	4,02	0,46	25
	Août	13,2	25	19,1	17,3	3,51	0,49	48
	Septembre	12,8	22,8	17,8	12,4	2,31	0,39	33
	Octobre	6,5	14,6	10,5	7,8	0,82	0,11	12
	Novembre	3,7	9,3	6,5	3,9	0,17	0,05	47
	Décembre	0,8	6,3	3,6	3,2	0,00	0,02	22
2017	Janvier	-1,4	3,7	1,1	3,3	0,09	0,03	43
	Février	3,5	8,9	6,2	4,4	0,50	0,06	41
	Mars	5,2	13,7	9,4	10,3	1,47	0,21	41
	Avril	3,1	14,8	9,0	17,7	2,49	0,31	6
	Mai	9,9	20,7	15,3	19,6	3,64	0,41	40
	Juin	12,9	24,7	18,8	23,2	4,73	0,61	31
	Juillet	13,4	25,1	19,2	18,4	4,27	0,64	41
	Août	13,3	23,6	18,4	15,3	3,30	0,53	48
	Septembre	9,8	19,1	14,5	11,1	2,03	0,30	36
	Octobre	9,1	17,2	13,2	7,7	1,20	0,23	36
	Novembre	3,6	10,0	6,8	4,1	0,25	0,09	80
	Décembre	2,4	7,1	4,7	2,2	0,15	0,05	90
2018	Janvier	4,2	8,6	6,4	2,2	0,34	0,07	103
	Février	-0,7	3,0	1,2	4,5	0,31	0,07	10

plantes entières, organes souterrains compris, sans détruire l'ensemble de l'essai (Figure 11). Chaque zone « année » comprend trois blocs complets dans lesquels on retrouve les trois géotypes étudiés. Les deux premières années de culture, des prélèvements de plantes ainsi que quelques suivis de croissance des plantes ont été réalisés. La majorité des mesures et prélèvements ont été réalisés lors des troisièmes et quatrièmes années lorsque les plantes avaient théoriquement atteint leur plateau de production de biomasse à ces âges (Arnoult and Brancourt-Hulmel, 2015). Ce travail de thèse repose sur l'analyse des données des troisièmes et quatrièmes années.

L'irrigation a été mise en place dès la première année par rampe puis a été relayée par un système de goutte à goutte de la deuxième à la quatrième année, lorsque la hauteur des plantes ne permettait plus le passage des rampes. 68, 250, 467 et 427 mm d'eau ont été apportés respectivement en 2014, 2015, 2016 et 2017. Le désherbage de la parcelle a été réalisé uniquement la première année, de manière chimique, pour réduire la compétition avec les adventices. Les années suivantes, le *mulch* formé par les feuilles tombées au sol a empêché la croissance des adventices. Un désherbage mécanique manuel a été pratiqué ponctuellement. A la fin de la première année de culture, les parties aériennes ont été fauchées, broyées et laissées sur le sol, ce qui correspond à l'itinéraire cultural préconisé pour une culture de miscanthus. A partir de la seconde année, l'ensemble de l'essai a été récolté manuellement en février grâce à une motofaucheuse, pour éviter le tassement du sol. Les parties aériennes ont été exportées pour reproduire les conditions de culture d'une production de biomasse lignocellulosique « conventionnelle » (Figure 12). Aucune fertilisation n'a été appliquée les deux premières années. En revanche, 120 kg d'azote ha⁻¹ ont été apportés sous forme de solution d'urée et de nitrate d'ammonium marquée au ¹⁵N (0,125 At %) au début du mois de mai 2016 et 2017 sur les zones de l'essai respectivement en 2016 et 2017, permettant l'observation du devenir de l'engrais par la technique micro-diffusion précitée. Pour que les plantes étudiées en 2016 et 2017 suivent le même itinéraire technique, 120 kg N ha⁻¹ non marqué ont été appliqués en 2016 sur la parcelle étudiée en 2017.



Figure 10. Implantation de l'essai (à gauche) par plantation de fragment de rhizome présentant quelques bourgeons en cours de développement (à droite)
(Source : INRAE – Stéphane HERVIEU)

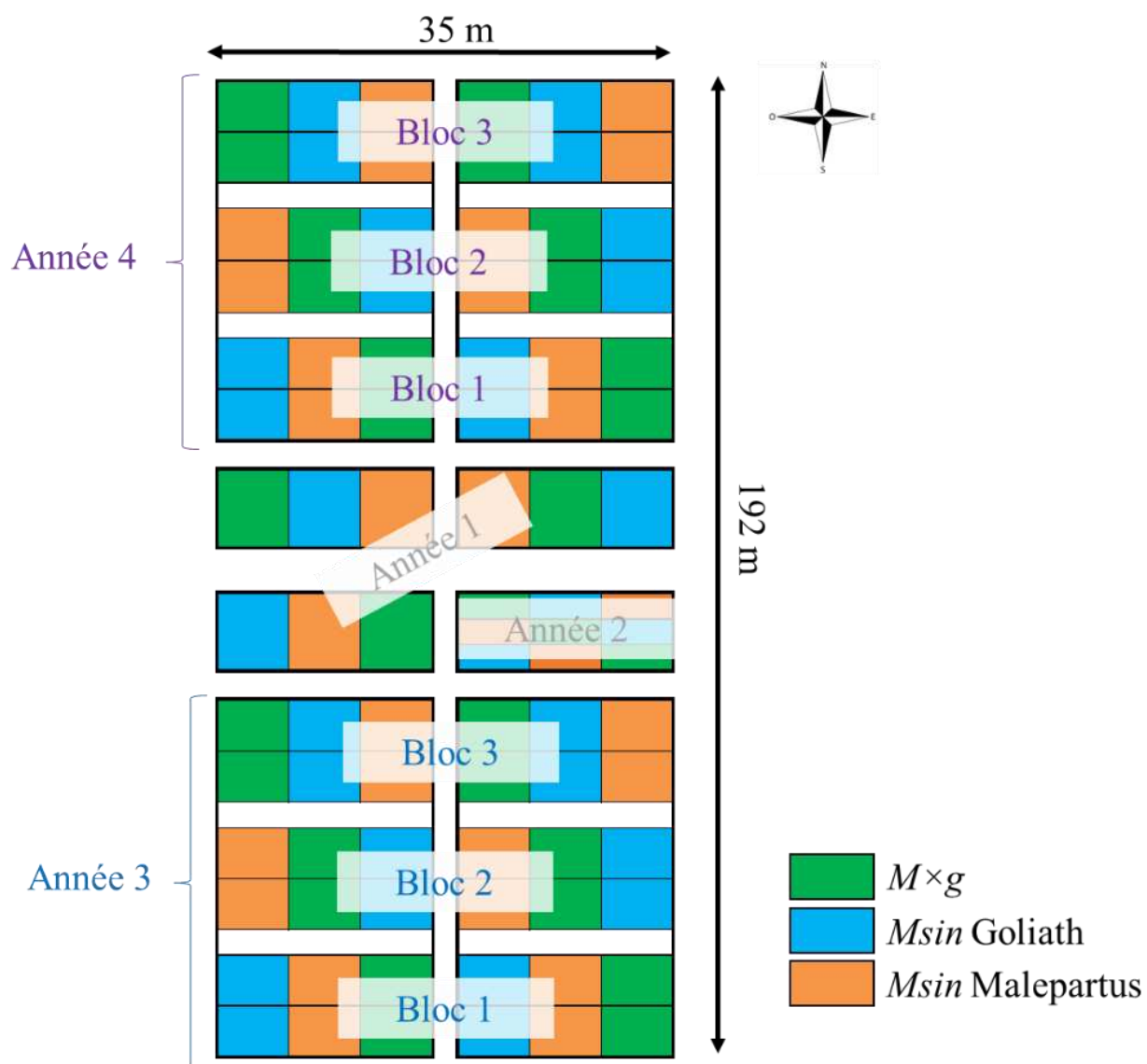


Figure 11. Plan du dispositif expérimental complet

2.3. Suivi de la croissance et du développement des plantes

Une « zone de référence » a été déterminée pour chaque génotype dans chaque bloc du côté Est du dispositif pour pouvoir suivre la croissance et le développement de mêmes plantes tout au long de l'année (Figure 13, cases jaunes). Chaque zone de référence comporte 14 plantes parmi lesquelles nous avons choisi 10 plantes représentatives du peuplement.

La date d'émergence par génotype et par bloc a été déterminée lorsque 50% de ces 10 plantes présentaient au moins un bourgeon. Pour chacune de ces 10 plantes, trois tiges de première cohorte ont été twistées et suivies tout au long de la saison végétative. Sur ces tiges, la hauteur de la dernière feuille ligulée (HDFL), la hauteur de tige sénescence (HS) et le nombre de feuilles (Nbr_feuilles) ont été déterminés grâce à une perche télescopique avant chaque prélèvement en février, mai, octobre et novembre et environ tous les 10 jours entre juin et septembre. Les stades de développement majeurs ont aussi été relevés sur ces plantes. Comme pour l'émergence, la date d'apparition du stade a été notée lorsque 50% des plantes suivies présentaient au moins une tige ayant atteint le stade en question. Ainsi, les dates d'apparition de la feuille étendard (FE), c'est-à-dire la dernière feuille ligulée émise avant l'épiaison, la date de sortie des panicules (SPan) et le stade où la tige de cohorte 1 était sénescence à 100% ont été déterminées. Le nombre total de tiges par plante (toutes cohortes confondues) a également été déterminé à chaque suivi. En 2016, les suivis des hauteurs, stades et nombre de tiges ont été réalisés sur les mêmes plantes. Cependant, la manipulation régulière des plantes engendrant une casse des tiges et un tassement du sol à proximité, donc un nombre de tiges biaisé, il a été décidé en 2017 de mettre en place deux zones de référence. La première a servi à mesurer les hauteurs et déterminer les stades de développement (Figure 13, cases jaunes). La seconde a été utilisée pour suivre l'évolution du nombre de tiges (Figure 13, cases roses).

La profondeur et la densité de l'enracinement des plantes ont été estimées en novembre 2017. Des fosses pédologiques de 3 m de profondeur et 1 m 80 de largeur ont été creusées à l'aide d'une pelleteuse sur la partie nord-est du troisième bloc de la quatrième année devant chaque génotype. Chaque profil nous permettait d'appréhender l'enracinement de trois plantes adjacentes pour chaque génotype. Après avoir nettoyé chaque profil au couteau et au pinceau, un cadre de 1 m² portant un grillage de maille 3,61 (1,9*1,9) cm² a été déplacé sur la surface totale de chaque tranchée. Le nombre de racines visibles dans chaque maille de 3,61 cm² a été déterminé (Figure 14). Les résultats sont présentés dans le premier chapitre en Figure 18.



Figure 12. Récolte de l'essai en février à la motofaucheuse
(Source : INRAE – Julie LEROY)

2.4. Caractérisation de la biomasse lignocellulosique produite

Seize prélèvements de plantes entières ont été réalisés par an en troisième (2016) ainsi qu'en quatrième (2017) année de culture entre février et novembre, à raison d'un prélèvement tous les dix jours entre juin et octobre. Des « lignes de prélèvement » dans lesquelles les plantes ont été prélevées ont été déterminées dans chaque bloc et pour chaque génotype (Figure 13, cases de couleur foncée). Elles étaient séparées entre elles par une rangée de plantes non étudiées (Figure 13, cases de couleurs claires) pour conserver une homogénéité, limiter les effets de compétition et l'effet « de bordure » dans la parcelle en raison des prélèvements destructifs pendant l'année. Avant chaque prélèvement, le nombre de tiges de chaque plante de la zone de référence a été défini pour déterminer la médiane du nombre de tiges par plante, par génotype et par bloc. Dans la ligne de prélèvement, les trois plantes dont le nombre de tiges était le plus proche de la médiane mesurée sur la zone de référence ont été prélevées entièrement (parties souterraines + parties aériennes). Les parties aériennes des deux autres plantes dont le nombre de tiges était le plus proche du nombre médian ont également été prélevées. En 2016, à cause d'une modification de protocole, les données des parties souterraines du premier prélèvement de février ne sont pas disponibles. Un important épisode de verse survenue en juin 2017 chez *M×g* n'a pas permis de réaliser le quatrième prélèvement et a engendré une modification du choix des plantes chez ce génotype : à partir du cinquième prélèvement, seules 3 plantes ont dû être prélevées parmi les plantes non versées, parfois hors des lignes de prélèvement initiales. Les biomasses observées chez *M×g* en 2017 sont supérieures à celle de 2016, et pourrait être expliquées par la modification du peuplement à cause de la verse : les plantes versées entrant moins en compétition pour les ressources lumineuses avec les plantes non versées. En ce sens, les plantes prélevées à partir du cinquième prélèvement pourraient ne pas être représentatives du peuplement. Nous avons donc choisi de ne pas présenter les données concernant *M×g* en 2017.

Chaque prélèvement s'est déroulé pendant trois jours consécutifs à raison d'un bloc prélevé et traité par jour, le bloc 1 étant prélevé le premier jour et le bloc 3 le troisième jour. L'effet jour de prélèvement a donc été pris en compte par l'effet bloc. Les plantes ont été prélevées le matin entre 8h et 9h. Les parties aériennes ont d'abord été récoltées manuellement au sécateur : les tiges portant plus de deux feuilles ligulées sont considérées comme autotrophes et sont coupées à une hauteur de coupe de 7 cm et réservées dans un sachet à part. Le seuil de deux feuilles ligulée a été décidé arbitrairement. En effet, la transition des jeunes pousses de maïs de

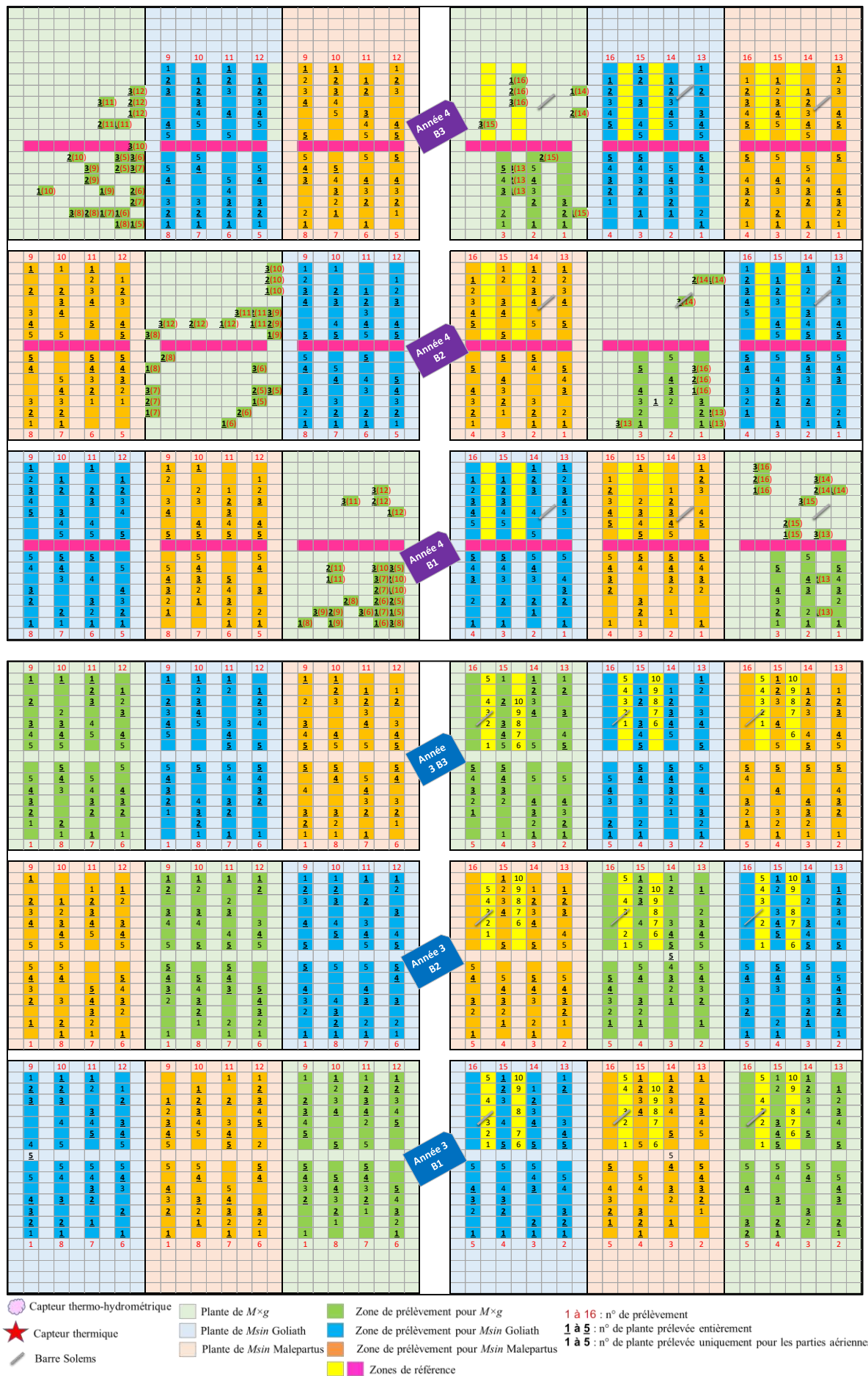


Figure 13. Plan détaillé des zones « année 3 » et « année 4 »

l'hétérotrophie à l'autotrophie est réalisée au stade « 4 feuilles ligulées » (Deleens *et al.*, 1994). Même si le miscanthus est une plante pérenne dont les réserves contenues dans les parties souterraines sont supérieures à celles contenues dans le grain de maïs, au vu du nombre de tiges supérieur du miscanthus, nous avons émis l'hypothèse que les jeunes tiges de celui-ci devaient être autotrophes avant le stade « 4 feuilles ligulées ». De plus, grâce à sa capacité de photosynthèse à faible température (Naidu *et al.*, 2001 ; Naidu and Long, 2004), les jeunes tiges de miscanthus peuvent devenir autotrophes plus tôt que celles du maïs. Généralement, le rhizome se trouve dans les 30 premiers cm de sol. Dans cette étude, les rhizomes et leurs racines associées lors de l'extraction ont été prélevés à la bêche. Afin d'enlever le surplus de terre et faciliter leur transport, les rhizomes ont été grattés superficiellement grâce à des griffes à 3 dents (Figure 15) puis délicatement lavées individuellement à l'eau froide au nettoyeur à haute pression en prenant soin de ne pas abîmer les bas de tiges et bourgeons. Les plantes ont ensuite été ramenées au laboratoire. Les parties aériennes ont été fraîchement pesées individuellement et la surface foliaire a été mesurée pour chaque plante grâce à un LI-3100C Area Meter (LI-COR®). Les plantes ont été rassemblées par génotype et des sous-échantillons de feuilles et de tiges ont été réalisés. Après séchage à l'étuve à 65°C pendant 96 heures, une nouvelle pesée des sous-échantillons nous a permis d'en déterminer les teneurs en eau et en matière sèche. En parallèle, chaque rhizome a été découpé à la main au sécateur en quatre compartiments « fonctionnels » (Chapter 3 – Fig1) que nous avons décidé selon le rôle potentiel de source ou de puits de nutriments à différents moments de la saison : les quatre centimètres de rhizome et leurs racines sous les bourgeons (Rhi_buds), les quatre centimètres de rhizome et les racines sous les bas de tiges autotrophes (Rhi_SB), le reste du rhizome et ses racines (Rhi_M) et les bas des tiges autotrophes (SB). Les bourgeons ont également été séparés du rhizome et rassemblés avec les jeunes tiges portant moins de deux feuilles ligulées prélevées précédemment au champ. Ces différentes catégories de tissus ont de nouveau été lavées à l'eau froide, puis séchées et fraîchement pesées. Chaque catégorie a ensuite été rassemblée par génotype, et des sous-échantillons ont été réalisés et mis à l'étuve pour déterminer leurs teneurs en eau et en matière sèche respectives. Ces sous-échantillons des parties aériennes et souterraines ont été broyés finement (< 500 µm). Leurs teneurs en azote et en ¹⁵N ont été déterminées respectivement à l'aide d'un analyseur élémentaire (EURO EA 3000, Eurovector, Milan, Italie) connecté en ligne à un spectromètre de masse isotopique (Delta Plus Advantage, THERMO Electron, Bremen, Allemagne). Nous avons ainsi pu calculer leurs quantités d'azote et de ¹⁵N, leur part d'azote dérivé de l'engrais (*Nitrogen derived from fertilizer, Ndff*), la



Figure 14. Réalisation des tranchées à l'aide d'une pelleteuse (en haut) pour l'étude des profils de sol et racinaires (3 m de profondeur) (en bas, à gauche). Le comptage des racines a été fait dans chaque case (3,61 cm²) du cadre (en bas, à droite)

(Source : INRAE – Julie LEROY)

proportion d'engrais retrouvée (*The fertiliser N-recovery*, N_{rec}) et des flux d'azotes saisonniers dans ces plantes. Les équations et résultats sont détaillés dans le chapitre 2.

Des sous-échantillons frais des quatre compartiments des parties souterraines (Rhi_buds, Rhi_SB, Rhi_M, SB) ont été découpés sur glace en petits fragments de quelques centimètres au couteau (Figure 16), puis congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C. Ils ont ensuite été lyophilisés (VirTis BenchTop Pro, SP Scientific) puis broyés dans un agitateur à peinture modifié (SKANDEX SK350) et stockés à température ambiante. Finalement, leurs teneurs en protéines solubles, amidon et sucres solubles ont été dosées par méthode colorimétrique. Les protocoles de ces dosages et leurs résultats sont détaillées dans le chapitre 3.

Une synthèse de l'ensemble des expérimentations et mesures réalisées lors des troisième et quatrième années de culture dont les résultats seront traités dans cette thèse est présentée dans le Tableau 3.



Figure 15. Prélèvement des parties aériennes (à gauche) et souterraines (à droite)
(Source : INRAE – Julie LEROY, Marion ZAPATER)



Figure 16. Découpage des différents compartiments dits « fonctionnels » du rhizome et les bas de tiges
(Source : INRAE – Marion ZAPATER)

Tableau 3. Synthèse des expérimentations et mesures réalisées en troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture

Méthode	Fréquence	Variables
Caractérisation de l'environnement		
Station météorologique INRAE située sur la station expérimentale	Horaire et journalier en 2016 et 2017	T _{min} , T _{max} , T _{moy} , ETP, PP, VPD, Rg
Capteurs PAR-LE (Solems®) sur un mât à l'entrée de la parcelle	Toutes les 15 minutes en 2016 et 2017	PAR incident
Profil pédologique	2014	Description des différents horizons du sol
Mesure de la teneur en nitrates et en ammonium du sol par colorimétrie en flux continu (SKALAR)	Reliquats azotés à la sortie de l'hiver + 16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	Teneur NO ₃ ⁻ , Teneur NH ₄ ⁺ , Teneur Nmin
Mesure de l'abondance en ¹⁵ N du sol par micro-diffusion du ¹⁵ N (analyseur élémentaire : modèle EURO EA 3000, EUROVECTOR, Milan, Italie) connecté en ligne à un spectromètre de masse isotopique (modèle Delta Plus Advantage, THERMO Electron, Bremen, Allemagne)	16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	δ ¹⁵ N, Excès isotopique ¹⁵ N
Caractérisation de la biomasse végétale		
Prélèvements de plantes entières	16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	W
Mesure de la teneur en azote et ¹⁵ N des plantes par un analyseur élémentaire (modèle EURO EA 3000, EUROVECTOR, Milan, Italie) connecté en ligne à un spectromètre de masse isotopique (modèle Delta Plus Advantage, THERMO Electron, Bremen, Allemagne)	16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	[N], NA, NB, NT, Ndff, N _{rec}
Dosages colorimétriques des teneurs en protéines solubles (méthode de Bradford), amidon et saccharose (Megazyme Total Starch Assay Procedure et Sucrose, D-Fructose and D-Glucose Assay Procedure, Megazyme International, Ireland) des parties souterraines et des bas de tiges, par un spectrophotomètre lecteur de microplaques (SpectrostarNano, BMG Labtech, Allemagne)	16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	[proteins], [starch], [sucrose]
Croissance et développement des plantes		
Mesure de la surface foliaire : LI-3100C Area Meter (LI-COR®)	16 prélèvements/an de février à novembre en 2016 et 2017	SLA
Capteurs PAR-LE (Solems®) posés au sol au sein de la parcelle	1 capteur dans chaque génotype sur chacun des 3 blocs, mesure toutes les 15 minutes en 2016 et 2017	PAR transmis
Mesure de la hauteur de la dernière feuille ligulée et de la hauteur de tige sénescente grâce à une perche télescopique	Tous les 10 jours de mai à novembre sur la zone de référence et avant chaque prélèvement de biomasse sur la zone de prélèvement en 2016 et 2017	HDFL, HS
Comptage visuel du nombre de tiges par plante et du nombre de feuilles par tige	Tous les 10 jours de mai à novembre sur la zone de référence et avant chaque prélèvement de biomasse sur la zone de prélèvement en 2016 et 2017	Nbr_tiges, Nbr_feuilles
Détermination visuelle du stade de développement	Tous les 10 jours de mai à novembre sur la zone de référence et avant chaque prélèvement de biomasse sur la zone de prélèvement en 2016 et 2017	Emergence, FE, SP _{an}
Profil racinaire sur tranchée de 3 m de profondeur et 1 m 80 de largeur, dénombrement des racines (quadrillage 0,9*0,9 cm)	Novembre 2017, une fosse par génotype, 3 plantes par fosse	Profondeur d'enracinement, densité racinaire sur différents horizons

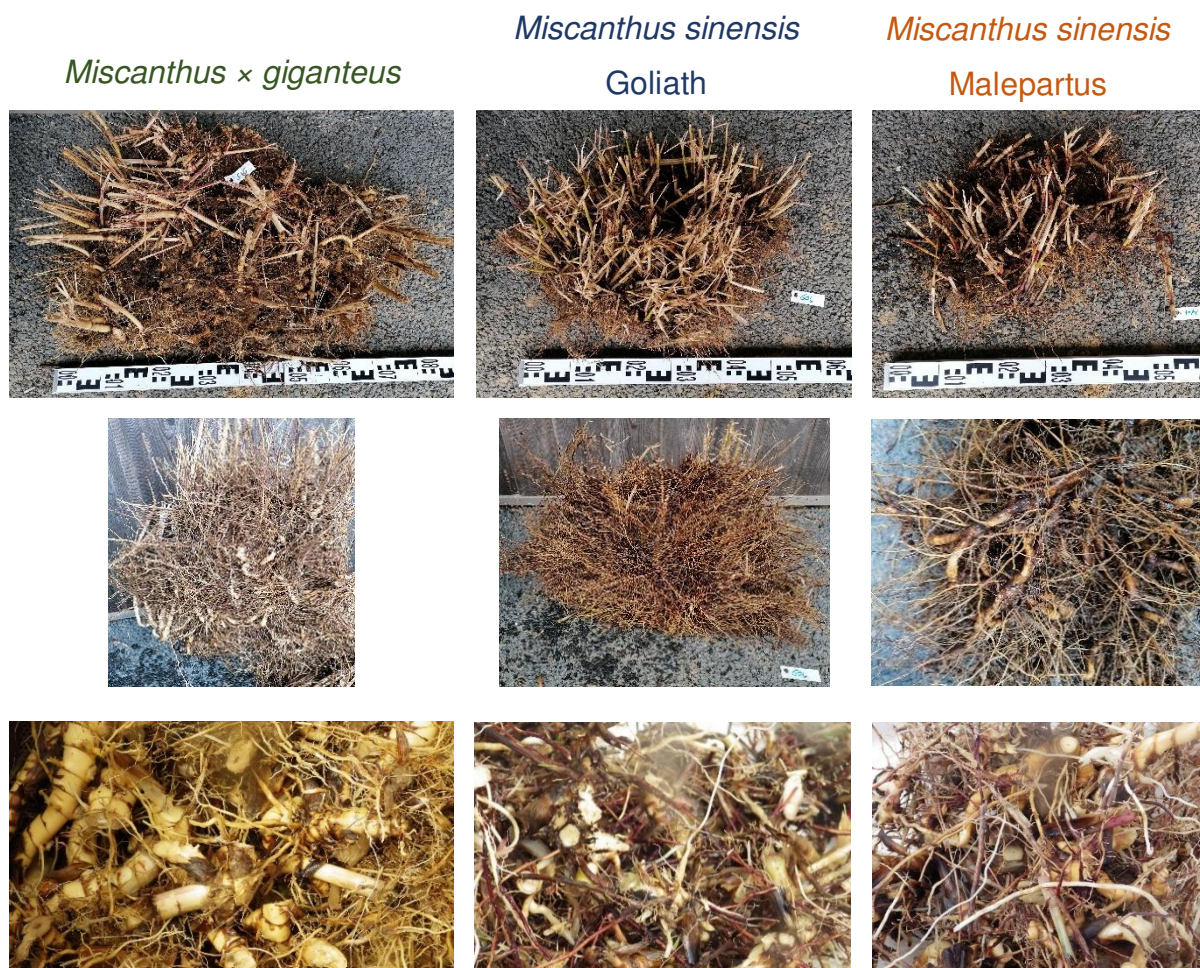


Figure 17. Faces supérieures (en haut) et inférieures (au milieu) et zoom (en bas) de rhizomes entiers de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus

(Source : INRAE – Julie LEROY)

Partie III - Résultats et discussions

Chapitre 1 : Morphologie et développement de *Miscanthus × giganteus* et *Miscanthus sinensis*

Nous avons choisi de baser nos travaux sur trois géotypes contrastés de miscanthus pour étudier et mettre en avant de potentielles différences dans le fonctionnement azoté et carboné chez *M×g* et *Msin* : un clone de *M×g* majoritairement cultivé en France actuellement provenant de l'ADAS¹ (Royaume-Uni), d'une variété de *Msin* (*Msin* Goliath) montrant un potentiel de production de biomasse important et d'une autre (*Msin* Malepartus) dont la composition de biomasse est contrastée par rapport à *M×g*. Dans ce premier chapitre, nous caractérisons la morphologie, la croissance et le développement de ces trois géotypes.

3.1.1. Morphologie

Les parties souterraines de *M×g* et *Msin* sont composées d'un rhizome (ensemble de tiges souterraines modifiées) portant des racines mais de taille et aspects différents selon les espèces. Le rhizome de *M×g* présente une taille supérieure à ceux des deux *Msin* (Figure 17). La structure générale du rhizome de *M×g* est aérée et de couleur marron claire. Les tiges modifiées qui le constituent sont de diamètre plus gros que celles des *Msin* (Figure 17). Les rhizomes de ces derniers sont assez similaires et présentent une structure générale plus resserrée, de couleur marron foncée. Ces dissemblances de structure ont également été relevées dans la littérature (Lee *et al.*, 2012). Aucun des trois géotypes ne présente de rhizome de type traçant, limitant leur risque invasif. La majorité des racines se situent entre 0 et 1 m 50 de profondeur pour les trois géotypes étudiés (Figure 18). Sur les profils racinaires réalisés en 2017 (Figure 18), des racines sont encore fréquemment retrouvées jusqu'à 3 m de profondeur pour *M×g* et *Msin* Goliath alors qu'elles se font rares pour *Msin* Malepartus entre 1 m 50 et 2 m 50 et sont quasi inexistantes entre 2 m 50 et 3m. La densité racinaire, c'est-à-dire le nombre moyen de racines observées par cm², ne varie pas réellement en fonction du géotype sur l'horizon 0-120 cm et diminue avec la profondeur d'enracinement. Elle est comprise entre 0,9

¹ Agricultural Development and Advisory Service

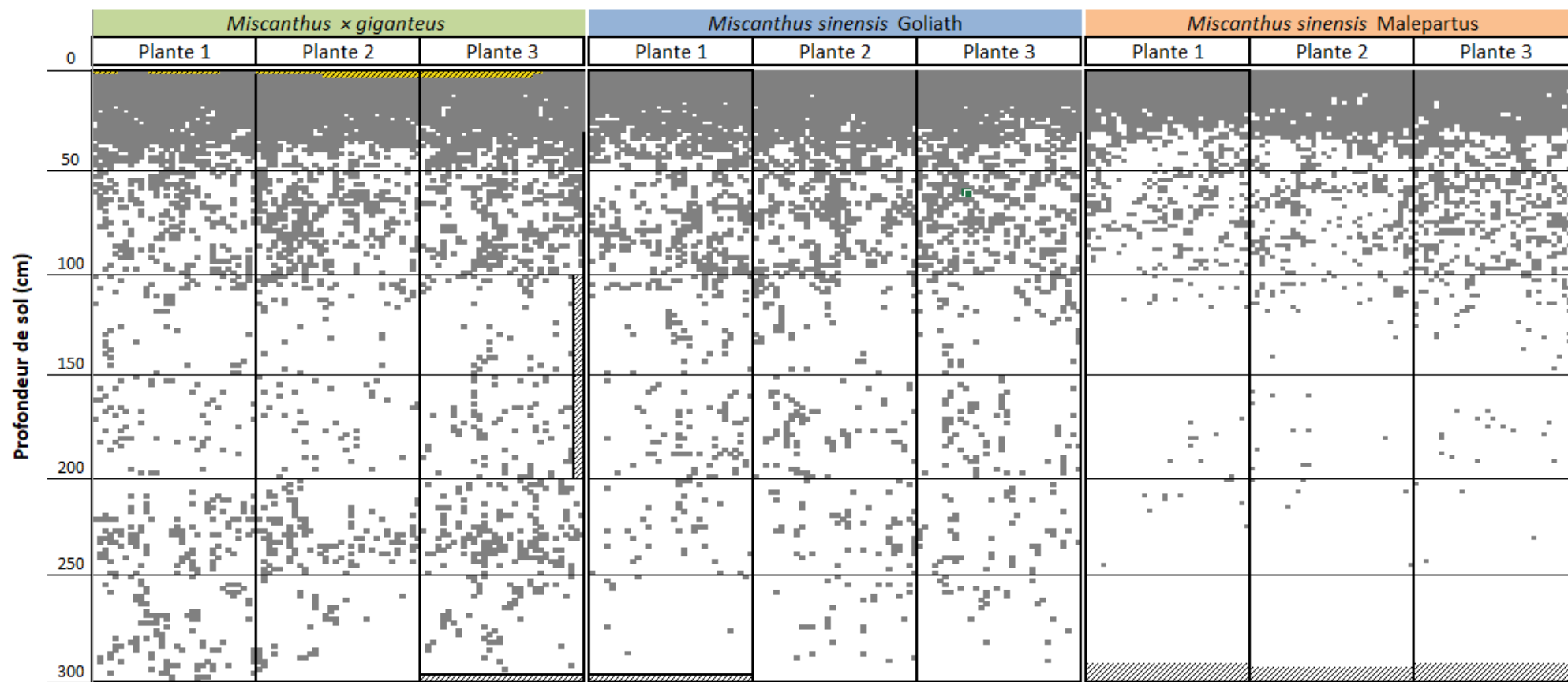


Figure 18. Cartographie et profils racinaires de *Miscanthus × giganteus* (à gauche), *Miscanthus sinensis* Goliath (milieu) et Malepartus (à droite) en novembre et décembre lors de la quatrième année de culture (2017)

Chaque case grise indique la présence d'au moins une racine, les cases blanches l'absence de racine, les cases hachurées en noir l'impossibilité de compter les racines sur la zone, et les cases hachurées en jaune la présence du rhizome.

et 1,3 racines cm^{-2} entre 0 et 30 cm, 0,2 et 0,3 racine cm^{-2} entre 30 et 60 cm, environ 0,1 racine cm^{-2} entre 60 et 90 cm et moins de 0,1 racine cm^{-2} entre 90 et 120 cm. Des profils racinaires ont été réalisés en 2015 en suivant le même protocole sur 1 m 10 de profondeur. La comparaison des profils de 2015 et de 2017 nous permet d'appréhender la croissance racinaire entre des plantes âgées d'un an et de quatre ans. En effet, la densité racinaire était moindre en 2015, comprise entre 0,2 et 0,4 racine cm^{-2} sur l'horizon 0-30 cm et inférieure à 0,1 racine cm^{-2} sur les autres horizons. L'enracinement de *M×g* sur notre essai est comparable à ce qui est observé dans la littérature pour des plantes du même âge, en condition fertilisée. Ainsi, Neukirchen *et al.* (1999) observent la présence de racines jusqu'à 2 m 50 et une densité racinaire qui décroît fortement à partir de 30 cm de profondeur, évoluant de 1 à 1,5 cm cm^{-3} dans l'horizon 0-30cm à moins de 0,5 cm cm^{-3} dans les horizons inférieurs chez des plantes âgées de 4 à 7 ans. Ferchaud *et al.* (2015) mesurent des densités racinaires légèrement inférieures aux nôtres sur les horizons compris entre 0 et 60 cm, avec 0,8 racine cm^{-2} sur l'horizon 0-30 cm et 0,2 sur l'horizon 30-60 cm, mais comparables sur les horizons inférieurs. Ces derniers observent également des racines allant jusqu'à 3 m. La profondeur d'enracinement des miscanthus de notre essai sont équivalentes à celles du switchgrass et de la luzerne et bien supérieures à celle du sorgho en conditions fertilisées et sur le même type de sol (Ferchaud *et al.*, 2015).

Les bourgeons des futures tiges qui émergent au printemps sont également contrastés entre espèces : *M×g* présente des bourgeons de 3 à 4 cm de couleur rose alors que ceux des *Msin* sont plus petits (1 à 2 cm) et plus foncés (Figure 19 A). Au moment de l'émergence des nouveaux bourgeons, alors que les tiges coupées lors de la récolte précédente de février ne reprennent pas leur croissance chez *M×g*, les bas de certaines tiges coupées chez les *Msin* encore verts reprennent leur croissance (Figure 19 B). Ce phénomène est plus visible chez *Msin* Goliath que *Msin* Malepartus. Il est à noter que les premières feuilles issues de ces « reprises de tiges » présentent la marque de la récolte et sont sectionnées à leur apex. Ces bas de tiges sont en fait le bas de tiges émises tardivement dans la saison précédente, qui étaient de petite taille et peu développées, et dont le méristème apical était resté sous la hauteur de coupe voire la surface du sol, leur permettant ainsi de reprendre leur croissance (Dong *et al.*, 2021). Ce phénomène n'est pas observé chez *M×g* puisque l'ensemble des tiges émises appartient à la première cohorte et a atteint la maturité à la fin de la saison de végétation.

Les parties aériennes sont composées de plusieurs tiges portant des feuilles caduques caulinaires de phyllotaxie alterne spiralée. La disposition des tiges au sein de la plante est variable entre espèces engendrant un port général de la plante différent. Les tiges de *Msin* sont

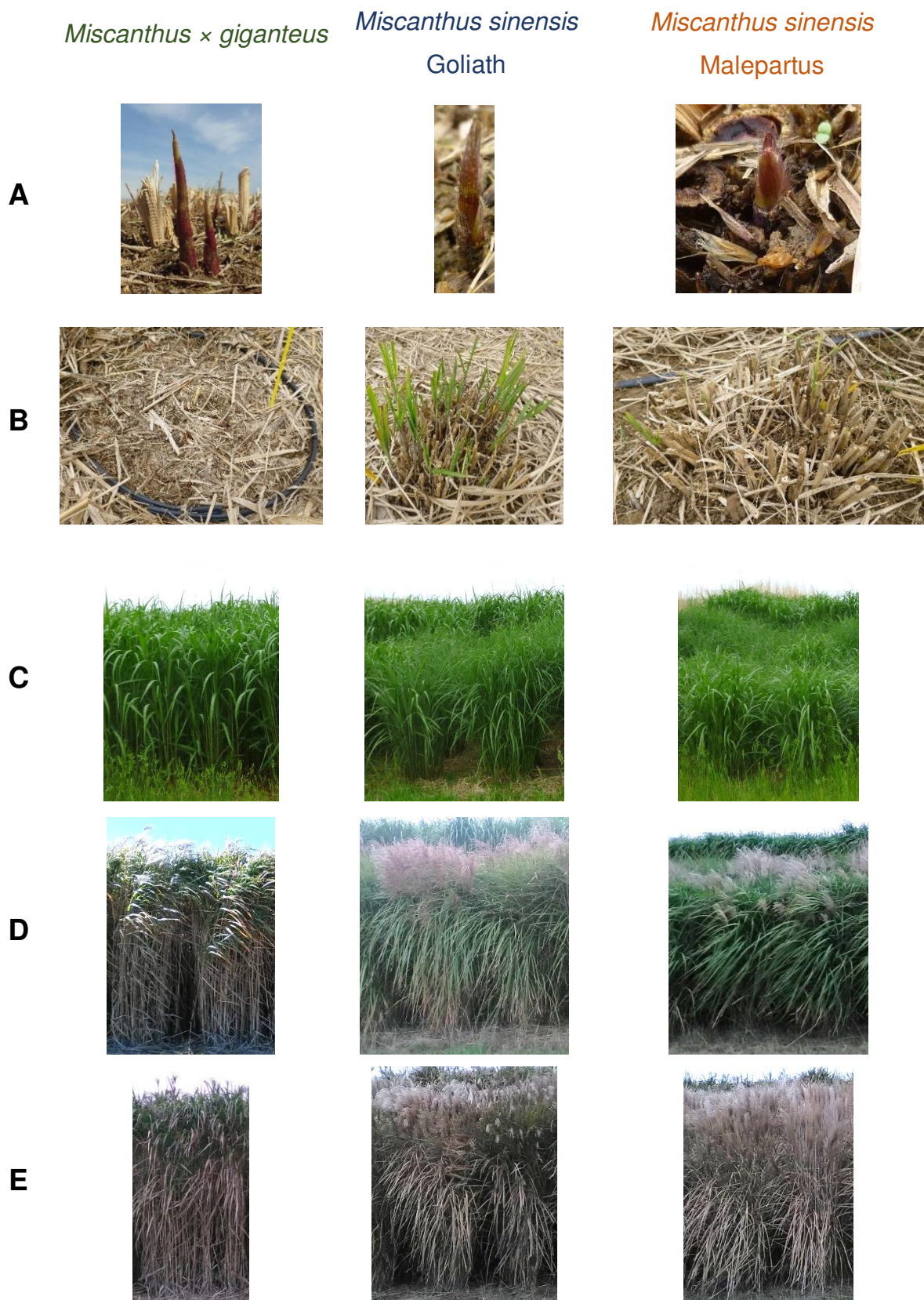


Figure 19. Parties aériennes de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus : bourgeons (A), reprise des tiges coupées à l'émergence en avril (B), phase de pleine croissance en juin (C), émergence des panicules et/ou floraison (D) et sénescence totale (E) pendant la cinquième (2018) année de culture
(Source : INRAE – Julie LEROY et Mathilde GOUTIN)

toutes regroupées à la base alors que celles de *M×g* sont disposées de manière diffuse, ce qui engendre une apparence de « mur de tiges » concernant le couvert de *M×g* et rendant la distinction des plantes individuelles difficile (Figure 19 C). En revanche, chaque plante de *Msin* est bien distincte (Figure 19 C). Les feuilles de *M×g* sont longues, larges et souples (50 à 80 cm de longueur, 22 à 25 mm de largeur), alors qu'elles sont d'une largeur plus réduite et sont plus rigides chez les *Msin* (20 à 70 cm de longueur, 6 à 20 mm de largeur) (Feng, 2013). Cette différence de morphologie engendre également des variations concernant les services écosystémiques rendus par la culture et favoriserait ainsi le choix d'autres espèces que *M×g* pour diversifier la culture du miscanthus. Ainsi, sur notre essai, plusieurs gîtes estivaux de rats des moissons, ou *Micromys minutus*, ont été observés uniquement chez les *Msin* et non chez *M×g*, sûrement à cause de la morphologie des parties aériennes des *Msin* qui se prêtent plus à la construction de leurs nids (Figure 20). Le nombre de feuilles porté par une tige varie peu entre années mais est différent entre espèces : en effet, les tiges de *M×g* portent significativement ($p < 0,05$) plus de feuilles (21 feuilles) que *Msin* Goliath (13-14 feuilles) et *Msin* Malepartus (11-12 feuilles) (Tableau 4), ce qui correspond aux valeurs observées dans des prairies naturelles de *Msin* (12 à 17 feuilles en fonction de la latitude) (Shoji *et al.*, 1990).

3.1.2. Rendement et composantes du rendement

Les productions de biomasses aérienne, souterraine et totale sont détaillées dans le second chapitre (Chapter 2 – Fig2). Pour les trois génotypes, la biomasse aérienne maximale est atteinte en septembre-octobre puis diminue progressivement (Chapter 2 – Fig2). *M×g* produit deux fois plus de biomasse aérienne que les *Msin* à l'automne : 43 t MS ha⁻¹ an⁻¹ en 2016 contre 26 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin* Goliath et 18 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin* Malepartus. Ces rendements aériens sont supérieurs à certaines études réalisées en France, au Royaume-Uni, en Allemagne ou en Italie avec et sans irrigation (4,3-30 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *M×g* et 7-15 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin*) (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Clifton-Brown *et al.* (2001) ; Roncucci *et al.*, 2015 ; Zapater *et al.*, 2017) mais équivalents à d'autres réalisées au Portugal (36 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *M×g* et 17 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin*), ou en Italie (40 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *M×g*) (Nassi o Di Nasso *et al.*, 2011). A la récolte de février, la biomasse aérienne a diminué d'environ 50% et les biomasses récoltées sont alors de 22 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *M×g*, 13-14 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin* Goliath et 10-11 t MS ha⁻¹ an⁻¹ pour *Msin* Malepartus. Ces valeurs correspondent aux 18 à 19,5 t MS ha⁻¹ an⁻¹ moyens de *M×g* et 10 t MS ha⁻¹ an⁻¹ moyens de *Msin* rapportées par Arnoult et Brancourt-Hulmel (2015) et Cadoux *et al.* (2014) en troisième année de culture. Les



Figure 20. Gîte estival de rat des moissons observé dans une plante de *Miscanthus sinensis* Goliath
(Source : INRAE – Julie LEROY)

biomasses produites par les *Msin* correspondent également à celles observées sur des prairies naturelles avec des biomasses variant de 0,9 t ha⁻¹ à 44 t MS ha⁻¹ an⁻¹ (Shoji *et al.*, 1990). Parmi les *Msin*, *Msin* Goliath présente un rendement plus important par rapport à *Msin* Malepartus, qui est probablement lié à sa plus longue durée de saison de végétation combiné à son important nombre de tiges (Thomas and Smart, 1993). Les biomasses souterraines maximales de *M×g* sont également supérieures aux *Msin* en 2016 : 16 t MS ha⁻¹ an⁻¹ contre 5 à 8 t MS ha⁻¹ an⁻¹, équivalentes à celles obtenues par Himken *et al.* (1997) et Strullu *et al.* (2011) mais supérieures aux 8 à 10 t MS ha⁻¹ an⁻¹ de Beale et Long (1997) et Dierking *et al.* (2017) pour *M×g*.

Les proportions de biomasses aérienne et souterraine par rapport à la biomasse totale évoluent de la même manière pour les deux espèces pendant les deux années de culture (Figure 21) : au début de la saison végétative (une cinquantaine de jours après émergence), la proportion de biomasse souterraine est majoritaire et représente, respectivement en 2016 et 2017, 82% et 90% du poids de la biomasse totale chez *M×g* et environ 60% et 80% chez les *Msin*. A partir de début juin pour les *Msin* et fin juin pour *M×g*, la proportion de biomasse aérienne augmente, à cause de l'augmentation de la biomasse aérienne, et compose majoritairement la biomasse totale avec une proportion maximale comprise entre 70 et 80% du poids de la biomasse totale pour les trois génotypes en 2016 et 2017. A partir de l'automne, la proportion de biomasse souterraine augmente de nouveau jusqu'en février de l'année suivante mais la biomasse aérienne reste majoritaire en terme de proportion. Ainsi, les trois génotypes ici étudiés développent de la même manière leurs parties aériennes par rapport à leurs parties souterraines en troisième et quatrième années de culture pendant la saison végétative.

Le suivi de la hauteur de la dernière feuille ligulée présente la même dynamique entre espèces sur les deux zones de suivi (référence et prélèvement) : elle augmente pour atteindre un plateau en été (Figure 22). Les dates pour atteindre ces *maxima* diffèrent entre génotypes mais sont identiques entre années : septembre pour *Msin* Malepartus, septembre à octobre pour *Msin* Goliath et octobre à novembre pour *M×g*. *M×g* est le plus grand génotype, avec une dernière feuille ligulée culminant à 348 cm sur la zone de prélèvement en 2016, et 333 cm sur la zone de référence (Tableau 4). Les hauteurs de *Msin* Goliath et *Msin* Malepartus ne sont pas significativement ($p < 0,10$) différentes en 2016 : de 219 cm à 237 cm sur la zone de prélèvement, mais *Msin* Goliath est significativement ($p < 0,10$) plus grand que *Msin* Malepartus en 2017 (222 cm contre 201 cm) (Tableau 4). Comme pour *M×g*, les hauteurs maximales relevées sur les zones de référence sont légèrement plus faibles que sur les zones de prélèvement : 212 cm, 202 cm, 157 cm et 169 cm respectivement pour *Msin* Goliath en 2016

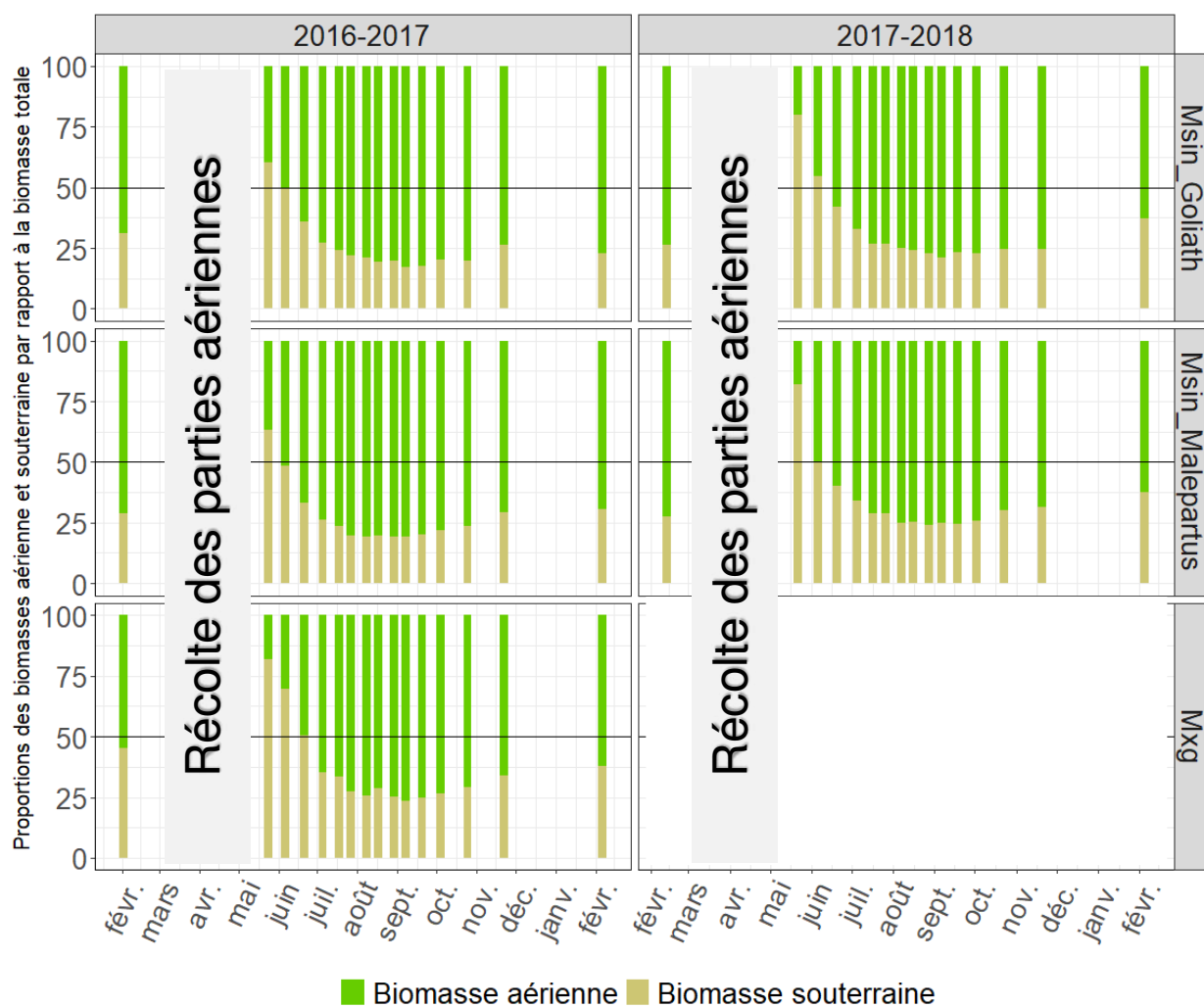


Figure 21. Evolution des proportions des biomasses aérienne et souterraine par rapport à la biomasse totale de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus pendant la troisième (2016) et la quatrième (2017) années de culture

(moyenne de 15 plantes pour les parties aériennes et 9 plantes pour les parties souterraines)

puis 2017, et *Msin* Malepartus (Figure 22). Ces hauteurs correspondent à celles mesurées dans sur des génotypes sauvages de *Msin* (1 m 25 à 2 m 50) (Anzoua *et al.*, 2014 ; Kobayashi et Yokoi, 2017) et décrites dans la taxonomie de Sun *et al.* (2010). La zone de référence était régulièrement suivie chaque semaine donc piétinée au contraire de la zone de prélèvement sur laquelle aucune intervention n'était réalisée avant le prélèvement. Cette différence entre les zones pourrait expliquer les hauteurs légèrement plus petites sur les zones de référence, qui résulterait des piétinements et des manipulations des plantes plus fréquentes. C'est pourquoi nous utiliserons les données de croissance relevées sur la zone de prélèvement dans la suite des chapitres et notamment dans le chapitre 4. Les hauteurs de dernière feuille ligulée mesurées dans notre essai sont un peu plus importantes que celles présentées par Zapater *et al.* (2017) (175-200 cm pour *M×g* et 150-175 cm pour *Msin* Goliath). Elles sont aussi supérieures aux hauteurs de canopée rapportées dans la littérature : de 231 à 300 cm en moyenne pour *M×g* et de 132 à 172 cm en moyenne pour *Msin* lors de la troisième année de culture selon les localisations (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Clifton-Brown et Lewandowski, 2002 ; Arnoult et Brancourt-Hulmel, 2015). Ceci pourrait être expliqué d'une part par le fait que les plantes de notre essai sont effectivement un peu plus grandes que la moyenne des plantes des autres études ; d'autre part, la différence de technique de mesure de hauteur de canopée par rapport à la mesure de la hauteur de dernière feuille ligulée peut également expliquer cette variabilité. En effet, la hauteur de canopée est mesurée par la hauteur du haut de la partie la plus fournie du couvert végétal et il arrive parfois que la dernière feuille ligulée, généralement la feuille étendard, se situe au-dessus de la canopée, surtout en fin de saison de végétation.

Les dynamiques d'évolution du nombre de tiges sont détaillées dans le second chapitre. Elles sont différentes entre espèces (Figure 23) : le nombre de tiges par plante augmente depuis l'émergence mais atteint un plateau rapidement en juin-juillet chez *M×g*, puis diminue, alors qu'il ne cesse de croître pendant la saison végétative chez les *Msin*. Il atteint son maximum en octobre pour *Msin* Malepartus en 2016 et pour *Msin* Goliath les deux années, et en août pour *Msin* Malepartus en 2017. La diminution du nombre de tiges au cours de la saison végétative chez *M×g* a déjà été observée dans la littérature (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Clifton-Brown et Lewandowski, 2002 ; Zapater *et al.*, 2017) et la compétition pour les ressources a été évoquée comme cause de la régression des tiges (Gauder *et al.*, 2012 ; Zapater *et al.*, 2017). L'émission continue de tiges (phénomène d'émission de cohortes) tout au long de la saison végétative chez les *Msin* n'est pas observée dans toutes les études. Ainsi, Clifton-Brown et Lewandowski (2002) observe une fin d'émission de tiges en mai sur le clone

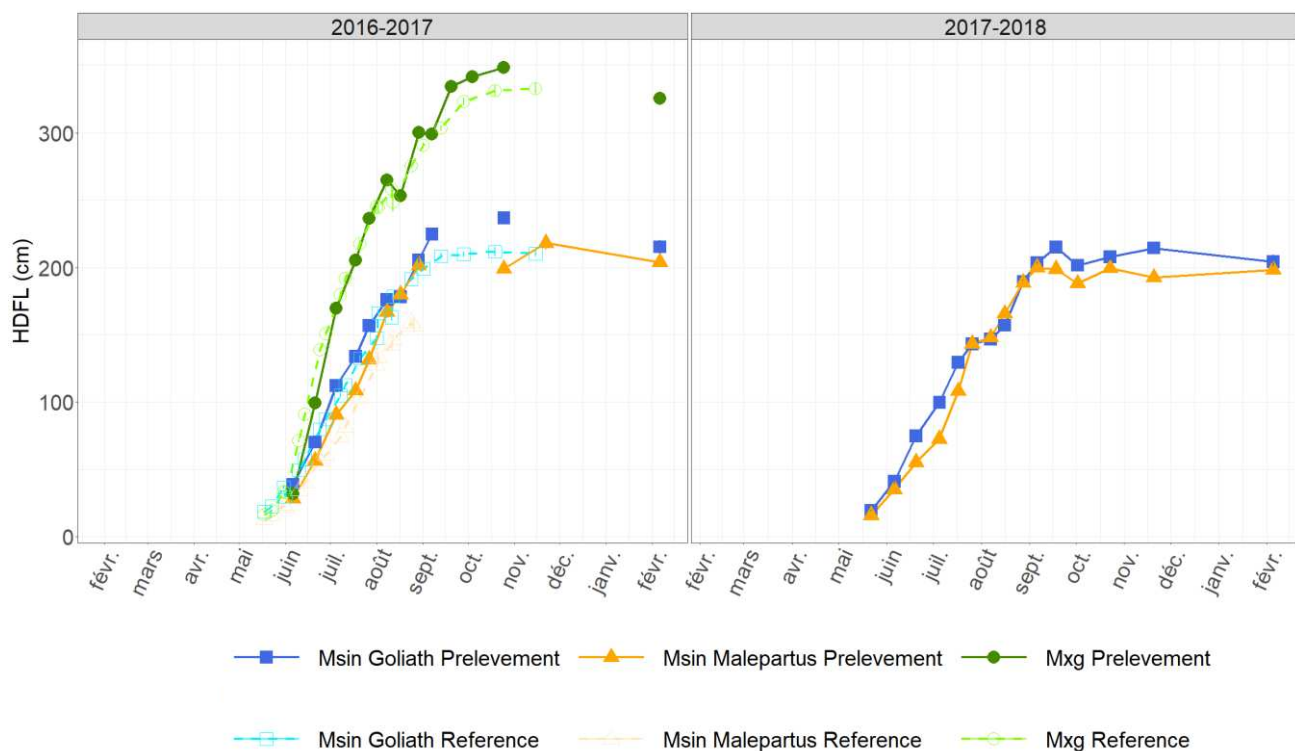


Figure 22. Evolution de la hauteur de la dernière feuille ligulée (HDFL) de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus mesurée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture (moyenne \pm erreur standard)

Tableau 4. Récapitulatif des variables morphologiques de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus déterminées sur la zone de référence (nombre de feuilles) et la zone de prélèvement (nombre de tiges et hauteur de dernière feuille ligulée) pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture (moyenne \pm erreur standard)

Les lettres indiquent les résultats des tests de Tukey appliqués à la comparaison entre génotypes pour une année donnée (A, B, C $p < 0,05$, a, b, c $p < 0,10$)

Génotype	Âge de la culture	Nombre maximal de feuilles par tige	Nombre maximal de tiges par plante	Hauteur maximale de dernière feuille ligulée (cm)
<i>Msin</i> Goliath	3	13 \pm 0,5 B b	85 \pm 5 A a	237 \pm 7 B b
<i>Msin</i> Malepartus	3	11 \pm 0 C c	57 \pm 3 B b	219 \pm 14 B b
<i>M×g</i>	3	21 \pm 0 A a	43 \pm 5 B c	348 \pm 2 A a
<i>Msin</i> Goliath	4	14 \pm 0,5 A a	111 \pm 11 A a	222 \pm 5 A a
<i>Msin</i> Malepartus	4	12 \pm 0 B b	78 \pm 7 B b	201 \pm 3 B b

de *Msin* de leur étude. A noter qu'ils observent le phénomène de cohorte chez l'hybride issu de *Msin* avec un nombre de tiges maximal atteint en juillet. En revanche, Zapater *et al.* (2017) observent ce phénomène sur le même *Msin* Goliath que notre essai et l'émission des cohortes est bien documentée sur des pelouses sauvages de *Msin* (Kobayashi et Yokoi, 2003a ; Kobayashi et Yokoi, 2017). L'augmentation du nombre de tiges chez *Msin* Malepartus pendant la saison végétative semble moins importante que chez *Msin* Goliath. *M×g* et *Msin* Malepartus possèdent un nombre de tiges par plante significativement ($p < 0,05$) plus réduit que *Msin* Goliath (Figure 23, Tableau 4) avec des nombres maxima moyens compris entre 43 et 57 tiges par plante en 2016 et 78 tiges par plante en 2017 pour *Msin* Malepartus. La différence entre les deux *Msin* provient du fait que *Msin* Goliath émet des tiges plus tard dans la saison (après Septembre) par rapport à *Msin* Malepartus d'une part ce qui a pour conséquence un nombre de tige émises tout au long de la saison de végétation plus important chez *Msin* Goliath. Les maxima atteints par *Msin* Goliath sont de 85 à 111 tiges par plante, respectivement en 2016 et 2017. Ce nombre de tiges par plante supérieur chez *Msin* Goliath est dû au développement plus important des différentes cohortes tout au long de la saison végétative.

Ces valeurs correspondent à celles observées dans la littérature sur des génotypes de *Msin* sauvages, avec une moyenne de 50 tiges par plante en troisième année de culture mais avec une variation entre génotypes importante : certains génotypes pouvant porter jusqu'à 250 tiges par plante (Anzoua *et al.*, 2014). Arnoult et Brancourt-Hulmel (2015) rapportent un nombre de tiges par plante moyen un peu supérieur chez les *Msin* (58 tiges par plante) par rapport à *M×g* (49 tiges par plante). La différence entre espèces est également observée dans d'autres études : 101 à 225 tiges m^{-2} chez *Msin* en fonction des localisations (85 à 193 tiges m^{-2} dans notre essai) et 54 à 87 tiges m^{-2} pour *M×g* (42 tiges m^{-2} dans notre essai) (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Zapater *et al.*, 2017).

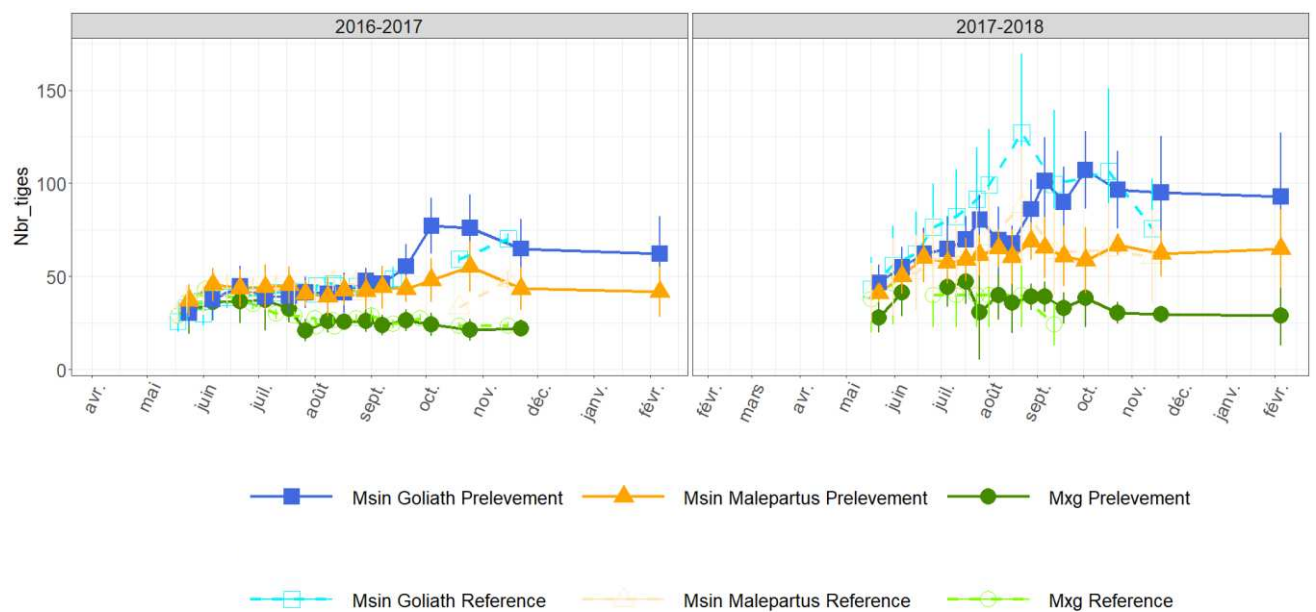


Figure 23. Evolution du nombre de tiges par plante (Nbr_tiges) de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus mesuré sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture (moyenne ± erreur standard)

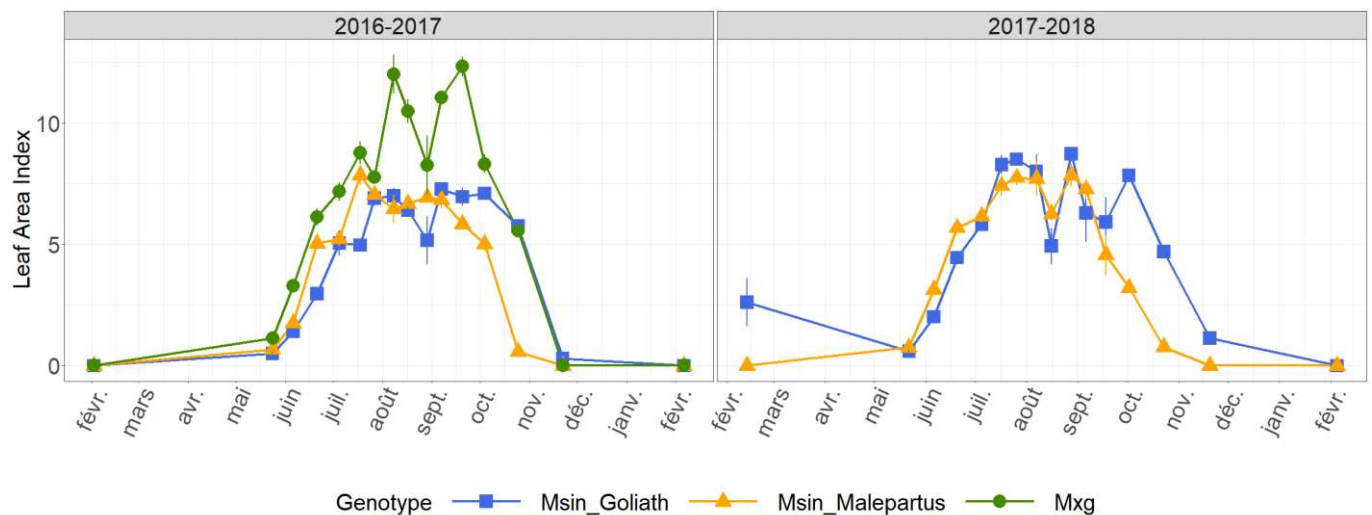


Figure 24. Evolution du *Leaf Area Index* (LAI) de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus durant les deux années de culture calculé d'après les mesures de SLA effectuées au LI-3100C Area Meter (LI-COR®) (moyenne ± erreur standard)

3.1.3. Interception des rayonnements et production de biomasse

Le *Leaf Area Index* (LAI) ($\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$) est une mesure de la surface de feuilles par rapport à une surface de sol donnée. Il peut être mesuré de différentes façons (Bréda *et al.*, 2002) : collecte de litière, analyseur de canopée ou utilisation de la loi de Monsi et Saeki (1953) dérivée de la loi de Beer-Lambert par mesure du rayonnement incident et sous couvert. A l'inverse de ce qui est observé dans les cultures ou les prairies, dans les peuplements forestiers, Bréda *et al.* (2002) soulignent que les mesures indirectes d'indice foliaire tendent à sous-estimer le LAI en raison de la structure discontinue et hétérogène que peut prendre le couvert forestier. Néanmoins, Vargas *et al.* (2002) ont montré que le LAI obtenu grâce aux prélèvements destructifs est fortement corrélé avec le LAI mesuré par un analyseur de canopée dans une culture de *Miscanthus sinensis* « Goliath ». Dans cette étude, le LAI a été mesuré de manière directe *via* la surface des feuilles prélevées lors des différents prélèvements de plante entière, et de manière indirecte *via* l'analyse de rayonnement intercepté.

Concernant les mesures directes, le LAI a été calculé comme suit :

$$\text{LAI} = \text{SLA} * W_{\text{feuilles vertes}} * 100$$

où le SLA correspond à la *Specific Leaf Area* ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$) et est mesuré grâce au LI-3100C Area Meter (LI-COR®) et où $W_{\text{feuilles vertes}}$ est la biomasse des feuilles vertes (kg MS ha^{-1}). Ici, cet index suit la même dynamique pour les trois géotypes étudiés lors des deux années de suivi (Figure 24, Tableau 5) : il augmente du début de la saison jusqu'en juillet-août (phase d'expansion foliaire) avec des valeurs similaires entre géotypes, pour atteindre un plateau où le LAI maximum est significativement ($p < 0,05$) supérieur pour $M \times g$ ($14 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$) par rapport aux deux M_{sin} (entre 8 à $10 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$). Les LAI maximaux relevés pour $M \times g$ dans notre essai sont supérieurs aux valeurs obtenues dans la littérature par mesure directe, et sont comprises entre 6 et 12 en fonction des études considérées (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Tayot *et al.*, 1994 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Strullu *et al.*, 2013 ; Davey *et al.*, 2017) tout comme ceux de M_{sin} Goliath estimés à 4-5 fin août-début septembre (Vargas *et al.*, 2002 ; Davey *et al.*, 2017). Le LAI diminue à partir de septembre pour M_{sin} Malepartus et octobre pour $M \times g$ et M_{sin} Goliath en accord avec la sénescence plus précoce chez M_{sin} Malepartus.

L'efficacité d'interception des rayonnements lumineux (ϵ_i) est calculée comme le ratio entre le PAR intercepté par la culture et le PAR incident. Elle augmente au cours de la saison

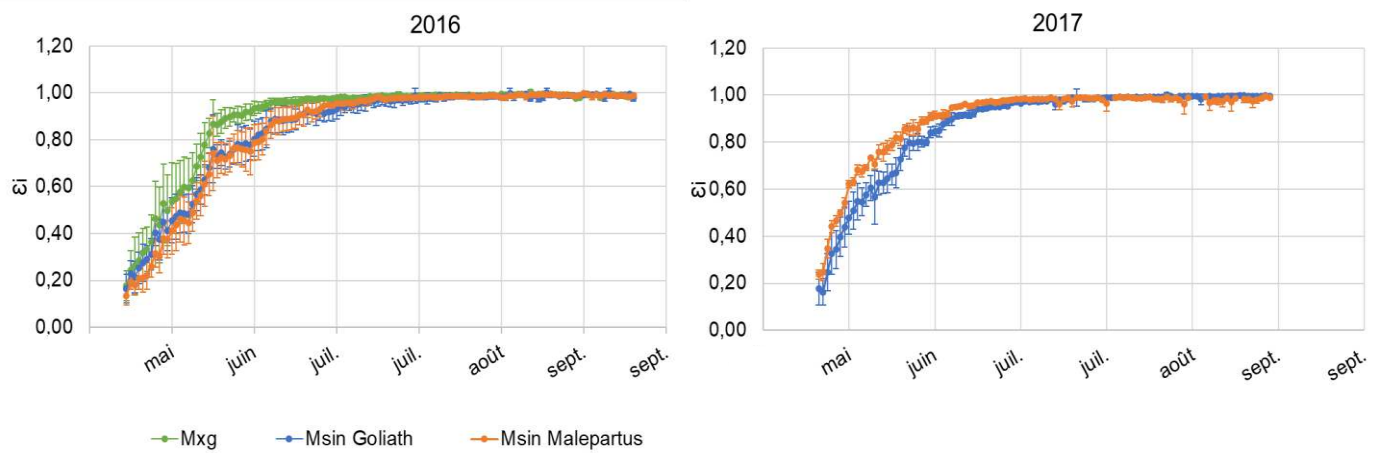


Figure 25. Evolution de l'efficacité d'interception du rayonnement $\bar{\epsilon}_i$ de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus durant les deux années de culture (moyenne \pm erreur standard)

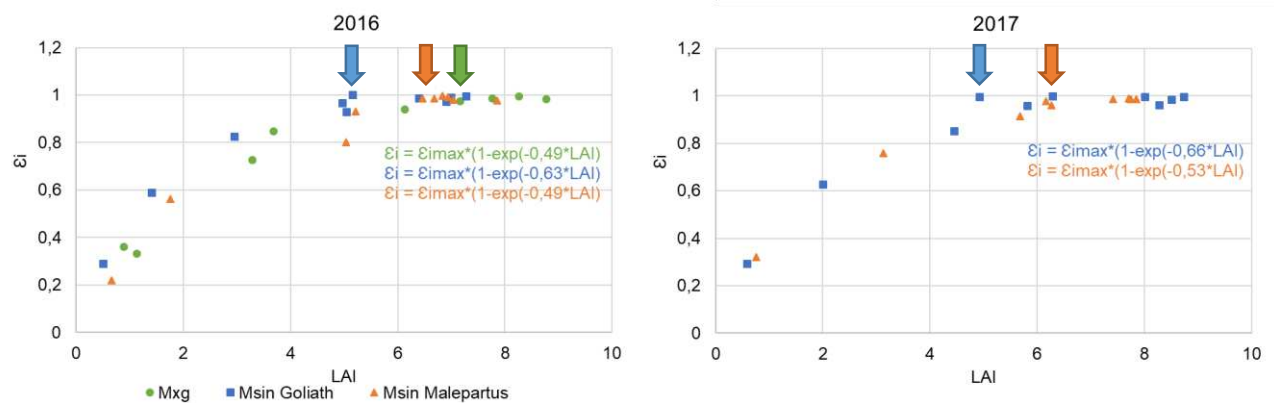


Figure 26. Efficacité d'interception du rayonnement $\bar{\epsilon}_i$ en fonction du *Leaf Area Index* (LAI) permettant de déterminer le coefficient d'extinction de la culture (k) chez *Miscanthus × giganteus* (vert), *Miscanthus sinensis* Goliath (bleu) et *Miscanthus sinensis* Malepartus (orange) durant les deux années de culture.
Les flèches de couleur indiquent le moment où les $\bar{\epsilon}_{i_{max}}$ sont atteints.

végétative pour atteindre un maximum ($\epsilon_{i \max}$) compris entre 0,97 et 1 fin juin (616 DJC) pour *M×g* et début juillet pour les *Msin* (704 à 871 DJC) (Figure 25, Tableau 5). La date d' $\epsilon_{i \max}$ varie en fonction des études en étant plus tardive chez *M×g* (juillet-août) et *Msin* Goliath (août) (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Vargas *et al.*, 2002).

Un LAI environ égal à 5 est suffisant à *Msin* Goliath pour intercepter 100% du rayonnement lumineux alors que pour *M×g* et *Msin* Malepartus le LAI doit être supérieur, respectivement environ de 7 et 6 (Figure 26). Les LAI pour atteindre une $\epsilon_{i \max}$ sont atteints globalement à la même période (juillet) pour les trois génotypes (Figure 26). Le LAI minimum pour intercepté 90% du rayonnement chez *M×g*, soit 5, est similaire à la littérature (3 à 5) (Tayot *et al.*, 1994 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000).

La Figure 26 représente la relation entre ϵ_i et le LAI. Cette relation est modélisée par l'équation de Monsi et Saeki (1953) dérivée de l'équation de Beer-Lambert :

$$\epsilon_i = \epsilon_{i \max} * (1 - \exp(-k * \text{LAI}))$$

où k est le coefficient d'extinction de la culture. Celui-ci dépend de l'architecture de la canopée et du port des feuilles. Ainsi, les herbacées portant des feuilles inclinées verticalement possèdent un faible k (0,3-0,5) et les espèces à port horizontal tendent vers un k égal à 1 (Lambers *et al.*, 2008). Un k élevé est avantageux pour l'interception de la lumière au début de la saison lorsque le LAI et le rayonnement sont faibles ($\text{LAI} < 4$) mais cela peut réduire le taux de photosynthèse de la canopée et l'efficacité d'interception durant les stades de développements plus âgés (Vargas *et al.*, 2002 ; Davey *et al.*, 2017). Dans notre essai, le coefficient d'extinction de *Msin* Goliath compris entre 0,63 et 0,66 est significativement ($p < 0,05$) supérieur à ceux de *M×g* et *Msin* Malepartus compris entre 0,49 et 0,53 (Tableau 5). Les valeurs obtenues pour *Msin* Goliath sont semblables à la littérature et sont typiques d'une culture à canopée planophile (Vargas *et al.*, 2002). En revanche, le coefficient d'extinction k de 0,49 pour *M×g* est inférieur au 0,65 relevé par Davey *et al.*, 2017 mais assez proche du 0,57 estimé par Cosentino *et al.* (2007). Le port des feuilles de *M×g* et *Msin* Malepartus est plus vertical, laissant pénétrer plus de rayonnements vers les strates inférieures de la canopée (Lambers *et al.*, 2008). Le LAI max atteignant 14 pour *M×g* dans notre essai est supérieur à celui rapporté par Clifton-Brown *et al.* (2000) pour des plantes âgées de 4 à 5 ans en Irlande ($\text{LAI}=5$).

Finalement, la RUE ou *Radiation Use Efficiency* ou encore efficacité d'utilisation des rayonnements lumineux, nous permet d'appréhender l'efficacité de conversion du PAR en

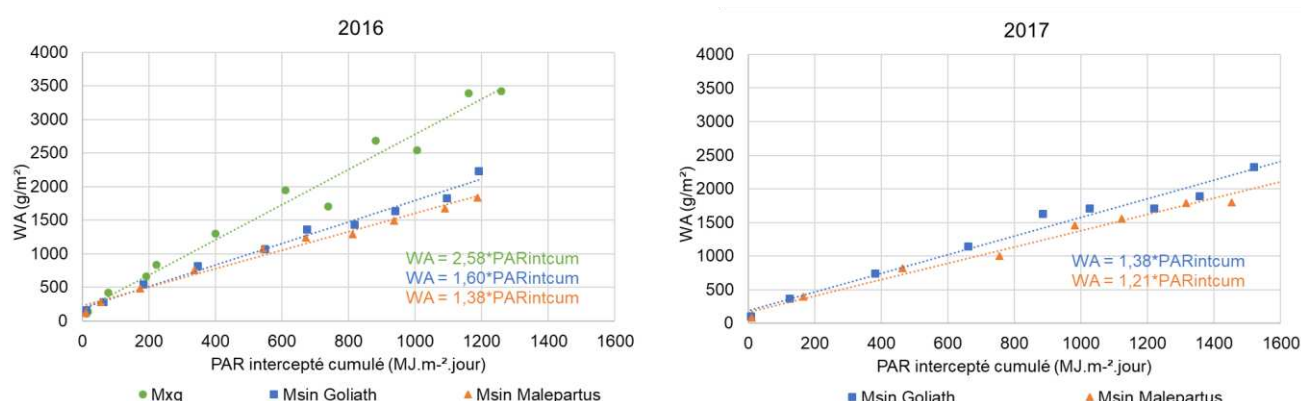


Figure 27. Production de biomasse aérienne en fonction du PAR intercepté permettant de déterminer la RUE (pente de la droite) chez *Miscanthus × giganteus* (vert), *Miscanthus sinensis* Goliath (bleu) et Malepartus (orange) durant les deux années de culture

Tableau 5. Récapitulatif des variables d'interception des rayonnements et de production de biomasse (moyenne \pm erreur standard).

Les lettres indiquent les résultats des tests de Tukey appliqués à la comparaison entre génotypes pour une année donnée (A, B $p < 0,05$, a, b $p < 0,10$)

Génotype	Âge de la culture	RUE	k	LAI maximum	Date (et DJC) pour atteindre $\mathcal{E}_{\text{imax}}$
<i>Msin Goliath</i>	3	$1,60 \pm 0,12$ B b	$0,63 \pm 0,02$ A a	$9 \pm 0,47$ B b	19/07/2016 (871 ± 167) A a
<i>Msin Malepartus</i>	3	$1,38 \pm 0,05$ B b	$0,49 \pm 0,04$ B b	$8 \pm 0,82$ B b	16/07/2016 (826 ± 129) A a
<i>Mxg</i>	3	$2,58 \pm 0,12$ A a	$0,49 \pm 0,02$ B b	$14 \pm 1,25$ A a	28/06/2016 (616 ± 83) B b
<i>Msin Goliath</i>	4	$1,38 \pm 0,09$ A a	$0,66 \pm 0,11$ A a	$10 \pm 0,47$ A a	8/07/2017 (794 ± 25) A a
<i>Msin Malepartus</i>	4	$1,21 \pm 0,18$ A b	$0,53 \pm 0,03$ B b	$9 \pm 0,47$ A a	2/07/2017 (704 ± 21) A a

biomasse (Gosse *et al.*, 1986 ; Davey *et al.*, 2017). En effet, elle correspond à la pente de la droite de la relation linéaire entre la biomasse aérienne produite en fonction du PAR intercepté cumulé (Figure 27) (Gosse *et al.*, 1986). Le PAR intercepté cumulé correspond au cumul des PAR intercepté journaliers. La RUE de $M \times g$ est significativement supérieure ($p < 0,05$) ($2,58 \text{ g MJ}^{-2}$) à celle des deux $Msin$ ($1,21-1,60 \text{ g MJ}^{-2}$). Les valeurs correspondent à la littérature avec une RUE comprise entre 2,3 et 4 g MJ^{-2} pour $M \times g$ et 1,66 et 1,90 g MJ^{-2} pour $Msin$ Goliath (Van der Werf *et al.*, 1993 ; Tayot *et al.*, 1994 ; Clifton-Brown *et al.*, 2000 ; Vargas *et al.*, 2002 ; Strullu *et al.*, 2013 ; Davey *et al.*, 2017) (Tableau 5).

3.1.4. Cycle de croissance et développement

L'émergence, notée lorsque 50% des plantes suivies possède au moins un bourgeon, a lieu à la même période pour les trois génotypes. En 2016, elle a été observée le 5 avril et à la fin du mois de mars en 2017. Cependant, un gel important a détruit les jeunes tiges au début du mois d'avril (Figure 9) et une seconde émergence a été observée le 23 avril 2017. C'est cette dernière date qui est utilisée pour le calcul des temps thermiques en 2017.

Les dates où 50% des plantes suivies ont développé leur feuille étendard ou ont développé une panicule, sur la zone de prélèvement et la zone de référence, sont présentées dans le Tableau 6.

La feuille étendard, où dernière feuille ligulée émise avant l'épiaison, est un signe précurseur de la floraison (Jensen *et al.*, 2017). La feuille étendard apparaît d'abord chez $Msin$ Malepartus fin juillet début août (entre 1009 et 1141 DJC), puis chez $Msin$ Goliath dans le courant du mois d'août (entre 1336 et 1371 DJC) et enfin chez $M \times g$ fin septembre-début octobre (entre 1697 et 1896 DJC). Sur la zone de référence, la date d'apparition de la feuille étendard est semblable entre années pour les $Msin$ mais est plus précoce en 2016 qu'en 2017 pour $M \times g$. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la croissance de la tige ne s'arrête pas lorsque la dernière feuille ou feuille étendard est émise : en effet, nous avons observé que chez $Msin$ Malepartus la tige croît encore de 50 cm après l'émission de la feuille étendard au début du mois d'août atteignant sa taille maximale un mois plus tard (Figure 22, Tableau 6). C'est également le cas pour $Msin$ Goliath dont la taille maximale est de 60 cm supérieure à celle lors de l'émission de la feuille étendard contrairement à $M \times g$ dont la date d'émission de la feuille étendard est proche de celle de la hauteur maximale de la dernière feuille ligulée (Figure 22, Tableau 6).

Tableau 6. Date d'apparition de la feuille étendard (FE) et de la sortie des panicules (SPan), ainsi que la durée en degrés jours cumulés entre la FE et la SPan (FE -> SPan) chez *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus notée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture
nr : non relevée

Génotype	Âge de la culture	Zone de prélèvement					Zone de référence				
		Feuille étendard (FE)		Sortie des Panicules (SPan)		FE -> SPan	FE		SP _{an}		FE -> SP _{an}
		Date	Temps thermique (DJC)	Date	Temps thermique (DJC) (TT_SPan)	Temps thermique (DJC)	Date	Temps thermique (DJC)	Date	Temps thermique (DJC) (TT_SPan)	Temps thermique (DJC)
<i>Msin</i> Goliath	3	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	24/08/2016	1336	19/10/2016	1896	560
<i>Msin</i> Malepartus	3	<i>nr</i>	<i>nr</i>	24/08/2016	1336	<i>nr</i>	01/08/2016	1053	24/08/2016	1336	283
<i>M×g</i>	3	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	<i>nr</i>	19/10/2016	1896	15/11/2016	1957	61
<i>Msin</i> Goliath	4	22/08/2017	1355	28/09/2017	1716	361	23/08/2017	1371	26/09/2017	1697	326
<i>Msin</i> Malepartus	4	24/07/2017	1009	22/08/2017	1355	346	03/08/2017	1141	31/08/2017	1485	344

Nous avons relevé la date de sortie de panicules pour approximer la floraison qui a lieu en moyenne 5 à 6 jours après la sortie des panicules chez *Msin* (Hou *et al.*, submitted). En effet, la floraison marque la fin de la croissance possible des parties aériennes (Guiboileau *et al.*, 2010). Elle intervient chaque année chez le miscanthus, excepté pour quelques génotypes comme *M×g* qui ne fleurit pas toujours en fonction de la localisation et des années (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Clifton-Brown *et al.*, 2002). Comme de nombreuses plantes pérennes celui-ci est polycarpique, c'est-à-dire qu'il peut réaliser plusieurs floraisons successives sans engendrer la mort de la plante totale après chaque floraison comme c'est le cas chez les herbacées monocarpiques (Crowley et Wingler, 2020). La floraison dépend également des localisations puisqu'elle intervient chez les *Msin* en juin au Portugal et en juillet au Royaume-Uni, de manière plus précoce que dans notre expérimentation (fin août à mi-octobre), comme pour le *M×g* où elle n'intervient qu'au Portugal en septembre, 1 à 2 mois plus tôt que dans notre essai (Clifton-Brown *et al.*, 2001). Une autre expérimentation au Royaume-Uni a montré que lors de la troisième année de culture 81% des plantes de *M×g* portaient plus de 50% de tiges fleuries, alors qu'en cinquième année, ce n'était le cas que de 6% des plantes (Jensen *et al.*, 2011). Dans notre essai, la floraison est plus précoce en 2017 qu'en 2016 chez *M×g* et *Msin* Goliath et un peu plus tardive pour *Msin* Malepartus. Ainsi, les temps thermiques n'étant pas les mêmes pour un même génotype pour atteindre la floraison, celle-ci ne semble donc pas être liée uniquement aux températures. La floraison chez le miscanthus est sous contrôle génétique, mais également liée aux températures et à la photopériode, dont l'optimum est variable en fonction des génotypes, et notamment de la latitude (Jensen *et al.*, 2015 ; Nunn *et al.*, 2017 ; Dong *et al.*, 2021 ; Hou *et al.*, submitted). Il faut toutefois noter que Kobayashi et Yokoi (2017) et Nunn *et al.* (2017) suggèrent que chez *Msin* la floraison n'est pas liée aux températures. La photopériode nécessaire pour la floraison varie en fonction de l'origine des génotypes : les *Msin* hors des tropiques fleurissent grâce à une photopériode de 12,5 heures/jour alors que ceux originaires des latitudes subtropicales et tempérées préfèrent une photopériode plus longue de 15 heures/jour (Dong *et al.*, 2021). D'ailleurs, une photopériode de 12,5 heures/jour induit chez les génotypes issus des zones tempérées, une inhibition de la floraison mais une émission de petites tiges vertes qui stoppent leur développement rapidement (Dong *et al.*, 2021).

Les dates de d'apparition de la feuille étendard et de la sortie de panicules étant similaires entre zones en 2017 et les dates n'ayant pas été notées sur la zone de prélèvement en 2016, nous utiliserons les dates relevées sur la zone de référence 2016 pour la zone de prélèvement 2016. L'ordre de sortie des panicules chez les trois génotypes est le même que



Figure 28. Evolution de la partie nord du dispositif durant la quatrième (2017) année de culture.

Sur les photos, à gauche *Msin* Malepartus, au milieu *Msin* Goliath et à droite *Mxg*.
(Source : INRAE)

celui de la feuille étandard. La sortie des panicules est plus précoce chez *Msin* Malepartus et intervient à la fin du mois d'août (1336 à 1485 DJC), puis vient celle de *Msin* Goliath fin septembre-début octobre (1697 à 1896 DJC) et enfin celle de *M×g* intervenant sur quelques tiges mais pas l'ensemble d'octobre à novembre (1770 à 1957 DJC). Le temps thermique pour atteindre la sortie des panicules des *Msin* dans notre essai est plus importante que celle de la littérature car elle est calculée sur une température de base de 6°C. La température de base de 6°C a été choisie sur la base des résultats de Clifton-Brown et Jones (1997) et Clifton-Brown et Jones (1999) qui montrent que l'expansion des feuilles est visible dès 6°C. Cette même température de base est également utilisée par Tayot *et al.* (1994) et Tejera *et al.* (2021). D'autres auteurs ont préféré prendre une température de base de 10°C (Numata et Mitsudera, 1969 cité par Stewart *et al.*, 2009 ; Shoji *et al.*, 1990). Avec une température de base de 10°C, le temps thermique pour atteindre l'épiaison est comprise entre 760 DJC et 900 DJC sur notre essai. Le nombre de jours pour atteindre l'épiaison chez un groupe de 33 génotypes de *Msin* collectés au Japon varie entre 120 et 180 jours (Anzoua *et al.*, 2014) correspondant aux 120 à 197 jours de notre essai pour les deux *Msin*. Si nous recalculons les temps thermiques sur une base de 10°C, la date de sortie des panicules des *Msin* intervient entre 816 DJC et 1162 DJC, ce qui est en accord avec la littérature. Les écarts entre les dates de sortie des panicules et de la floraison entre les trois génotypes de notre expérimentation sont illustrés sur les photographies de la Figure 28. Nous avons calculé la durée en DJC séparant l'apparition de la feuille étandard de la sortie des panicules pour voir la rapidité à laquelle les génotypes passent de l'état végétatif (production de parties aériennes) à l'état reproductif (production des parties reproductives). Sur la zone de référence, il apparaît que la durée séparant l'apparition de la feuille étandard de la sortie des panicules est plus longue chez *Msin* Goliath en 2016 (560 DJC) que chez *Msin* Malepartus (283 DJC) et *M×g* (61 DJC). En 2017, les durées sont semblables entre les deux *Msin* entre 326 et 361 DJC sur les deux zones de suivi.

Chez le miscanthus, la sénescence s'opère du bas des tiges vers le haut des tiges. Nous avons suivi l'évolution de la sénescence en mesurant les proportions de hauteurs de tiges sénescences par rapport à la hauteur totale de plante. Ces suivis ont été menés à la fois sur les zones de prélèvement afin de pouvoir relier le développement de la plante aux variables mesurées, et sur les zones de référence, afin de pouvoir suivre les cinétiques de sénescence sur des mêmes plantes de manière assez fine, en fin d'automne et en hiver alors que les prélèvements de plantes s'espaciaient. Nous avons choisi de travailler avec deux indicateurs de sénescence :

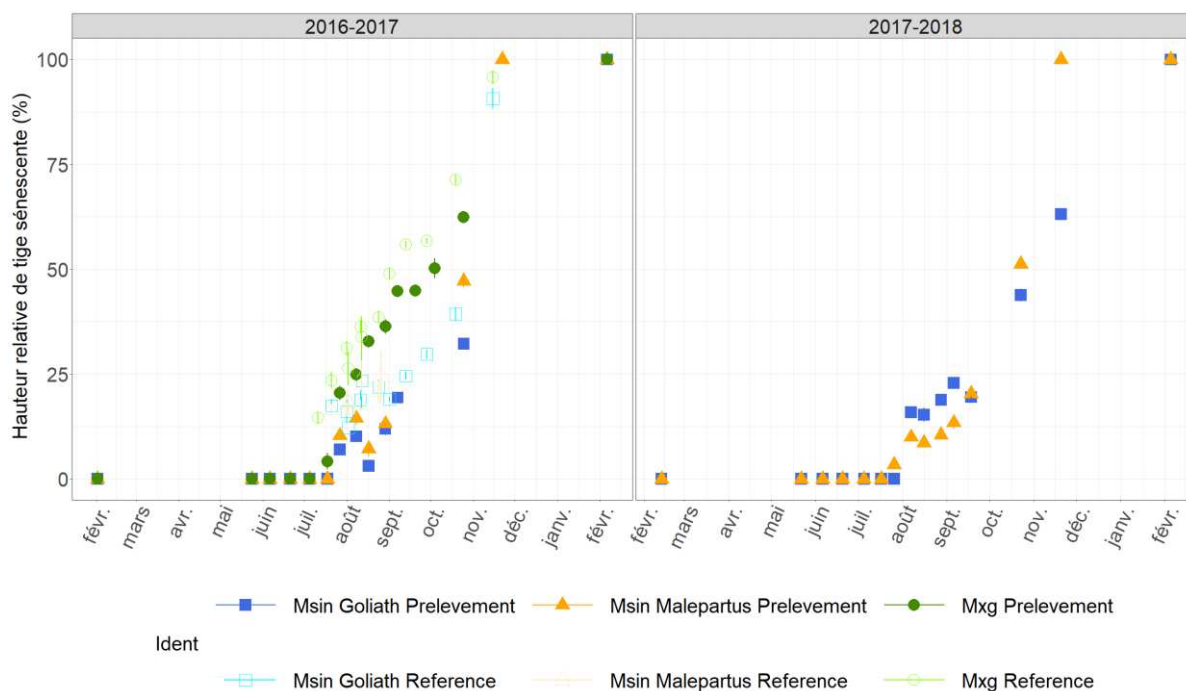


Figure 29. Evolution de la hauteur relative de tige sénescence de première cohorte de *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus calculée sur la zone de prélèvement et sur la zone de référence pendant la troisième (2016) et quatrième (2017) années de culture (moyenne ± erreur standard)

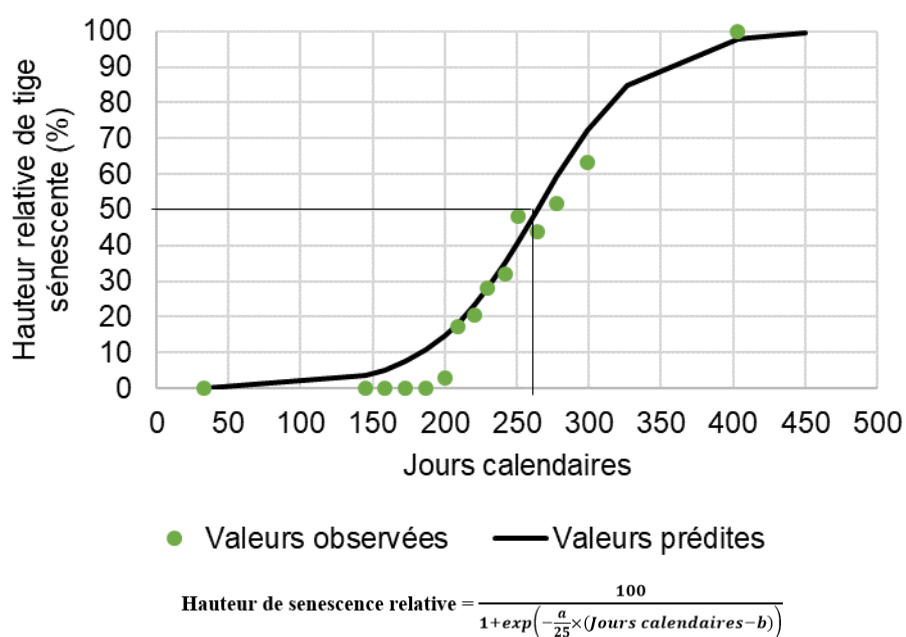


Figure 30. Exemple de modélisation de courbe sigmoïde de la hauteur relative de tige sénescence de première cohorte chez *Miscanthus × giganteus* bloc 3 en 2016 pour déterminer la date où 50% de la hauteur de tige est sénescence (équivalent à b dans l'équation)

- la date à laquelle 50% de la hauteur de tige était sénescence ; cet indicateur est issu de la modélisation de la hauteur relative de sénescence observée sur la zone de prélèvement selon l'équation suivante (Figure 30) :

$$\text{Hauteur de senescence relative} = \frac{100}{1 + \exp\left(-\frac{a}{25} \times (\text{Jours calendaires} - b)\right)}$$

où b est égal à la date en jours calendaires à laquelle la proportion de hauteur de tige sénescence est égale à 50%.

- La date de sénescence totale (100%) à laquelle les tiges sont complètement sénescences pour déterminer une fin de saison de végétation. Cet indicateur correspond à l'observation de la date à laquelle nous observons 50% des plantes qui sont complètement sénescences. A noter que le pas de temps entre deux dates de notations a été optimisé en 2017 : en effet, en 2016 les dates d'observations correspondaient aux dates de prélèvement. Etant donné qu'à l'automne les prélèvements s'espaçaient, nous avons en 2016 un pas de temps de 2 à 3 semaines entre deux observations, bien trop long pour mettre en évidence une date précise. En 2017, nous avons réduit ce pas de temps en mettant en place un suivi hebdomadaire de la sénescence sur la zone de référence.

Les dynamiques de hauteur de sénescence relative des tiges de première cohorte sont différentes entre géotypes (Figure 29). Les premières observations de sénescence apparaissent dès la mi-juillet (Figure 29). A cette période, la hauteur de tige sénescence est assez faible (Figure 29), et traduit probablement le phénomène de « sénescence séquentielle ». Ce phénomène est lié à l'auto-ombrage des feuilles entre elles et la compétition pour les ressources entre les feuilles basses et les feuilles jeunes, qui correspond à la remobilisation des nutriments des feuilles d'ombre, c'est-à-dire celles du bas des tiges, pour les transloquer vers les feuilles plus jeunes au sommet de la canopée (Guiboileau *et al.*, 2010 ; Crowley et Wingler, 2020). Cette sénescence ne correspond pas à la remobilisation des nutriments pour du stockage à long terme. Ainsi, les premiers 20% de hauteur de tiges sénescence ne traduisent pas le phénomène de sénescence automnale. La dynamique de progression de la sénescence (vitesse) au-delà de ces 20% est semblable entre géotype jusqu'à 50 ou 60% de sénescence, mais décalée dans le temps : le stade « 50% de la hauteur de tige de première cohorte est sénescence » intervient un peu plus précocement chez *Mxg* fin septembre, que les *Msin* à la fin du mois d'octobre (Tableau 7). Au-delà de ces 50-60% de hauteur de tige sénescence, alors que la progression du phénomène se maintient à vitesse constante chez le *Mxg*, elle s'accélère chez les *Msin*, en raison

Tableau 7. Date et temps thermique du stade « 50% de hauteur relative de tige sénescence de première cohorte » et du moment où les tiges de première cohorte sont totalement sénescentes

Les lettres indiquent les résultats des tests de Tukey appliqués à la comparaison entre géotypes pour une année donnée (A, B $p < 0,05$, a, b $p < 0,10$)

Géotype	Âge de la culture	50% de hauteur relative de tige sénescence de première cohorte		Tiges de première cohorte totalement sénescentes	
		Temps thermique		Temps thermique	
		Date	(DJC) (Senes_50_TT)	Date	(DJC) (Senes_100_TT)
<i>Msin Goliath</i>	3	31/10/2016	1944 B b	22/11/2016	1984
<i>Msin Malepartus</i>	3	26/10/2016	1917 B b	22/11/2016	1984
<i>M×g</i>	3	26/09/2016	1763 A a	22/11/2016	1984
<i>Msin Goliath</i>	4	06/11/2017	1975 A a	22/11/2017	2000
<i>Msin Malepartus</i>	4	23/10/2017	1920 B b	4/11/2017	1971

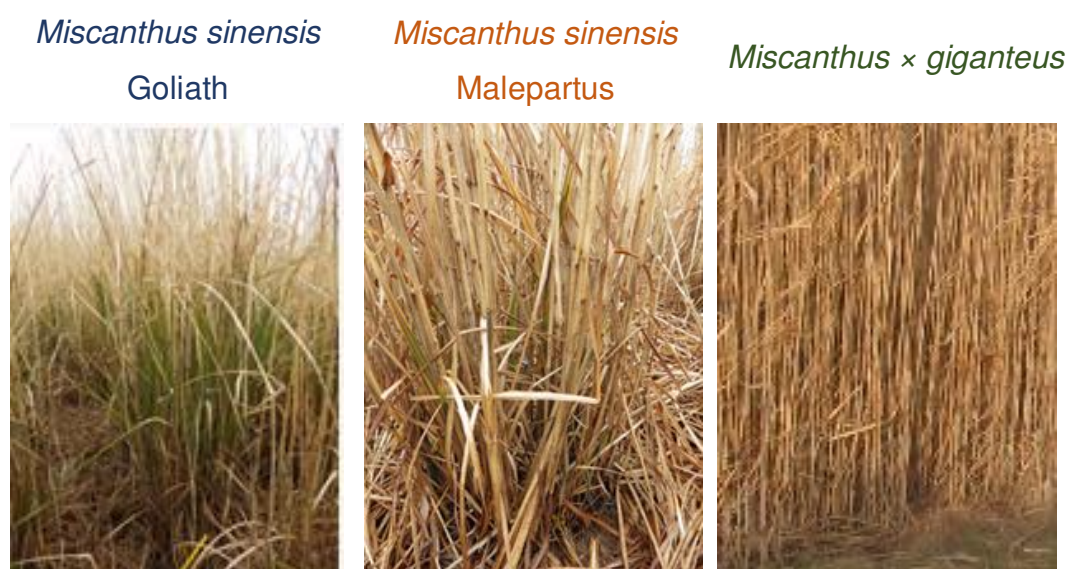


Figure 31. Parties aériennes présentant des tiges restées vertes correspondant à une cohorte tardive chez les *Miscanthus sinensis* Goliath (à gauche) et Malepartus (au milieu) en janvier 2018, non présente chez *Miscanthus x giganteus* (à droite)
(Source : INRAE – Julie LEROY)

de températures plus froides, pour atteindre la sénescence totale début novembre chez le Malepartus et fin novembre chez *Msin* Goliath et *M×g*.

La date à laquelle les génotypes atteignent 50% de hauteur de sénescence, indicatrice de la période active de sénescence pour les plantes, diffèrent significativement entre *M×g* (fin septembre en 2016) et les deux *Msin* (fin octobre en 2016). Ainsi en septembre, la proportion de tige sénescence chez *M×g* est de 45-50%, ce qui est bien plus important que chez les *Msin* pour lesquels elle ne représente que 13 à 25% lors des deux années de culture. Cette sénescence plus précoce chez *M×g* par rapport aux *Msin* est également observée dans la littérature (Robson *et al.*, 2012). L'évolution des profils de sénescence ne semble pas différer entre années pour un même génotype.

Malgré les limites méthodologiques sur les observations de dates de sénescence totale en 2016 citées ci-dessus, nous pouvons voir que tous les génotypes ont totalement sénescence à la fin du mois de novembre. En revanche, le suivi rapproché des plantes en 2017 nous a permis de distinguer nos 3 génotypes et de mettre en évidence une date plus précoce pour *Msin* Malepartus (début novembre) que pour les deux autres (fin novembre).

Une autre différence notable entre espèces concerne la sénescence de l'ensemble des tiges (toutes cohortes confondues) en janvier : alors que la totalité des tiges de *M×g* issue d'une seule cohorte est totalement sénescence, une partie des tiges des cohortes tardives des *Msin* est restée encore verte (Figure 31). Ces tiges qui possèdent encore des feuilles vertes chez les *Msin* sont également observées dans d'autres expérimentations et en milieu naturel et leur occurrence et persistance dépendent des températures hivernales (Kobayashi and Yokoi, 2003 ; Stewart *et al.*, 2009 ; Robson *et al.*, 2012). En effet, celles-ci ne sont pas observées lors d'hivers plus froids. Ces dernières, qui restent plus petites que celles des premières cohortes qui sont sénescences, présentent une meilleure capacité pour passer l'hiver (Kobayashi and Yokoi, 2003).

La durée de saison de végétation calculé par Clifton-Brown *et al.* (2000) sur une température de base de 10°C est comprise entre 494 et 781 DJC pour du *M×g* en Irlande, plus courte que dans notre essai (1178 DJC, sur une base de 10°C). Les degrés jours cumulés pour atteindre la sénescence totale chez du *M×g* déterminés selon une température de base de 6°C par Tejera *et al.* (2021) (3000 DJC) est plus importante que sur notre essai (1984).

En résumé, M×g, Msin Goliath et Msin Malepartus sont trois génotypes très contrastés en terme de morphologie, de croissance et de développement, ainsi qu'en terme d'utilisation des rayonnements lumineux. M×g produit le plus de biomasse aérienne, est le plus haut des trois génotypes mais avec le plus petit nombre de tiges. Il présente également la plus forte RUE. Les deux Msin présentent une hauteur de dernière feuille ligulée inférieure à M×g mais équivalente entre eux. Le nombre de tiges des Msin est supérieur à celui de M×g, avec plus de tiges dénombrées chez Msin Goliath que chez Msin Malepartus, en raison d'une période d'émission de tiges plus longue chez Msin Goliath que chez Msin Malepartus. Tout comme les parties aériennes des deux espèces diffèrent en terme de morphologie et de structure, les parties souterraines se distinguent entre les génotypes : les deux Msin présentent de plus petits rhizomes, mais alors que la profondeur d'enracinement de Msin Malepartus est limitée aux deux premiers mètres, Msin Goliath et M×g présentent encore de nombreuses racines jusqu'à 3m de profondeur (culture de 4 ans). Concernant le cycle de développement, alors que l'émergence a lieu à la même période pour les trois génotypes étudiés, les cycles de croissance sont différents. Msin Malepartus présente le cycle de croissance le plus court avec l'apparition de la feuille étendard, la sortie de panicule et la sénescence complète des tiges de première cohorte les plus précoces. Msin Goliath et M×g présentent des cycles de croissance assez équivalents en terme de durée, mais M×g entre en sénescence active un mois plus tôt que les Msin. De plus, toutes les tiges de première cohorte de Msin Goliath atteignent la floraison alors que ce n'est pas toujours le cas pour les tiges de M×g. Finalement, la présence de tiges de cohortes émises tardivement et qui restent encore vertes pendant l'automne, voire même pendant l'hiver, chez les Msin suggère une remobilisation automnale différente des nutriments par rapport à M×g.

Chapitre 2 : Fonctionnement azoté de *Miscanthus* × *giganteus* et *Miscanthus sinensis*

Suite au premier chapitre montrant que les caractéristiques morphologiques et la croissance étaient variables entre géotypes, notre prochain objectif est de caractériser le fonctionnement azoté de ceux-ci. Ce chapitre constitue un premier article qui a été soumis en janvier 2021 au journal BioEnergy Research, consultable actuellement sous forme de Preprint.

BioEnergy Research

Miscanthus sinensis is as efficient as Miscanthus × giganteus for nitrogen recycling in spite of smaller N fluxes

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Miscanthus sinensis is as efficient as Miscanthus × giganteus for nitrogen recycling in spite of smaller N fluxes	
Article Type:	SI: Biomass For the Future: Miscanthus and sorghum for new end-uses in Fran	
Keywords:	Perennial crop; lignocellulosic biomass crop; nitrogen fluxes; nitrogen uptake; nitrogen losses; Nitrogen Use Efficiency	
Corresponding Author:	Marion Zapater INRAE Hauts-de-France: Institut National de Recherche pour l'Agriculture l'Alimentation et l'Environnement Hauts-de-France Péronne cedex, FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	INRAE Hauts-de-France: Institut National de Recherche pour l'Agriculture l'Alimentation et l'Environnement Hauts-de-France	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Julie Leroy	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Julie Leroy	
	Fabien Ferchaud	
	Catherine Giauffret	
	Bruno Mary	
	Laura Fingar	
	Emilie Mignot	
	Stephanie Arnoult	
	Servan Lenoir	
	Damian Martin	
	Maryse Brancourt-Hulmel	
	Marion Zapater	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-11-BTBR-0006-BFF)	Not applicable

***Miscanthus sinensis* is as efficient as *Miscanthus × giganteus* for nitrogen recycling in spite of smaller N
fluxes**

List of authors

J. Leroy¹, F. Ferchaud², C. Giauffret¹, B. Mary², L. Fingar¹, E. Mignot³, S. Arnoult³, S. Lenoir¹,
D. Martin¹, M. Brancourt-Hulmel¹, M. Zapater*¹

¹BioEcoAgro Joint Research Unit, INRAE, Université de Liège, Université de Lille, Université de Picardie Jules Verne, 80200 Estrées-Mons, France

²BioEcoAgro Joint Research Unit, INRAE, Université de Liège, Université de Lille, Université de Picardie Jules Verne, 02000 Laon, France

³INRAE, UE0972 GCIE-Picardie, Estrées-Mons, F-80203 Péronne, France

*Corresponding author : marion.zapater@inrae.fr, Tel + 33(0)3 22 85 33 32

Résumé

Le recyclage de l'azote (N) est un mécanisme clé pour assurer la durabilité de la production de miscanthus en utilisant peu ou pas de fertilisation, mais les connaissances à ce sujet concernent surtout *Miscanthus × giganteus*, principal hybride actuellement cultivé pour la production de biomasse. L'essai présenté dans cet article a quantifié la biomasse et les dynamiques de stock d'azote chez *Miscanthus × giganteus* et *Miscanthus sinensis* pendant deux années de culture au champs. Les flux endogènes d'azote, calculés comme la différence entre les quantités d'azote au sein des plantes au cours de la saison de végétation, sont plus importants chez *Miscanthus × giganteus* que chez *Miscanthus sinensis*. En effet, 79 kg N ha⁻¹ et 105 à 197 kg N ha⁻¹ sont remobilisés respectivement des parties souterraines au printemps et des parties aériennes à l'automne chez *Miscanthus × giganteus*, contrairement aux 13 à 25 kg N ha⁻¹ et 46 à 128 kg N ha⁻¹ pour *Miscanthus sinensis*. Cependant, leurs efficacités de recyclage, définies comme le ratio entre les flux de remobilisation de l'azote et la quantité d'azote maximale des parties aériennes, ne diffèrent pas significativement. Elles varient de 8 à 27% pour la remobilisation printanière et de 63 à 74% et 24 à 38% pour la remobilisation automnale calculée respectivement sur les stocks d'azote des parties aériennes et souterraines. L'azote exogène, qui est la source principale d'azote pour constituer le stock d'azote maximal de la plante entière pour tous les génotypes étudiés, est fourni par la fertilisation (22 à 24%) et la minéralisation de la matière organique ou d'autres sources (43 à 59%). 50 à 56% de la quantité d'azote contenu dans la plante entière est perdu pendant l'hiver. La perte des feuilles constitue une perte supplémentaire de 6 à 12%. Nos résultats montrent que *Miscanthus sinensis* est aussi efficient en terme de fonctionnement azoté que *Miscanthus × giganteus* ainsi que d'autres espèces végétales pérennes.

Abstract

Nitrogen (N) recycling is a key mechanism to ensure the sustainability of miscanthus production with no or small fertiliser inputs, but little is known on the subject in miscanthus species other than the most cultivated *Miscanthus × giganteus*. This field experiment on *Miscanthus × giganteus* and *Miscanthus sinensis* quantified plant biomass and N stock dynamics during two years. Endogenous net N fluxes, calculated by the difference in plant N content throughout time, were higher in *Miscanthus × giganteus* than in *Miscanthus sinensis*. Indeed, 79 kg N ha⁻¹ and 105 to 197 kg N ha⁻¹ were remobilized during spring and autumn respectively for *Miscanthus × giganteus*, as opposed to 13 to 25 kg N ha⁻¹ and 46 to 128 kg N ha⁻¹ for *Miscanthus sinensis*. However, their N recycling efficiency, defined as the ratio between N remobilisation fluxes and the maximum above-ground N content, did not differ significantly. It ranged from 8 to 27% for spring remobilisation and from 63 to 74% and 24 to 38% for autumn remobilisation calculated on above-ground and below-ground N respectively. Exogenous N, the main source of N to constitute maximum plant N content for all genotypes, was provided by fertilisation (22 to 24%) and organic matter mineralisation or other sources (43 to 59%). During winter, 50 to 56% of plant N content was lost. Abscised leaves constituted an additional loss of 6 to 12%. Our results show that *Miscanthus sinensis* is as efficient as *Miscanthus × giganteus* and as performant as other perennial species concerning N functioning.

Mots-clés

Plante pérenne, culture dédiée à la production de biomasse lignocellulosique, flux d'azote, absorption d'azote, pertes d'azote, efficacité d'utilisation d'azote

Keywords

Perennial crop, lignocellulosic biomass crop, nitrogen fluxes, nitrogen uptake, nitrogen losses, nitrogen use efficiency

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge all the persons who participated in the work: Marie-Chantal Mansard, Marie Heumez, Stéphanie Lavette, Tiffany Trevaux, David Lanterne, Julia Deschamps, Mathilde Goutin. We would also like to thank Gregory's team who warmly welcomed us to carry out the dosages of interest molecules and particularly Salem who also participated to the grinding. Finally, we wish to thank Andrea Rau for her precious help.

Abbreviations

AP: Above-ground Parts

BP: Below-ground Parts

DM: Dry Matter

M×g: *Miscanthus × giganteus*

Msin: *Miscanthus sinensis*

Msin Goliath: *Miscanthus sinensis* Goliath

Msin Malepartus: *Miscanthus sinensis* Malepartus

N: Nitrogen

Ndff: Plant N content derived from fertiliser (kg N ha⁻¹)

Nother: N uptake by the plant not derived from fertiliser (kg N ha⁻¹)

Nrec: proportion of fertiliser-N recovered in the plant (%)

NUE: Nitrogen Use Efficiency (kg DM kg⁻¹ N)

NA: N content of the above-ground parts (kg N ha⁻¹)

NA_1 : N content of the above-ground parts when N content in the below-ground parts is minimal (kg N ha^{-1})

NA_2 : Maximum N content of the above-ground parts (kg N ha^{-1})

NA_3 : N content of the above-ground parts when N content in the whole plant is maximal (kg N ha^{-1})

NA_4 : N content of the above-ground parts when N content in the below-ground parts is maximal (kg N ha^{-1})

NA_5 : N content of the above-ground parts in February of year $n+1$ (kg N ha^{-1})

NB : N content of the below-ground parts (kg N ha^{-1})

NB_0 : N content of the below-ground parts in February of year n (kg N ha^{-1})

NB_1 : Minimum N content of the below-ground parts (kg N ha^{-1})

NB_2 : N content of the below-ground parts when N content of the above-ground parts is maximal (kg N ha^{-1})

NB_3 : N content of the below-ground parts when N content in the whole plant is maximal (kg N ha^{-1})

NB_4 : Maximum N content of the below-ground parts (kg N ha^{-1})

NB_5 : N content of the below-ground parts in February of year $n+1$ (kg N ha^{-1})

NT_3 : Maximum N content of the whole plant (kg N ha^{-1})

NT_5 : N content of the whole plant in February of year $n+1$ (kg N ha^{-1})

WA : Biomass of above-ground parts (t DM ha^{-1})

WA_5 : Biomass of above-ground parts in February of year $n+1$ (t DM ha^{-1})

WA_{\max} : Maximum biomass of above-ground parts (t DM ha^{-1})

WB : Biomass of below-ground parts (t DM ha^{-1})

WT : Biomass of the whole plant (t DM ha^{-1})

Introduction

Nowadays, environmental issues are major concerns because anthropogenic activities have accentuated global warming and the degradation of ecosystems. The extraction and use of fossil resources contribute to the increase in greenhouse gas emissions, and their non-renewable stocks are rapidly decreasing. In the last decades, sustainable resources have been developed [1-2] and biomass is the most studied [3]. To be acceptable, lignocellulosic biomass crops must satisfy several criteria: producing a lot of biomass per unit ground area, generating low environmental impacts and avoiding competition with food crops as much as possible.

Some perennial crops appear to be promising, as they combine high biomass production and low environmental impacts, with particularly low nitrogen (N) fertiliser requirements [4], which are known to be a major source of pollution in agriculture [5-7]. The perennial rhizomatous grass *Miscanthus × giganteus* (*M×g*) is a good candidate [4, 8-9]: it reaches its maximum biomass production after three to six years depending on locations [10] and produces between 17 and 49 t DM ha⁻¹ at autumn harvest and 10 to 30 t DM ha⁻¹ at winter harvest [11]. It is important to note that this later type of harvest requires less exogenous N thanks to nutrient recycling by the plant [12-14] and through leaf fall in winter which constitutes organic *mulching*. In contrast, the autumn harvest of non-totally senesced plants in October does not allow plants to entirely recycle nutrients [14-15] and prevents the accumulation of senescent leaves on the soil surface (*mulch*) which otherwise limits competition with weeds [15].

Although there are several species within the *Miscanthus* genus [16], European miscanthus cultivation mainly focuses on interspecific hybrid *M×g* cultivars derived from a single genotype both for research and biomass production, resulting in low genetic variability [17-18]. This is risky in terms of production security, limits the production area and restricts the possible end-uses due to a unique biomass quality. Varietal offer has to be expanded to overcome these disadvantages.

The *Miscanthus sinensis* (*Msin*) species is interesting with regard to the expansion of the varietal offer: it presents huge genetic variability [19], better abiotic stress tolerance than *M×g* [20], phytoremediation activity [21] and intraspecific variability concerning the occurrence dates of developmental stages and the growing season length [22]. All these characteristics make it possible to enlarge the production area while maintaining decent yields, from Mediterranean Europe such as Turkey to northern regions like Sweden [20, 23]. *Msin* could potentially be cultivated on marginal lands with higher yields and under more stressful

conditions than *M×g* [20]. *Msin* genotypes also present contrasted biomass compositions which can be better adapted to different end-uses [10, 24-25]. Finally, sowing non-invasive triploids *Msin* seeds in comparison with planting rhizomes or plantlets of the sterile *M×g* [20] can reduce crop establishment costs. Furthermore, *M×g* and *Msin* show differences in their growth dynamic: while *M×g* provides a unique cohort of functional shoots at the beginning of the growing season, *Msin* multiplies periods of shoot emission throughout the growing season [26-27] and a part of the latest shoots emitted stays green during winter whereas all *M×g* shoots are senesced.

Concerning N requirements to produce biomass, Zapater *et al.* [28] showed that the critical N dilution curve, *i.e.* the minimum N concentration required in shoots at a given time to maximize above-ground biomass production, was the same between *M×g* and *Msin*. However, although endogenous N recycling is globally well characterized for *M×g* [12-14], to our knowledge, no study dealing with *Msin* has been published. At the beginning of the growing season, nutrients stored in the rhizome and roots, which constitute the below-ground parts (BP), are transferred to new buds and stems, the future above-ground parts (AP), to support their initial growth. This transfer is called spring remobilisation. During senescence, nutrients in leaves and stems are withdrawn and transferred to the rhizome to be stored during winter. This transfer is called autumn remobilisation. These fluxes have been quantified for *M×g* in several studies, using the apparent N fluxes method, based on the comparison of N stocks in the above-ground and below-ground parts at different times during the growing season [12-14, 29-30]. According to the different studies, spring N remobilisation ranged from 23 to 98 kg N ha⁻¹ and autumn remobilisation ranged from 45 to 134 kg N ha⁻¹ during the third growing year of *M×g*.

The large variability found for *M×g* spring and autumn N remobilisation can be partly explained by discrepancies between the different calculation methods. Beale and Long [12] and Himken *et al.* [13] considered that N spring remobilisation starts at emergence, perhaps underestimating spring remobilisation because N is probably transferred to new buds in formation before emergence, during the winter. Strullu *et al.* [14] considered the beginning of remobilisation to take place before emergence in February. This later proposition seems to be fairer when considering the beginning of spring remobilisation. In the same way, the autumn N remobilisation can be calculated either from AP or BP N stocks and using different starting dates. Beale and Long [12] used BP N stock and defined the starting date of autumn remobilisation as the date when BP N stock was at its minimum, in summer, while Himken *et al.* [13], Dierking *et al.* [30] and Strullu *et al.* [14] used AP N stocks and considered the

decrease, in autumn. As the increase in BP N stock in summer can reflect soil N absorption and possible storage in the rhizome, we consider that the beginning of autumn remobilisation should be taken at the beginning of N withdrawal from AP, in autumn. Regardless of the compartment taken into account in the calculation (AP or BP), the end of autumn remobilisation was taken in February or March of the year $n+1$ for Beale and Long [12], Himken *et al.* [13] and Strullu *et al.* [14] in the case of a late harvest, while Dierking *et al.* [31] preferred to use the date of maximum BP N stock in November. We consider that the most accurate suggestion is to define the end of autumn remobilisation at the point when the rhizome is full, *i.e.* maximum observed BP N content. Furthermore, comparing the above methods based on AP stocks or BP stocks highlighted higher N fluxes when calculated based on AP N stocks rather than BP N stocks. As N in the fallen leaves was taken into account in the calculation, this suggests that a part of above-ground N was “lost”, as it was not found in the rhizome and roots during winter. This point regarding total N content of the whole plant was already underlined by Beale and Long [12], who calculated a loss of 111 kg N ha^{-1} , *i.e.* 33% of whole plant maximum N stock, between July and February of the following year in a fertilised trial. Hence, all these discrepancies between studies in N apparent flux calculation and results emphasized the importance of homogenising the calculation method.

This study deals with N management by miscanthus, with a focus on the comparison between *Mxg* and two genotypes of *Msin*. The first objective of the study was to characterise and compare N endogenous recycling, *i.e.* spring and autumn remobilisation periods and fluxes between *Mxg* and *Msin* by using the most relevant apparent N flux calculation methods from the literature. As *Mxg* and *Msin* present the same N requirement to produce biomass [28], and considering that *Mxg* produces more biomass than *Msin*, we hypothesised that the N apparent fluxes of *Mxg* were higher than those of *Msin*. On the other hand, based on the same facts, we hypothesised that N recycling efficiencies, *i.e.* the apparent N fluxes relative to the maximum N quantity in AP, can be equivalent between species. Our second objective was to compare N management between miscanthus species, taking into account not only endogenous fluxes but also exogenous N fluxes during acquisition (N uptake and fertiliser recovery) and estimated N losses during autumn and winter for these three genotypes. For the reasons cited above, we expected higher exogenous fluxes for *Mxg* than *Msin*, but comparable proportions of N uptake relative to biomass produced, or comparable N losses relative to total N content of the plant.

Material and methods

Experimental site and trial design

The field was located in northern France, at the French National Research Institute for Agriculture, Food and Environment in Estrées-Mons (49°87 N, 3°01 E) with a deep silt loam soil (Haplic Luvisol, IUSS Working Group WRB, 2006). During the last ten years (2007-2017), the oceanic climate has been characterized by an average temperature of 11.0°C and precipitation of 640 mm. The four growing years, 2014 to 2017, corresponded to these mean values with average temperatures of 11.9, 11.3, 11.0 and 11.4°C and average precipitation of 755, 631, 675 and 531 mm, respectively. Three contrasted genotypes were planted by hand in spring 2014 at a density of 2.08 plants m⁻²: *Miscanthus × giganteus* (M×g) from ADAS, Yorkshire, UK, *Miscanthus sinensis* Goliath (Msin Goliath) and *Miscanthus sinensis* Malepartus (Msin Malepartus) both from Plant Estate, Netherlands. The field was divided into four parts which corresponded to the four growing years studied, in order to sample plants each year without destroying the entire trial. Within each part, the three genotypes were planted in three blocks according to a complete block design with border plants between sampling zones to maintain equal competition throughout the growing season. This study focused on the third (2016) and fourth (2017) growing years because plants were supposed to have reached their maximum biomass production under these pedo-climatic conditions.

Crop emergence was determined when 50% of the observed plants had sprouted, with at least one bud emerged. It occurred on April 5th in 2016 (third growing year). In 2017 (fourth growing year), emergence occurred at the end of March but a frost event destroyed the young shoots. Therefore, a second emergence occurred on April 23rd 2017. The entire trial was harvested each year in the early spring. Chemical control was carried out in the first year to prevent competition with weeds. All plots were irrigated during the four years of cultivation to create non-limiting growing conditions: the annual amount of water added was 68, 250, 467 and 427 mm from 2014 to 2017. At the end of the first year, the entire trial was cut down and the above-ground parts were shred and left in the field. The trial was unfertilised during the first and second years. N fertiliser was applied at the beginning of May 2016 and 2017 at the rate of 120 kg N ha⁻¹ as a urea ammonium nitrate (UAN) solution. The soil mineral N content was measured each year in March or April over 0-150 cm. It was 85, 85, 53 and 54 kg N ha⁻¹ on average in 2014, 2015, 2016 and 2017, respectively. During each plant sampling campaign, soil N content was measured in each sampling zone within a 0-30 cm depth. The Nitrogen Nutrition Index (NNI)

calculated according to the critical N dilution curve [28] showed that plants had never been N deficient.

To determine fertilisation efficiency, a ^{15}N -labeled UAN (Urea-Ammonium-Nitrate) fertiliser uniformly labelled on urea, NH_4^+ and NO_3^- , with a ^{15}N excess atom fraction of 0.125%, was applied on the experimental plots used for sampling on May 11th 2016 and May 3rd 2017. Plant isotopic excess was measured at each sampling date and ^{15}N natural abundance was analysed in control plants planted the same year, grown near the others but without fertilisation and irrigation.

Plant sampling

Sixteen whole plant sampling campaigns, separated into above-ground parts (AP: stems and leaves) and below-ground parts (BP: rhizome and associated roots), were carried out between February and November, in 2016 and in 2017, approximately every ten days during the full vegetation period. At each sampling campaign, the number of shoots of every seventh plants of the sampling line was counted and the median number of shoots per plant was determined for each block and genotype. For each sampling and block, the three plants whose shoot number were closest to the median value were collected in the morning, providing nine sampled plants per genotype. Two additional plants per genotype and block, also with a shoot number close to the median, were sampled only for their above-ground organs. Hence, nine plants were sampled for below-ground parts and 15 plants for above-ground parts, for each genotype, at each sampling date. The stems and leaves (AP) of each plant were immediately weighed. The rhizome and associated roots (BP) of each plant were washed with cold water, dried with paper towels and weighed fresh. Then, AP and BP of the plants were pooled by block and genotype. Subsamples of AP and BP of each block and genotype were dried at 65°C during 96 hours and weighed to determine above-ground and below-ground biomass (*WA* and *WB*), water content and dry matter. They were used to determine N content and ^{15}N isotopic excess.

The abscised leaves were picked up weekly from the ground each year from September to February. They were dried and weighed each week and pooled at the end of the year for analysis.

Because of a strong wind causing *M*×*g* lodging in 2017, the *M*×*g* plants studied were chosen among the plants that remained standing and sampling was no longer representative of the plots,

as competition for light was largely modified for these plants. Hence, the corresponding data will not be shown.

Plant nitrogen stocks and nitrogen derived from fertiliser

All plant samples were finely ground (< 500 µm) and their N concentration was determined using an elemental analyser (FLASH EA 1112 series, Thermo Electron, Germany). ¹⁵N abundance was measured with the ANCA-IRMS technique, using the elemental analyser linked to a mass spectrometer (DELTA V Advantage, Thermo Electron, Bremen, Germany).

The plant N stocks (N accumulated in the plant) were calculated using the following equations:

$$NA = WA \cdot [N_A] \quad (1a)$$

$$NB = WB \cdot [N_B] \quad (1b)$$

$$NT = NA + NB \quad (1c)$$

where NA , NB and NT are the amounts of N (kg ha⁻¹) contained in the AP, BP and in the whole plant respectively; WA and WB are the amounts of dry matter (t ha⁻¹) in the AP and BP, and $[N_A]$ and $[N_B]$ are their N concentrations (g N kg⁻¹ DM), respectively.

The amount of N derived from the ¹⁵N fertiliser ($Ndff$, kg N ha⁻¹) in the plant (AP + BP) was determined using the slightly modified equation by Hauck and Bremner [32]:

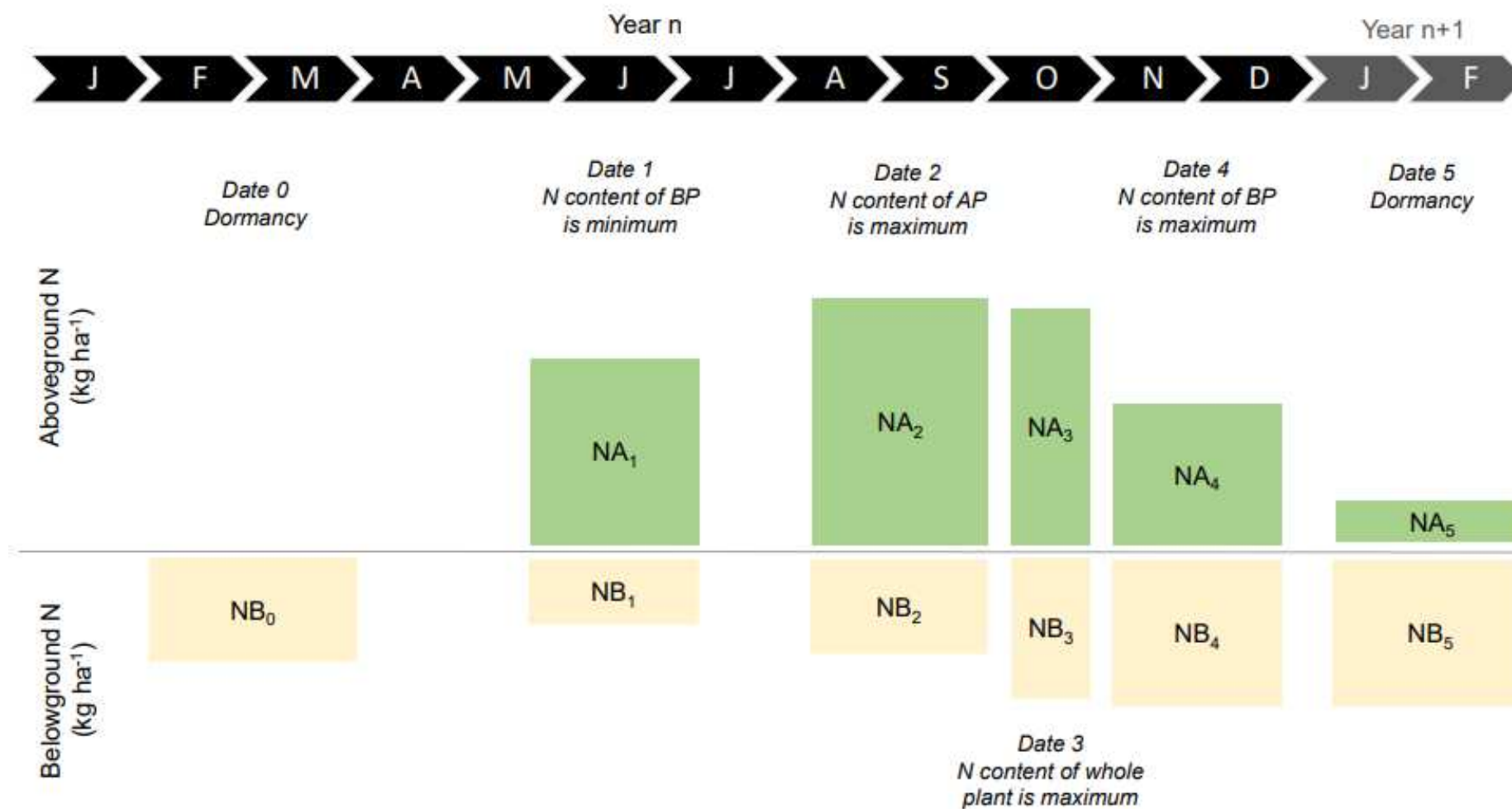
$$Ndff = NT \frac{p-q}{f-q} \quad (2)$$

where p is the excess atom fraction of the labelled plant, q the excess atom fraction of a control plant and f the excess atom fraction of the labelled fertiliser.

The fertiliser-N recovery (N_{rec} , %), *i.e.* the proportion of the fertiliser-N recovered in the plant, was:

$$N_{rec} = 100 \frac{Ndff}{F} \quad (3)$$

where F is the amount of fertiliser-N (here $F = 120$ kg ha⁻¹).



Chapter 2 – Fig1. Seasonal evolution of the nitrogen stocks in the above-ground (NA) and below-ground parts (NB) during the key periods for N recycling over the course of one year in *Miscanthus × giganteus* (based on Strullu (2011) and Dierking *et al.* (2017))

Net nitrogen fluxes

According to the literature, different methods can be used to calculate net N fluxes. We chose the most relevant methods based on our observations and assumptions and compared two methods for autumn N remobilisation. Based on the evolution of N stocks in AP and BP, we were able to define six key dates (Figure 1): date 0 corresponded to the dormancy phase (February) of year n ; date 1 was the time when the N content of BP (NB) was minimal; date 2 was the time when the N content of AP (NA) was maximal; date 3 was the time when the N content of the whole plant (NT) was maximal; date 4 was the time when NB was maximal; date 5 corresponded to the dormancy phase of year $n+1$.

Spring remobilisation (SR , kg N ha⁻¹) corresponded to the upward transfer of N from BP to AP to support the growth of new shoots at the beginning of the growing season. It was calculated according to Strullu *et al.* [14]:

$$SR = NB_0 - NB_1 \quad (4)$$

where NB_0 and NB_1 represent the N content of below-ground parts at dates 0 and 1, respectively.

Autumn remobilisation (kg N ha⁻¹) corresponded to the downward transfer of N from AP to BP in autumn. It can be calculated using two methods, according to Dierking *et al.* [31]. The first method is based on NA variations:

$$ARa = NA_2 - NA_4 \quad (5a)$$

where NA_2 and NA_4 are the N content of the above-ground parts at dates 2 and 4 respectively.

The second method is based on NB variations:

$$ARb = NB_4 - NB_2 \quad (5b)$$

where NB_4 and NB_2 are the N content of the below-ground parts at dates 4 and 2 respectively.

The maximum N uptake (U , in kg N ha⁻¹) was calculated as follows:

$$U = NT_3 - NB_0 \quad (6)$$

where NT_3 is the N content of the whole plant at date 3.

Finally, N losses of the whole plant (L , in kg N ha⁻¹) were:

$$L = NT_3 - NT_5 \quad (7)$$

where NT_5 is the N content of the whole plant at date 5.

The key dates in Figure 1 were determined for each genotype and year according to the observed dynamics of NA , NB and NT (shown in Figure 4). Dates 2 and 3 were often found at the same time. Each N flux was calculated for each block, year and genotype, and then the values of the three blocks were averaged by genotype and year to determine the fluxes for each genotype and each year.

Nitrogen Use Efficiencies

The Nitrogen Use Efficiency (NUE , in $\text{kg DM kg}^{-1} \text{ N}$) represents the amount of biomass produced per unit of N accumulated in the plant. It can be calculated by considering the whole plant but we chose to consider AP to be able to compare our results with other studies. Two NUE calculations were made according to Ra *et al.* [54], Olson *et al.* [55] or Dierking *et al.* [56] at two different dates:

$$NUE_1 = \frac{WA_{max}}{NA_2} \quad (8a)$$

where WA_{max} is the maximum biomass accumulated in the above-ground parts during the cycle (kg DM ha^{-1}) and NA_2 is the N content of the above-ground parts at date 2;

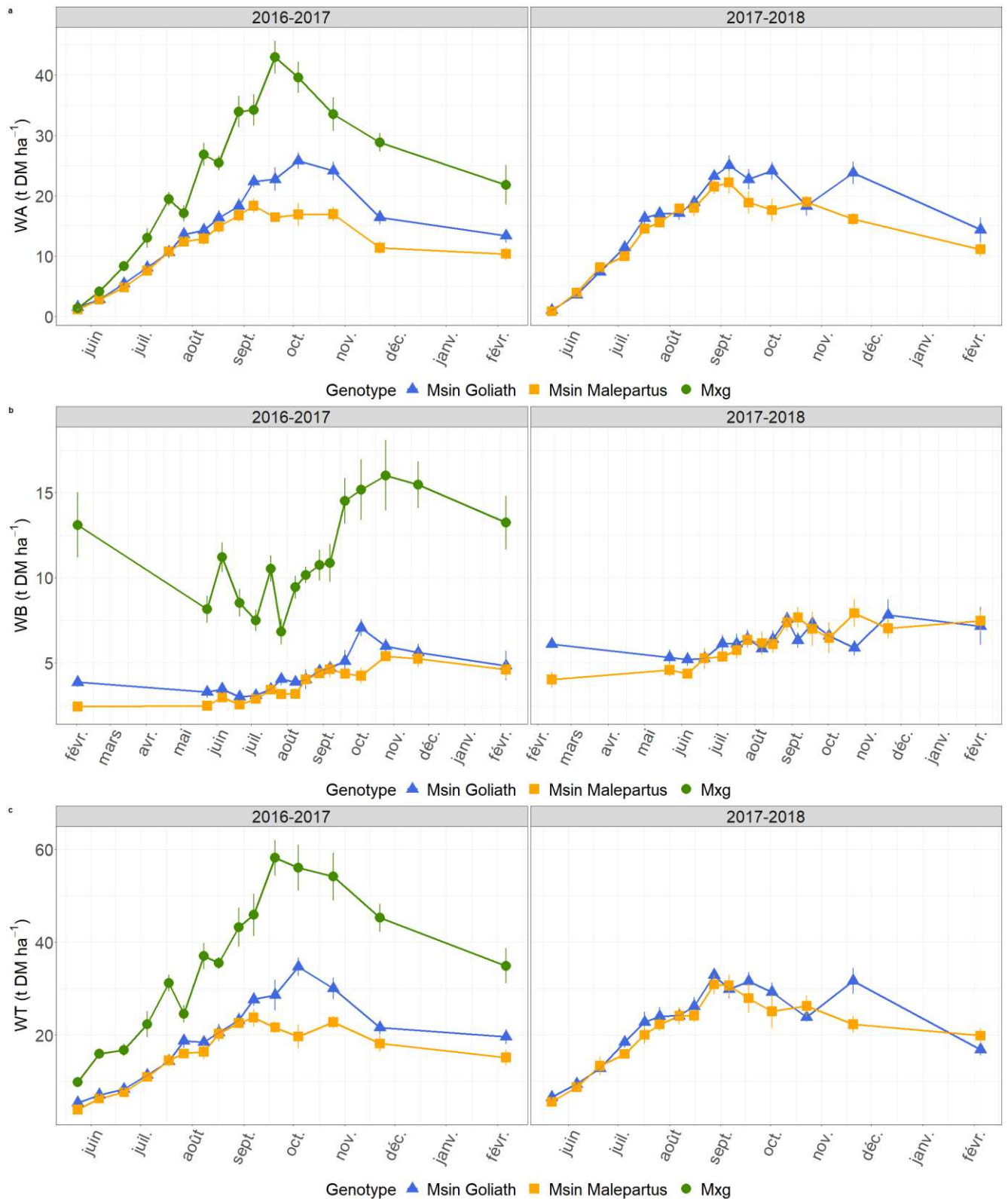
$$NUE_2 = \frac{WA_5}{NA_5} \quad (8b)$$

where WA_5 is the biomass accumulated in the above-ground parts at date 5 (kg DM ha^{-1}) and NA_5 is the N content of the above-ground parts at date 5.

NUE_1 represents the ability of the plant to produce above-ground biomass using N remobilized in the spring and N absorbed from the soil. NUE_2 is the amount of biomass that can be harvested per unit of N exported.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R Software version 3.5.1 (R Core Team, 2018). Linear models (ANOVA) and Tukey tests were used to determine: (i) differences between genotypes for each variable during the third and fourth growing years with genotype and block as fixed effects and (ii) differences between years for *Msin Goliath* and *Msin Malepartus* with the year as a fixed effect. It is important to note that possible differences between years could be attributed to age, climate or sampling effects that we were not able to identify. Unilateral student tests were used to determine whether N fluxes were significantly different from 0.



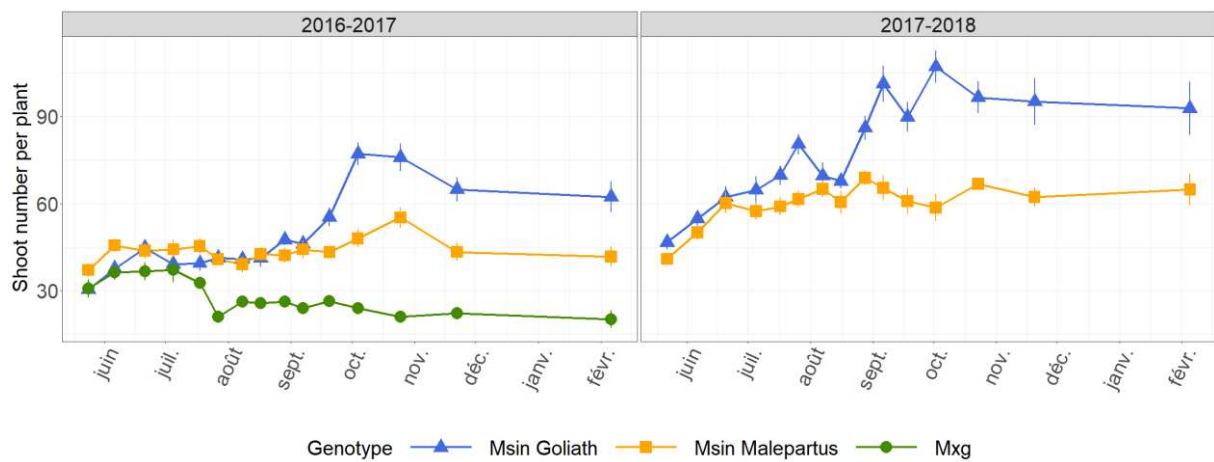
Chapter 2 - Fig2. Seasonal dynamics of above-ground (a), below-ground (b) and total (c) biomass in *Miscanthus × giganteus* (circles), *Miscanthus sinensis* Goliath (squares) and Malepartus (triangles) during the third (2016) and fourth (2017) growing years (mean ± standard error)

Results

Biomass production and plant development

The dynamics of above-ground and whole plant biomass (WA and WT) followed the same pattern for the three genotypes: it increased from emergence to reach a maximum in autumn and decreased between autumn and February of the year $n+1$ (Figure 2a and c). Between February of year n and summer (June or July), below-ground biomass (WB) decreased for *Msin* Goliath and *M×g* (Figure 2b, squares and circles) but stayed unchanged or slightly increased for *Msin* Malepartus. WB then increased for all genotypes to reach a maximum around November (later than the observed WA_{max}) (Figure 2b). *M×g* produced about twice as much WA than *Msin* with a maximum of 43 t DM ha⁻¹ (vs 26 and 18 t DM ha⁻¹ for *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus respectively) during the third growing year (2016). WA decreased during winter to reach 22 t DM ha⁻¹ in February for *M×g* (13 and 10 t DM ha⁻¹ for *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus, respectively). These yields were similar between years for both *Msin* genotypes. The WB of *M×g* was also much higher than that of the other genotypes: in 2016 it reached a maximum of 16 t DM ha⁻¹, compared to 7 and 5 t DM ha⁻¹ for *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus respectively.

M×g produced only one group of shoots (cohort) at emergence, reaching a maximum of 37 shoots per plant in June (Figure 3, circles), which then decreased to 26 shoots per plant in August due to shoot regression. In contrast to *M×g*, *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus (Figure 3, squares and triangles) emitted an initial cohort at emergence, then a second from late summer onwards which reached a high number of shoots, with a maximum of 55 shoots per plant for *Msin* Malepartus and 77 for *Msin* Goliath in October in 2016. These additional cohorts were also observed during the fourth growing year (2017) for *Msin* genotypes. However, while there were two periods of shoot emissions in 2016, shoot emission appeared to be continuous from emergence to September or October 2017, with higher maximum shoot numbers than in 2016 (69 and 107 shoots per plant for *Msin* Malepartus and *Msin* Goliath respectively). *Msin* Goliath emitted more shoots than *Msin* Malepartus and seemed to emit new shoots later than *Msin* Malepartus, particularly during the fourth year (2017). The highest number of shoots emitted by *Msin* Goliath also corresponded to a higher WA than *Msin* Malepartus.



Chapter 2 - Fig3. Seasonal dynamics of shoot numbers in *Miscanthus × giganteus* (circles), *Miscanthus sinensis* Goliath (squares) and Malepartus (triangles) during the third (2016) and fourth (2017) growing years (mean \pm standard error)

Seasonal variation of above-ground and below-ground nitrogen contents

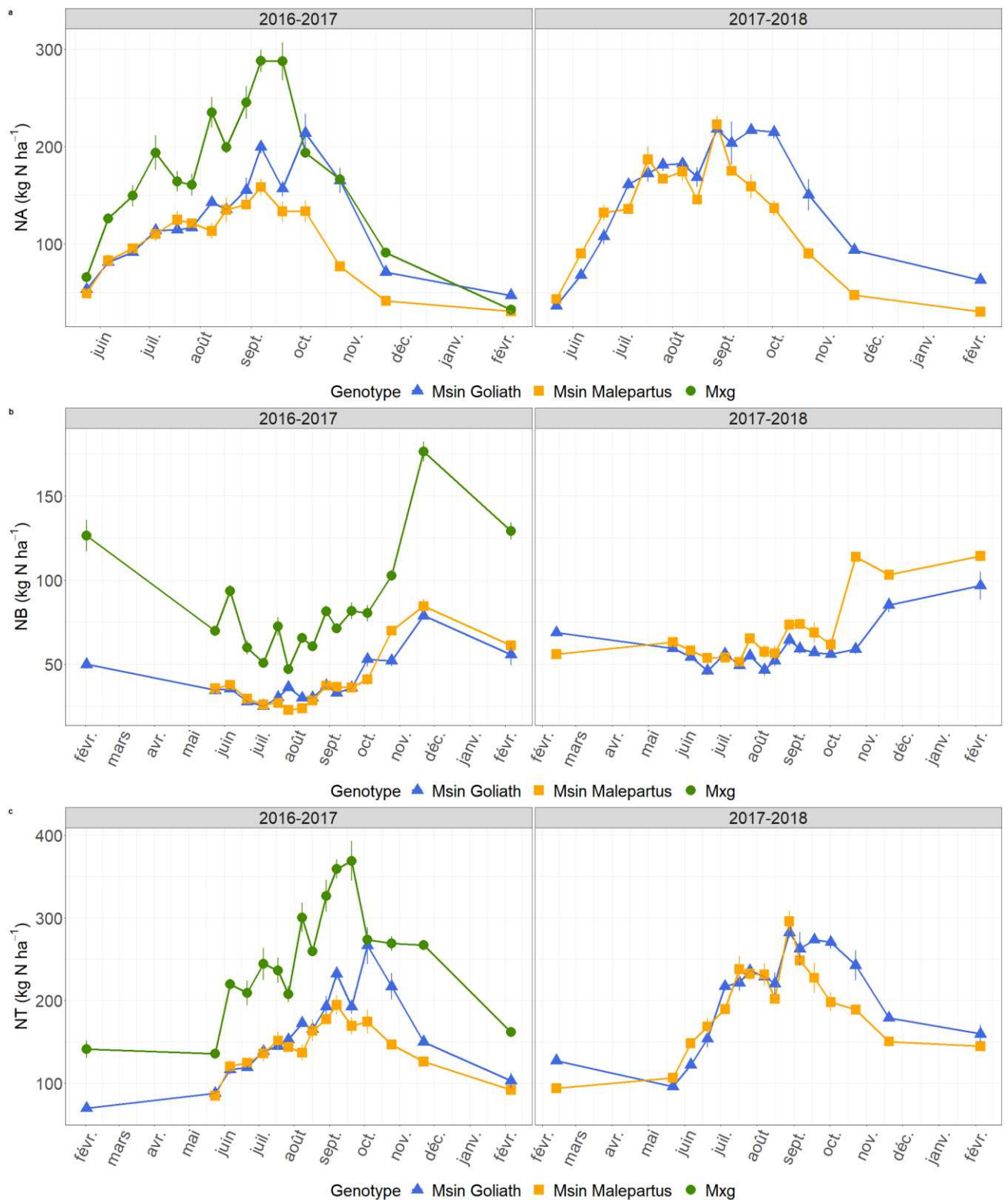
All the studied genotypes presented similar N content dynamics during the two years of the experiment (Figure 4). N content in above-ground parts (*NA*) increased from emergence to reach a maximum level in late summer or in autumn, then decreased until February (Figure 4a). The maximum level was determined in September in 2016 and late August in 2017 (Table 1). N content in below-ground parts (*NB*) decreased from the beginning of the growing season to summer and then increased to reach a maximum level in late autumn (Figure 4b). During winter *NB* presented contrasted evolutions depending on the year: in 2016, *NB* appeared to decrease during winter whereas it remained stable in 2017. *NB* was minimal in June or July (Table 1). Whole plant N content (*NT*) evolution in time (Figure 4c) showed the same dynamics as *NA* during the vegetative season: an increase from emergence to autumn followed by a decrease.

M×g *NA*, *NB* and *NT* in 2016 (Figure 4a, b and c, circles) were globally higher than for both *Msin*. The maximum *NA* was 273 kg N ha⁻¹ for *M×g* versus 158 to 213 kg N ha⁻¹ for *Msin* Malepartus and Goliath, respectively. *NB* was twice as high for *M×g* as for *Msin* during the whole 2016 year. It reached a maximum of 176 kg N ha⁻¹ versus 80 kg N ha⁻¹ for *Msin*. Minimum *NB* levels were observed during the summer (date 1), and were 47 and 25 kg N ha⁻¹ for *M×g* and *Msin* respectively in 2016. *Msin* *NB* were higher in 2017 than in 2016 and similar between the two genotypes. This higher N quantity in 2017 corresponded to a higher biomass and suggests that *Msin* growth had not yet reached the plateau of biomass production in 2016. Interestingly, at the end of the growing season and in the February of the year *n+1* (dates 4 and 5) *NA* presented similar differences between genotypes for both years: more N remained in *Msin* Goliath's AP (47 and 63 kg N ha⁻¹ in 2016 and 2017) than in *Msin* Malepartus (about 30 kg N ha⁻¹ for both years).

Nitrogen fluxes and plant nitrogen functioning

Endogenous nitrogen fluxes

During both years, there was no significant difference between genotypes concerning N spring remobilisation (*SR*) fluxes (Eq. 4) and efficiencies (Table 2), probably due to the rather large variability in *WB* measurements. However, N spring remobilisation in 2016 was greater for *M×g* than *Msin*, in terms of quantity (79, 25 and 13 kg N ha⁻¹ for *M×g*, *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus respectively) and efficiency (27%, 12% and 8% of the *NA*₂ for the three species, respectively). This indicated that 33 to 59% of the N stock present in below-ground parts at the



Chapter 2 - Fig4. Seasonal dynamics of above-ground (a), below-ground (b) and whole plant (c) nitrogen content in *Miscanthus x giganteus* (circles), *Miscanthus sinensis* Goliath (squares) and Malepartus (triangles) during the third (2016) and fourth (2017) growing years (mean \pm standard error)

end of winter (NB_0) was remobilised during spring according to the genotype. Spring remobilisation fluxes appeared to be higher for *Msin* Goliath than for *Msin* Malepartus in both years, although statistically not significantly different.

The autumn remobilisation fluxes calculated based on NA (AR_a , Table 2) did not differ significantly between genotypes either, although they seemed to be higher in $M \times g$ (197 kg N ha⁻¹ versus 128 and 117 kg N ha⁻¹ for *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus in 2016). During the autumn 2016, NA decreased by 63 to 74% compared to the maximum stock (NA_2), with no significant differences between genotypes. In 2017, even if the autumn remobilisation flux was not significantly higher for *Msin* Goliath than for *Msin* Malepartus, the efficiency was significantly lower ($p < 0.10$) for *Msin* Goliath (57%) than for *Msin* Malepartus (75%).

Autumn remobilisation calculated based on NB (AR_b , Table 2) was significantly higher ($p < 0.05$) for $M \times g$ (105 kg N ha⁻¹) than for *Msin* Goliath and Malepartus (46 and 48 kg N ha⁻¹ respectively). A significant difference ($p < 0.10$) was also found in terms of efficiency (*i.e.* the proportion of NA_2) which was higher for $M \times g$ (38%) than for *Msin* Goliath (24%). For *Msin*, autumn remobilisation calculated with this method appeared to be lower in 2017 than in 2016. The difference between years was significant for *Msin* Goliath ($p < 0.05$). In 2017, *Msin* Goliath stored significantly less N into BP (21 kg N ha⁻¹ *i.e.* 10% of NA_2) than *Msin* Malepartus (37 kg N ha⁻¹ *i.e.* 17% of NA_2).

Autumn remobilisation calculated based on NB was systematically lower than autumn remobilisation calculated based on NA . In 2016, the increase in NB corresponded only to 40-56% of the decrease in NA during the same period, with no significant difference between genotypes. It was even lower for both *Msin* in 2017 (18% and 23% for *Msin* Goliath and Malepartus respectively).

Exogenous nitrogen fluxes and whole plant nitrogen balance

Nitrogen uptake (U) was calculated using NT and NB as indicated in Eq. 6. In 2016, it reached 243 kg N ha⁻¹ for $M \times g$, 183 kg N ha⁻¹ for *Msin* Goliath and 159 kg N ha⁻¹ for *Msin* Malepartus (Table 3). Even if there was no significant difference between the two years, U seemed to be higher for both *Msin* in 2017 than in 2016, with 213 and 240 kg N ha⁻¹ for *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus respectively.

Chapter 2 - Table 1. Observed dates 1 (Below-ground N stock is minimum) and 2 (Above-ground N stock is maximum) for *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years.

See Chapter2 - Fig1 for abbreviations.

Genotype	Crop age	Date 1 <i>end of spring remobilisation</i>	Date 2 <i>start of autumn remobilisation</i>
<i>M×g</i>	3	27/07/2016	07/09/2016
<i>Msin Goliath</i>	3	05/07/2016	07/09/2016
<i>Msin Malepartus</i>	3	27/07/2016	07/09/2016
<i>Msin Goliath</i>	4	20/06/2017	28/08/2017
<i>Msin Malepartus</i>	4	17/07/2017	28/08/2017

In 2016, the N derived from fertiliser (N_{dff}) was significantly higher ($p < 0.10$) for $M \times g$ (87 kg N ha⁻¹) than for both $Msin$ (57 and 43 kg N ha⁻¹ for $Msin$ Goliath and $Msin$ Malepartus, respectively) which suggested a better utilisation of the applied fertiliser for $M \times g$ (Table 3). Indeed, N recovery (N_{rec}) reached 72% for $M \times g$ versus only 36% for $Msin$ Malepartus and 48% for $Msin$ Goliath. There was no difference in N_{dff} and N_{rec} between the two $Msin$ genotypes in 2017 or in 2016.

The maximum N stock in the whole plant (NT_3) originates from endogenous N which corresponds to the initial N stock in BP in February (N_{B0}) and has been partly remobilised during spring, and from exogenous N uptake (U) which either comes from N fertiliser (N_{dff}) or from other sources (N_{other}) (Figure 5). For all genotypes and both growing years, endogenous N (N_{B0} remobilised and not remobilised) constituted the smallest proportion of NT_3 (19-34%). It was however higher for $M \times g$ than for the two other genotypes in 2016 (34 versus 19-22%). The exogenous N uptake represented 66 to 81% of NT_3 . N_{dff} in proportion to NT_3 was quite similar between genotypes and years (16-24%). Finally, 43 to 65% of NT_3 came from the soil (other source than the rhizome or fertiliser, *i.e.* initial soil mineral N, soil organic N mineralised, etc.) (Figure 5). This proportion was significantly higher for $Msin$ Malepartus than $M \times g$ in 2016 (59 vs. 43%).

The N balance calculated for the whole plant (NT , Figure 4c) indicated that significant plant N losses occurred in autumn and winter (Table 3). They represented large amounts: from 103 \pm 51 kg N ha⁻¹ in $Msin$ Malepartus 2016 to 207 \pm 106 kg N ha⁻¹ in $M \times g$ in 2016. Through statistical analyses, we verified that these losses were significantly different from 0. It is interesting to note that, when expressed as a proportion of the maximum NT (NT_3), these losses were rather similar between genotypes and years (42 to 56%). These calculated N losses did not take into account the N measured in abscised leaved during autumn and winter. The cumulative biomass of abscised leaves varied from 3 to 4 t DM ha⁻¹ between genotypes and years, with a significant difference between $Msin$ Malepartus and $M \times g$ in 2016 (4 and 3 t DM ha⁻¹ respectively). The corresponding N quantities ranged from 19 to 27 kg N ha⁻¹ (Table 3) depending on genotypes and years, which represented 6 to 12% of NT_3 .

Nitrogen Use Efficiencies

The maximum above-ground biomass found in $M \times g$ (43 t DM ha⁻¹) was significantly higher than $Msin$ Goliath (26 t DM ha⁻¹) which was itself significantly higher than $Msin$ Malepartus

Chapter 2 - Table 2. Endogenous N fluxes in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

See Chapter 2 - Fig1 for abbreviations. Standard errors are indicated in parentheses. Letters indicate the results of Tukey tests applied to the comparison between genotypes for a given year (A, B $p < 0.05$, a, b $p < 0.10$). Asterisks indicate the significant difference in N fluxes from 0 (* $p < 0.10$).

Genotype	Crop age	Spring remobilisation (SR, Eq. 4)			Autumn remobilisation calculated from NA (AR _a , Eq. 5a)		Autumn remobilisation calculated from NB (AR _b , Eq. 5b)		AR _b / AR _a , %
		SR, kg N ha ⁻¹	SR / NA ₂ , %	SR / NB ₀ , %	AR _a , kg N ha ⁻¹	AR _a / NA ₂ , %	AR _b , kg N ha ⁻¹	AR _b / NA ₂ , %	
<i>M×g</i>	3	79 (41) A a *	27% (12%) A a	59% (14%) A a	197 (38) A a *	68% (3%) A a	105 (31) A a *	38% (12%) A a	56% (19%) A a
<i>Msin</i> Goliath	3	25 (7) A a *	12% (3%) A a	49% (7%) A a	128 (33) A a *	63% (9%) A a	46 (7) B a *	24% (6%) A b	40% (17%) A a
<i>Msin</i> Malepartus	3	13 (10) A a	8% (7%) A a	33% (20%) A a	117 (24) A a *	74% (2%) A a	48 (7) B a *	31% (6%) A ab	42% (8%) A a
<i>Msin</i> Goliath	4	23 (5) A a *	10% (2%) A a	34% (9%) A a	124 (20) A a *	57% (7%) A a	21 (9) A a *	10% (5%) A a	18% (10%) A a
<i>Msin</i> Malepartus	4	12 (6) A a	6% (3%) A a	20% (11%) A a	166 (27) A a *	75% (1%) A b	37 (9) B a *	17% (6%) A b	23% (8%) A a

(18 t DM ha⁻¹) (Table 4). The above-ground biomass decreased during winter and was almost halved for the three genotypes. NUE_I did not differ significantly between genotypes in 2016 and 2017. In 2016, it ranged between 138 and 161 kg DM kg⁻¹ N. In 2017, NUE_I was similar to its 2016 values for *Msin* Goliath (121 kg DM kg⁻¹ N) but was significantly lower ($p < 0.05$) than in 2016 for *Msin* Malepartus (97 kg DM kg⁻¹ N). The N use efficiency NUE_2 was significantly higher than NUE_I . This is due to the decrease in NA in autumn. It was higher in 2016 for $M \times g$ (653 kg DM kg⁻¹ N) than *Msin* (287-338 kg DM kg⁻¹ N) and similar between years for *Msin*.

Chapter 2 - Table 3. Exogenous N fluxes and N balance in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years. Standard errors are indicated in parentheses. Letters indicate the results of Tukey tests applied to the comparison between genotypes for a given year (A, B p < 0.05, a, b p < 0.10). Asterisks indicate the significant differences in N fluxes from 0 (* p < 0.10).

Genotype	Crop age	Plant Uptake (U) and fertilizer recovery			Plant Losses (L)		N in abscised leaves, kg N ha ⁻¹
		U, kg N ha ⁻¹ (Eq. 6)	Ndff, kg N ha ⁻¹ (Eq. 2)	N _{rec} , % (Eq. 3)	L, kg N ha ⁻¹ (Eq. 7)	L / NT3, %	
<i>M×g</i>	3	243 (55) A a *	87 (22) A a	72% (18%) A a	207 (106) A a *	53% (14%) A a	19 (4) A a *
<i>Msin</i> Goliath	3	183 (24) A a *	57 (12) AB b	48% (10%) AB b	129 (33) A a *	56% (13%) A a	27 (4) A a *
<i>Msin</i> Malepartus	3	159 (45) A a *	43 (12) B b	36% (10%) B b	103 (51) A a *	50% (15%) A a	22 (5) A a *
<i>Msin</i> Goliath	4	213 (26) A a *	54 (10) A a	45% (8%) A a	123 (61) A a *	42% (19%) A a	26 (4) A a *
<i>Msin</i> Malepartus	4	240 (40) A a *	49 (11) A a	40% (9%) A a	151 (52) A a *	50% (11%) A a	21 (2) A a *

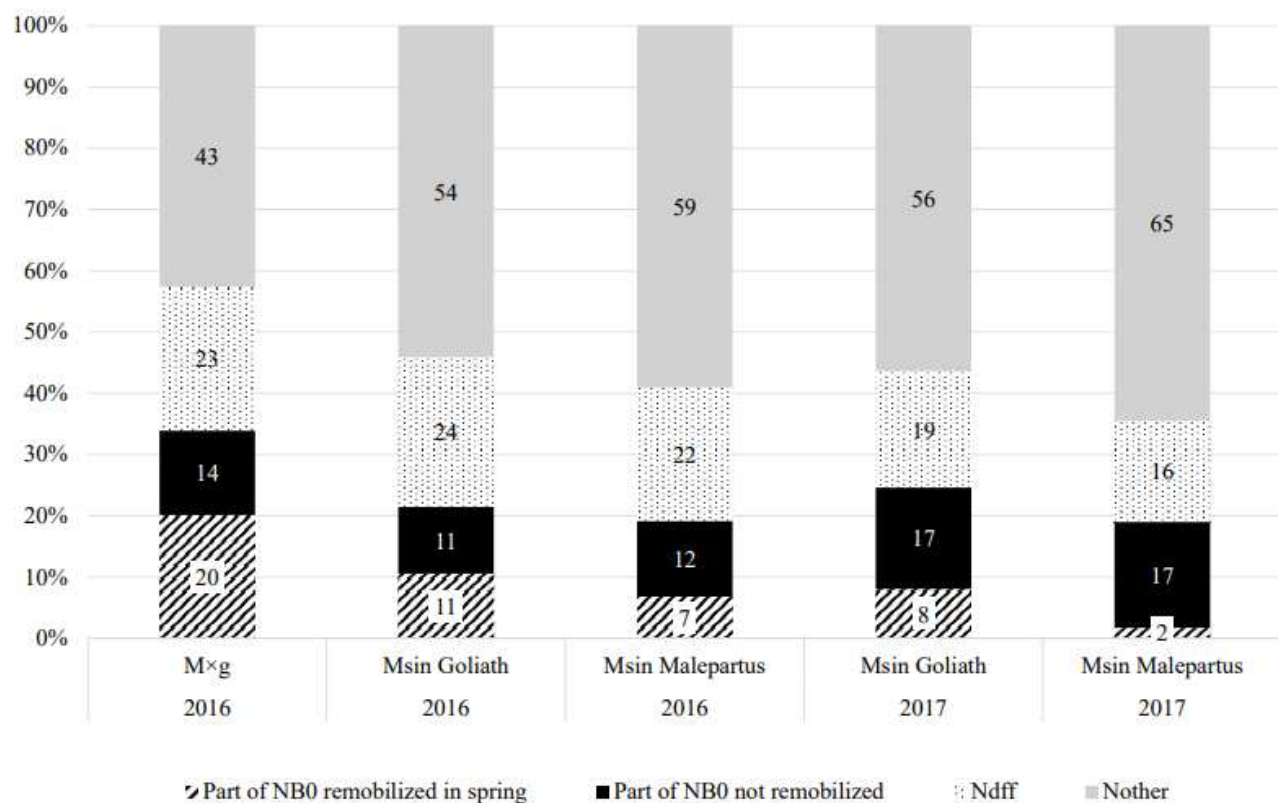
Discussion

Studying the N functioning (*i.e.* endogenous and exogenous N fluxes and N use linked with biomass production) of *Msin* is important in order to appreciate the fact that this species can contribute to the expansion of the varietal offer of miscanthus to produce biomass with low environmental impacts. With this fine temporal study of *M×g* and *Msin* N stocks and biomass dynamics over two years, we estimated N recycling fluxes and showed similar recycling efficiencies between these two species. This point is the first to be discussed below. We also highlighted the importance of N uptake in constituting the whole plant N stock, and consequent N losses during winter which have to be further investigated. These points were discussed in the second section below. Finally, *NUE* values calculated for these two species allowed us to compare their performance with other annual and perennial plant species in the third section of the discussion.

Nitrogen recycling efficiency is rather similar in Miscanthus × giganteus and Miscanthus sinensis

Our study consisted in a detailed temporal analysis of the evolution of biomass and N content in above-ground and below-ground parts of three contrasted miscanthus genotypes. Sixteen plant sampling campaigns were carried out each year during two years, in contrast to four to eight sampling campaigns per year in other studies [12-14, 28, 30, 31, 36]. The short time steps between the sampling campaigns allowed us to identify precisely the periods of spring and autumn N remobilisations. We found that the duration of remobilisation phases was similar between genotypes. The only difference was relative to the end of spring remobilisation which occurred about three weeks earlier for *Msin* Goliath. Assuming that autumn remobilisation starts when *NA* is at its maximum level, we found that *M×g* remobilisation began in the first part of September, whereas Strullu *et al.* [14] and Dierking *et al.* [31] observed it slightly earlier in August. But they only carried out three sampling campaigns between July and October or November respectively, whereas we carried out 11 between the beginning of July and the end of November, each year.

The N remobilisation flux found in *M×g* during spring 2016 (79 kg N ha⁻¹) was slightly lower than that obtained (98 kg N ha⁻¹) by Strullu *et al.* [14] with similar crop management. Similarly, N efficiency (relative to *NA*₂) was smaller (27% vs 44%). The N remobilisation flux found in *M×g* during autumn 2016 using *NA* (197 kg N ha⁻¹) was comparable to Strullu *et al.* [14], but



Chapter 2 - Fig5. Nitrogen sources at date 3 (around September) in *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

three to four times greater than Dierking *et al.* [31] who observed a decline in NA of 46-67 kg N ha⁻¹ depending on the fertilisation rate. The flux calculated using the evolution of NB was also higher in our study (105 kg N ha⁻¹) compared to that obtained by Dierking *et al.* [31] who observed an increase in NB of 40-60 kg N ha⁻¹, but their work concerned two year-old plants that produced 15-19 t DM ha⁻¹, *i.e.* half as much as in our experiment, which suggests they may not have reached their maximum biomass production.

No study has been reported in the literature concerning N fluxes in *Msin*. In our study, N fluxes were smaller in *Msin* than in *M×g*, due to lower biomass and N stocks in *Msin*. However, N remobilisation efficiency, relative to the maximum above-ground N content (NA_2), did not differ significantly between *M×g* and *Msin* both in spring and autumn. Autumn N remobilisation efficiency appeared to be greater for *Msin* Malepartus than *Msin* Goliath: a greater part of the N contained in the AP was transferred into the BP in *Msin* Malepartus compared to *Msin* Goliath in autumn 2017 ($p < 0.10$). This difference can be explained by the presence of stay-green shoots of the last cohort during winter observed in greater number for *Msin* Goliath than for *Msin* Malepartus. These green shoots could explain the higher NA in winter for *Msin* Goliath in 2017 and lower autumn N remobilisation. Moreover, these stay-green shoots exhibit re-growth at the time of the emergence of new buds, and may provide photo-assimilates at an early stage. The emission of the shoots of the different cohorts is known to be dependent on climatic conditions and particularly temperature [26]. Indeed, spring was warmer in 2017 than in 2016 (the mean temperature over May-June was 17.0°C in 2017 and 15.4°C in 2016) but late summer was cooler (the mean temperature in August-September was 16.5 and 18.5°C respectively). This suggests that variations in autumn N remobilisation for genotypes that presented cohort phenomena such as *Msin* could depend on climate.

In summary, *M×g* and *Msin* appeared to have relatively similar periods of remobilisation and similar N recycling efficiency. The remobilisation fluxes (SR and AR , in kg N ha⁻¹) were higher for *M×g* because of its higher biomass and N content. Since our trial was fertilised during two years out of four, our results may not apply to unfertilised marginal lands and poor soils in which further studies have to be conducted.

Components of nitrogen uptake and fertiliser nitrogen recovery

The N content of the whole plant (NT) varied widely throughout the year. Part of this variation was due to the significant N uptake (U) which occurred for the three miscanthus genotypes

Chapter 2 - Table 4. Nitrogen Use Efficiencies (NUE) by *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus: mean values calculated over two successive years.

Standard errors are indicated in parentheses. Letters indicate the results of Tukey tests applied to the comparison between genotypes for a given year (A, B $p < 0.05$, a, b, c $p < 0.10$).

Genotype	Crop age	WA_{max} , t DM ha ⁻¹	WA_5 , t DM ha ⁻¹	NUE_1 , kg DM kg ⁻¹ N (Eq. 8a)	NUE_2 , kg DM kg ⁻¹ N (Eq. 8b)
<i>M</i> × <i>g</i>	3	43 (5) A a	22 (6)A a	161 (32)A a	653 (99) A a
<i>Msin</i> Goliath	3	26 (3) B b	13 (3)AB ab	149 (19)A a	287 (70) B b
<i>Msin</i> Malepartus	3	18 (3) B c	10 (2)B b	138 (10)A a	338 (25) B b
<i>Msin</i> Goliath	4	25 (3) A a	14 (7)A a	121 (17)A a	219 (69) A a
<i>Msin</i> Malepartus	4	22 (3) A a	11 (3)A a	97 (3) A a	359 (45) A a

particularly during the first part of the growing season, from late May to early September. N uptake, estimated with Eq. 6, ranged from 159 to 243 kg N ha⁻¹ (Table 3, Figures 4c and 5). This exogenous N flux represented 66% to 81% of the maximum whole plant N stock (NT_3). It came partly from N fertiliser which corresponded to 43-87 kg N ha⁻¹ and mainly from other sources: initial soil mineral N stock, irrigation water, atmospheric deposition and soil organic matter mineralisation. The initial soil mineral N (measured in early spring) was rather stable between years (*ca.* 50 kg N ha⁻¹ in 0-150 cm and 30 kg N ha⁻¹ in 0-30 cm) and reached a minimum value of *ca.* 10 kg N ha⁻¹ in 0-30 cm (it was not measured below a 30 cm depth during the growing season), so it may have contributed at least 20 kg N ha⁻¹ to the N uptake. According to the mean nitrate content measured in the irrigation water, N input through irrigation represented *ca.* 30 kg N ha⁻¹. Atmospheric deposition represented about 9 kg N ha⁻¹ during the year [37]. If we take into account these contributions (N from fertilizer, initial soil mineral N, irrigation and atmospheric deposition), there remains 57 to 132 kg N ha⁻¹, which would have come from soil organic N mineralisation. This range of organic N mineralisation is in agreement with Mary *et al.* [38] who estimated that annual N mineralisation was around 140 kg N ha⁻¹ in the same soil type (but not in the same year and under bare soil). Another source of N for the plant might be N-fixing bacteria. The presence of N-fixing bacteria in the miscanthus rhizosphere has been demonstrated [39] but their importance for plant N-nutrition is not well known. Using a ¹⁵N experiment on first-year *M×g* plants, Keymer and Kent [39] estimated that 16% of the new plant N was derived by N fixation during the growing season.

The fertiliser-N recovery in the whole plant in 2016 varied between 36% in *Msin* Malepartus, 48% in *Msin* Goliath and 72% in *M×g*. The recovery in *Msin* was also low in 2017 (45% and 40% respectively). The lower recoveries in *Msin* can be explained by a smaller N demand since *Msin* has a smaller growth than *M×g*, and/or a delay in the developmental stages between genotypes, which means the date of fertiliser application for *Msin* Malepartus may not have been optimal (too early), which contributed to fertiliser-N losses.

Nitrogen balance demonstrates substantial nitrogen losses in all species

A very substantial decrease in the whole plant N content (NT) was observed between September and February for all genotypes: it reached 103 ±51 to 207 ±106 kg N ha⁻¹, which corresponds to 42 to 56% of the maximum N accumulated in the whole plant at the end of summer (NT_3). Indeed, the strong decrease in N accumulated in the AP during autumn and winter was much

greater than the increase in N stored in the BP during the same period. This explains why the autumn N remobilisation calculated based on *NB* was much lower than the N remobilisation calculated based on *NA*. Biomass losses also occurred during the same period (30-52% of the maximum biomass of the whole plant). N losses have already been observed in miscanthus in the literature but not really investigated. Calculations using data of Beale and Long [12] show that 33% of the whole plant N was lost between July and February in three year-old plants of *Miscanthus* × *giganteus*. Himken *et al.* [13] observed a decrease of 165 to 203 kg N ha⁻¹ between September and February, which corresponds to 40 to 47% of *NT₃* in unfertilized and fertilized plants respectively. The N lost by abscised leaves, which is not included in N calculated losses, represented only 19 to 27 kg N ha⁻¹ in our experiment and 31 kg N ha⁻¹ in Strullu *et al.* [14], and cannot be responsible for the unrecovered N. If biomass losses can be easily explained by root turnover and plant respiration, N losses necessarily corresponded to N fluxes towards the soil or the atmosphere. Four main hypotheses could explain these fluxes: H1) N storage in deep roots; H2) N rhizodeposition (release of organic and inorganic N from living plant roots) and root turnover (due to root mortality); H3) NH₃ volatilisation into the atmosphere; H4) N₂O emissions into the atmosphere.

H1) Roots of *M*×*g* and *Msin* were found down to a depth of 2.5-3.0 m (data not shown) whereas only rhizomes and roots were sampled in the 30-40 first cm. However, the amounts of N contained in these roots seem to be rather small. Neukirchen *et al.* [40] showed that N concentration and root dry mass decreased rapidly with depth. Ferchaud *et al.* [41] found that the N content in roots of five year-old *M*×*g* was 56 kg N ha⁻¹ in the 0-20 cm layer and only 10 kg N ha⁻¹ in the 20-60 cm layer. N storage in deeper roots was probably very low.

H2) The N rhizodeposition hypothesis has already been put forward by Heaton *et al.* [42] and supported by Hromádka *et al.* [43] who demonstrated that autumn root exudates of *M*×*g* are composed of protein and are used to feed the bacterial community. Rhizodeposition occurs in many plant species [44], and the amounts of N rhizodeposited could be important, as in ryegrass with 94 kg N ha⁻¹ calculated over two years of cultivation [45]. Moreover, part of the root N also returns to the soil through root turnover. Neukirchen *et al.* [40] measured an increase in the total root biomass between May and November of 3.3 t ha⁻¹ and a decrease of 2.4 t ha⁻¹ between November and March. *Miscanthus* produces new roots every year [46], but the proportion of root biomass that dies every year is unknown.

H3) The emission of N gases by plants has been put forward by many authors who observed N losses in spring barley, wheat or maize. For example, N losses varying between 45 to 81 kg N ha⁻¹ were reported for maize during grain filling [49]. The authors suggested that losses are linked to ammonia volatilization from the aerial parts of plants [47-49]. Schjørring and Mattsson [50] concluded a two-year survey by stating that N volatilisation from plants “*will represent in many areas a significant input of ammonia to the atmosphere and that NH₃ losses may become large enough to significantly affect crop N budgets*”.

H4) Emissions of nitrous oxide (N₂O) directly by plants have been reported in some studies made under controlled conditions. An emission rate of 0.17 and 0.11 ng N₂O g⁻¹ fresh weight week⁻¹ was measured in maize and wild barley [51] and a flux of 2.8 mg N₂O-N m⁻² day⁻¹ was found in rye-grass [52]. After N fertilisation in soil, potted beech (*Fagus sylvatica*) emitted between 0.4 and 2.0 µg N m⁻² leaf area h⁻¹ [53]. Chang *et al.* [54] demonstrated that potted canola can emit N₂O from its aerial parts when soil is water saturated. Lenhart *et al.* [55] observed in laboratory conditions that a few weeks old *Msin* produced 3 to 30 times more N₂O than other species such as maize or tobacco. Even if the growing conditions are far from that of the field, further investigations have to be carried out to verify this in field conditions.

Our results demonstrate that N uptake is the major contributor to the N accumulated in plants at the end of summer and that N losses into the soil or the atmosphere can be substantial in autumn and winter. Further investigations are required to elucidate the origin of such N losses. From a management point of view, the significance of these losses will depend on the main processes involved. If gaseous N losses are dominant, they will have to be reduced to a minimum to ensure sustainable biomass production. If losses are mainly explained by rhizodeposition and root turnover, then N remains in the soil system, contributes to the build-up of soil organic matter and can be available for the crop in the following years.

Miscanthus × giganteus and Miscanthus sinensis gave as good performances as other perennial species

The low contribution of spring N remobilisation to the N accumulated in AP may lead us to believe that *M×g* and *Msin* were not as efficient in terms of N recycling as expected. However, the spring remobilisation efficiency of the three studied miscanthus genotypes was comparable to other herbaceous species such as big bluestem (*Andropogon gerardii*) in which 46-58% of the rhizome N content was remobilised during spring [56], compared to 20-59% of the *M×g*

and *Msin* in our experiment. It was slightly lower than *Festuca rubra* and *Agrostis capillaris* in which 34% and 45% of *NA* came from BP, respectively [57], compared to 8-27% in our experiment. Concerning autumn remobilisation, efficiency for our *M×g*, *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus (63-75%) was similar or even higher than for big bluestem (58%) [56] or switchgrass (3-61%) [58-59]).

Another criterion to characterize the performance of N use by plants is the Nitrogen Use Efficiency (NUE). In our experiment, NUE was calculated as the amount of above-ground biomass produced per unit of above-ground N content. It did not differ significantly between *M×g* and *Msin* at WA_{max} but was higher for *M×g* than *Msin* in February because of a more important decrease in *NA* for *M×g*. Dierking *et al.* [35] calculated the NUE of four clones of *M×g*, as the ratio between *WA* and *NA* in January. Their values were much smaller than ours, with 126 to 297 kg DM kg⁻¹ N on average between unfertilized and fertilized treatments, in contrast to 653 kg DM kg⁻¹ N in February for our *M×g* (NUE_2). This difference can be explained by yields half as high as ours because of younger plants (one and two years old). Ra *et al.* [33] and Olson *et al.* [34] calculated NUE in different plants dedicated to biomass production as the ratio between *WA* and *NA* in autumn when *WA* was at its maximum. According to this method, our three genotypes presented NUE from 97 to 161 kg DM kg⁻¹ N (NUE_1), comparable to Johnsongrass (*Sorghum halepense*), napiergrass (*Cenchrus purpureus*), sugarcane and sorghum (70 to 125 kg DM kg⁻¹ N) and better than *Erianthus*, switchgrass and maize (76 to 97 kg DM kg⁻¹ N) [33]. Olson *et al.* [34] worked with a hybrid of sorghum that produced 50 t DM ha⁻¹ and thus presented a higher NUE of 370 kg DM kg⁻¹ N. We conclude that *M×g* and *Msin* had similar N recycling efficiencies and NUE to other perennial and annual species dedicated to biomass production.

Conclusion

This study provides the first experimental comparison of N pools and N fluxes (endogenous and exogenous) in *Miscanthus × giganteus* and *Miscanthus sinensis*. According to our first hypothesis, *M×g* has higher net N fluxes than *Msin* due to higher biomass. As a result, our second hypothesis was also verified: because of the same N requirement to produce a unit of biomass between species, the latter presented similar N recycling efficiencies. As it appeared to be as efficient in terms of N recycling as *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* can become an alternative to *M×g* for producing lignocellulosic biomass. Even if miscanthus is at least as efficient as other perennial crops concerning N recycling, it is able to sustain high N uptake which is the main source of the whole plant N stock at the end of summer. Consequent plant N losses were also concurrently measured at the end of the growing season. Although they have already been observed in miscanthus and other plant species, the processes involved have to be investigated, particularly the possible transfer on N from plant to soil through rhizodeposition and root turnover. To complete the understanding of N recycling mechanism in miscanthus, particularly *Miscanthus sinensis*, the link with development stages and growing season length associated with climate response has to be studied to determine mechanism triggers. Finally, to avoid competition with land-use for food production, miscanthus should be grown as much as possible on marginal lands. Further studies on N functioning on poor or degraded soils have to be carried out to help choose the most appropriate genotypes that combine decent yields and low environmental impacts.

References

1. Owusu PA, Asumadu-Sarkodie S (2016) A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation. *Cogent Engineering*, 3:1167990. <https://doi.org/10.1080/23311916.2016.1167990>
2. Islam MK, Hasanuzzaman M, Rahim NA (2017) Global Renewable Energy Resources, Smart Power Generation and Environmental Impacts. *International Journal of Renewable Energy Resources*, 7:15-19
3. Manzano-Agugliaro F, Alcayde A, Montoya FG, Zapata-Sierra A, Gil C (2013) Scientific production of renewable energies worldwide: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18:134-143. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.020>
4. Cadoux S, Ferchaud F, Demay C, Boizard H, Machet JM, Fourdinier E, Preudhomme M, Chabbert B, Gosse G, Mary M (2014) Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *Global Change Biology Bioenergy*, 6:425-438. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12065>
5. Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W (2007) N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions, European Geosciences Union*, 7(4):11191-11205. hal-00303019f
6. Sutton MA, Bleeker A, Howard CM, Bekunda M, Grizzetti B, de Wries W, van Grinsven HJM, Abrol YP, Adhya TK, Billen G, Davidson EA, Datta A, Diaz R, Erisman JW, Liu XJ, Oenema O, Palm C, Raghuram N, Reis S, Scholz RW, Sims T, Westhoek H, Zhang FS (2013). Our Nutrient World: the Challenge to Produce More Food and Energy With Less Pollution. Centre for Ecology & Hydrology on behalf of the Global Partnership on Nutrient Management (GPNM) and the International Nitrogen Initiative (INI).
7. Barosi R, Spinelli D, Fierro A, Jez S (2014) Mineral nitrogen fertilisers: environmental impact of production and use. In: *Fertilisers: Components, Uses in Agriculture and Environmental Impacts*, 1st edn. NOVA science publishers, pp 3–44
8. Hastings A, Clifton-Brown J, Wattenbach M, Stampfl P, Mitchell CP, Smith P (2008) Potential of *Miscanthus* grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, 28:465-472. <https://doi.org/10.1051/agro:2008030>
9. Smeets EMW, Lewandowski IM, Faaij APC (2009) The economical and environmental performance of miscanthus and switchgrass production and supply chains in a European

- setting. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:1230-1245. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.09.006>
10. Arnoult S, Brancourt-Hulmel M. (2015) A Review on *Miscanthus* Biomass Production and Composition for Bioenergy Use: Genotypic and Environmental Variability and Implications for Breeding. *Bioenergy Research*, 8:502-526. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9524-7>
 11. Clifton-Brown JC, Stampfl PF, Jones MB (2004) *Miscanthus* Biomass Production for Energy in Europe and its Potential Contribution to Decreasing Fossil Fuel Carbon Emissions. *Global Change Biology*, 10(4):509-518. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2003.00749.x>
 12. Beale CV, Long SP (1997) Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy*, 12(6):419-428. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00016-0)
 13. Himken M, Lammel J, Neukirchen D, Czepionka-Krause U, Olf HW (1997) Cultivation of *Miscanthus* under West European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilisation. *Plant and Soil*, 189:117-126. <https://doi.org/10.1023/A:1004244614537>
 14. Strullu L, Cadoux S, Preudhomme M, Jeuffroy MH, Beaudoin N (2011) Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus × giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research*, 121:381-391. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.01.005>
 15. Ruf T, Schmidt A, Delfosse P, Emmerling C (2017) Harvest date of *Miscanthus × giganteus* affects nutrient cycling, biomass development and soil quality. *Biomass and Bioenergy*, 100:62-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.010>
 16. Clifton-Brown JC, Chiang YC, Hodkinson TR. (2008) *Miscanthus*: Genetic Resources and Breeding Potential to Enhance Bioenergy Production. In: Vermerris W (ed) *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, pp 273-294
 17. Clifton-Brown J, Schwarz K, Hastings A. (2015) History of the development of *Miscanthus* as a bioenergy crop: From small beginnings to potential realisation. *Biology and Environment Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115B(1):1-13. <https://doi.org/10.3318/BIOE.2015.05>
 18. Glowacka K, Clark LV, Adhikari S, Peng J, Stewart JR, Nishiwaki A, Yamada T, Jørgensen U, Hodkinson TR, Gifford J, Juvik JA, Sacks EJ (2015) Genetic variation in *Miscanthus ×*

- giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones. *GCB Bioenergy*, 7:386-404. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12166>
19. Sun Q, Lin Q, Yi ZL, Yang ZR, Zhou FS (2010) A taxonomic revision of *Miscanthus* s.l. (*Poaceae*) from China. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164(2): 178–220. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01082.x>
 20. Lewandowski I, Clifton-Brown J, Trindade LM, van der Linden GC, Schwarz KU, Müller-Sämann K, Anisimov A, Chen CL, Dolstra O, Donnison IS, Farrar K, Fonteyne S, Harding G, Hastings A, Huxley LM, Iqbal Y, Khokhlov N, Kiesel A, Lootens P, Meyer H, Mos M, Muylle H, Nunn C, Özgüven M, Roldán-Ruiz I, Schüle H, Tarakanov I, van der Weijde T, Wagner M, Xi Q, Kalinina O (2016) Progress on Optimizing *Miscanthus* Biomass Production for the European Bioeconomy: Results of the EU FP7 Project OPTIMISC. *Frontiers in Plant Science*, 7(1620). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01620>
 21. Nurzhanova A, Pidlisnyuk V, Sailaukhanuly Y, Kenessov B, Trogl J, Aligulova R, Kalugin S, Nurmagambetova A, Abit K, Stefanovska T, Erickson L (2017) Phytoremediation of military soil contaminated by metals and organochlorine pesticides using *miscanthus*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 82(2):61-68.
 22. Zub HW, Brancourt-Hulmel M (2010) Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30:201-214. <https://doi.org/10.1051/agro/2009034>
 23. Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Andersson B, Basch G, Christian DG, Kjeldsen JB, Jørgensen U, Mortensen JV, Riche AB, Schwarz KU, Tayebi K, Teixeira F (2001) Performance of 15 *Miscanthus* Genotypes at Five Sites in Europe. *Agronomy Journal*, 93:1013-1019. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351013x>
 24. Belmokhtar N, Arnoult S, Chabbert B, Charpentier JP, Brancourt-Hulmel M (2017) Saccharification Performances of *Miscanthus* at the Pilot and Miniaturized Assay Scales: Genotype and Year Variabilities According to the Biomass Composition. *Frontiers in Plant Science*, 8:740. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00740>
 25. Thomas HL, Arnoult S, Brancourt-Hulmel M, Carrère H (2019) Methane Production Variability According to *Miscanthus* Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content. *BioEnergy Research*, 12(2):325-337. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5>
 26. Kobayashi K, Yokoi Y (2003) Shoot population dynamics of persisting clones of *Miscanthus sinensis* in the warm-temperate region of Japan. *Journal of Plant Research*. 116:443-453. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0119-1>

27. Stewart JR, Toma Y, Fernández FG, Nishiwaki A, Yamada T, Bollero G (2009) The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. *GCB Bioenergy*, 1:126–153. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x>
28. Zapater M, Catterou M, Mary B, Ollier M, Fingar L, Mignot E, Ferchaud F, Strullu L, Dubois F, Brancourt-Hulmel M (2017) A single and robust critical nitrogen dilution curve for *Miscanthus* × *giganteus* and *Miscanthus sinensis*. *Bioenergy Research*, 10(1):115-128. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9781-8>
29. Christian DG, Poulton PR, Riche AB, Yates NE, Todd AD (2006) The recovery over several seasons of ¹⁵N-labelled fertiliser applied to *Miscanthus* × *giganteus* ranging from 1 to 3 years old. *Biomass and Bioenergy*, 30:125-133. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.11.002>
30. Roncucci N, Nassi O Di Nasso N, Tozzini C, Bonari E, Ragaglini G (2015) *Miscanthus* × *giganteus* nutrient concentrations and uptakes in autumn and winter harvests as influenced by soil texture, irrigation and nitrogen fertilisation in the Mediterranean. *GCB Bioenergy*, 7:1009-1018. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12209>
31. Dierking RM, Allen DJ, Cunningham SM, Brouder SM, Volenec JJ (2017) Nitrogen Reserve Pools in Two *Miscanthus* × *giganteus* Genotypes under Contrasting N Managements. *Frontiers in Plant Science*, 8:1618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01618>
32. Hauck JD, Bremner JM (1976) Use of Tracers for Soil and Fertiliser Nitrogen Research. *Advances in Agronomy*, 28:219-266. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60556-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60556-8)
33. Ra K, Shiotsu F, Abe J, Morita S (2012) Biomass yield and nitrogen use efficiency of cellulosic energy crops for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 37:330-334. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.047>
34. Olson SN, Ritter K, Medley J, Wilson T, Rooney WL, Mullet JE (2013) Energy sorghum hybrids: Functional dynamics of high nitrogen use efficiency. *Biomass and Bioenergy*, 56:307-316. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.028>
35. Dierking R, Allen DJ, Brouder SM, Volenec JJ (2016). Yield, biomass composition, and N use efficiency during establishment of four *Miscanthus* × *giganteus* genotypes as influenced by N management. *Biomass and Bioenergy*, 91:98-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.005>
36. Lebas G (2012) Etude du métabolisme carboné et azoté de *Miscanthus* × *giganteus*. Thèse soutenue à l'Université de Picardie Jules Verne.

37. Autret B, Beaudoin N, Rakotovololona L, Bertrand M, Grandeau G, Gréhan E, Ferchaud F, Mary B. (2019) Can alternative cropping systems mitigate nitrogen losses and improve GHG balance? Results from a 19-yr experiment in Northern France. *Geoderma*, 342:20-33. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.01.039>
38. Mary B, Beaudoin N, Justes E, Machet JM (1999) Calculation of nitrogen mineralization and leaching in fallow soil using a simple dynamic model. *Eur. J. Soil Sci.* 50:549-566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00264.x>
39. Keymer DP, Kent AD (2014) Contribution of nitrogen fixation to first year *Miscanthus* × *giganteus*. *GCB Bioenergy*, 6:577-586. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12095>
40. Neukirchen D, Himken M, Lammel J, Czypionka-Krause U, Olf HW (1999) Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy*, 11(3-4): 301-309. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(99\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(99)00031-3)
41. Ferchaud F, Vitte G, Machet JM, Beaudoin N, Catterou M, Mary B (2016) The fate of cumulative applications of ¹⁵N-labelled fertiliser in perennial and annual bioenergy crops. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 223:76-86. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.02.030>
42. Heaton EA, Dohleman FG, Fernando Miguez A, Juvik JA, Lozovaya V, Widholm J, Zabolina OA, McIsaac GF, David MB, Voigt T.B, Boersma NN, Long SP (2010) *Miscanthus*: A Promising Crop. *Advances in Botanical Research*, 56:75-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381518-7.00003-0>
43. Hromádka L, Vranová V, Techer D, Laval-Gilly P, Rejšek K, Formánek P, Falla J (2010) Composition of root exudates of *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58(1):71–76. <https://doi.org/10.11118/actaun201058010071>
44. Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen Rg, Müller T (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:30-48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010>
45. Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2001) Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:439-448. PII: S0038-0717(00)00183-8
46. Sprunger CD, Oates LG, Jackson RD, Robertson GP (2017) Plant community composition influences fine root production and biomass allocation in perennial bioenergy cropping

- systems of the upper Midwest, USA. *Biomass and Bioenergy*, 105:248-258. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.07.007>
47. Schjørring JK, Nielsen NE, Jensen HE, Gottschau A (1989) Nitrogen losses from field-grown spring barley plants as affected by rate of nitrogen application. *Plant and Soil*, 116:167-175. <https://doi.org/10.1007/BF02214544>
 48. Harper LA, Scharpe RR, Langdale GW, Giddens JE (1987) Nitrogen Cycling in a Wheat Crop: Soil, Plant, and Aerial Nitrogen Transport. *Agronomy Journal*, 79(6):965-973. <https://doi.org/10.2134/agronj1987.00021962007900060004x>
 49. Francis DD, Schepers JS, Vigil MF (1993) Post-Anthesis Nitrogen Loss from Corn. *Agronomy Journal*, 85:659-663. <https://doi.org/10.2134/agronj1993.00021962008500030026x>
 50. Schjørring JK, Mattsson M (2001) Quantification of ammonia exchange between agricultural cropland and the atmosphere: Measurements over two complete growth cycles of oilseed rape, wheat, barley and pea. *Plant and Soil*, 228:105-115. <https://doi.org/10.1023/A:1004851001342>
 51. Hakata M, Takahashi M, Zumft W, Sakamoto A, Morikawa H (2003) Conversion of the nitrate nitrogen and nitrogen dioxide to nitrous oxides in plants. *Acta Biotechnologica*, 23:249-257. <https://doi.org/10.1002/abio.200390032>
 52. Chen X, Boeckx P, Shen S, Van Cleemput O (1999) Emission of N₂O from rye grass (*Lolium perenne* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 28:393-396. <https://doi.org/10.1007/s003740050510>
 53. Pihlatie M, Ambus P, Rinne J, Pilegaard K, Vesala T (2005) Plant-mediated nitrous oxide emissions from beech (*Fagus sylvatica*) leaves. *New Phytologist*, 168:93-98. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01542.x>
 54. Chang C, Janzen HH, Nakonechny EM, Cho CM (1998) Nitrous Oxide Emission through Plants. *Soil Science Society of America Journal*, 62(1): 35-38. <https://doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200010005x>
 55. Lenhart K, Behrendt T, Greiner S, Steinkamp J, Well R, Giesemann A, Keppler F (2019) Nitrous oxide effluxes from plants as a potentially important source to the atmosphere. *New Phytologist*, 221 :1398-1408. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01542.x>
 56. Hayes DC (1985) Seasonal Nitrogen Translocation in Big Bluestem During Drought Conditions. *Journal of Range Management*, 38(5):406-410. <https://doi.org/10.2307/3899709>

57. Bausenwein U, Millard P, Raven J.A (2001) Remobilised old-leaf nitrogen predominates for spring growth in two temperate grasses. *New Phytologist*, 152:283-290. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00262.x>
58. Yang J, Worley E, Wang M, Lahner B, Salt D.E., Saha M, Udvardi M (2009) Natural Variation for Nutrient Use and Remobilisation Efficiencies in Switchgrass. *Bioenergy Research*, 2:257-266. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9055-9>
59. Wayman S, Bowden RD, Mitchell RB. (2014). Seasonal Changes in Shoot and Root Nitrogen Distribution in Switchgrass (*Panicum virgatum*). *Bioenergy Research*, 7:243-252. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9365-9>

Comment optimiser l'étude du fonctionnement azoté ?

Etant donné que nous n'avons pas pu comparer $M \times g$ et M_{sin} durant la quatrième année à cause de l'épisode de verse en 2017 sur $M \times g$, il serait souhaitable de reconduire cette étude pour comparer les trois génotypes en quatrième année. Si l'on se permet de multiplier les années, et par exemple de reconduire cette étude de la troisième à la cinquième année, cela nous permettra également de déterminer si les trois génotypes ont atteint leur plateau de rendement et leur maturité.

Un des objectifs de cet article est de déterminer les périodes de remobilisations printanière et automnale de l'azote. A notre connaissance, notre étude est la première à caractériser aussi finement les dynamiques d'azote dans les plantes entières avec 16 prélèvements par an par rapport aux 2 à 10 prélèvements par an réalisés dans les autres études, et ce sur trois génotypes de miscanthus appartenant à deux espèces (Beale and Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Nassi o Di Nasso *et al.*, 2011 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Lebas, 2012 ; Purdy *et al.*, 2015a ; Roncucci *et al.*, 2015 ; Dierking *et al.*, 2017). Cette caractérisation fine nous a permis de déterminer des dates de début de remobilisation automnale de l'azote différentes des autres études. Cependant, le début et la fin de la remobilisation printanière de l'azote ne peuvent pas être datées précisément selon nos prélèvements puisque nous avons réalisé un prélèvement en février et un prélèvement en mai alors que les plantes avaient émergé depuis un mois déjà en mai. La fin de la remobilisation automnale n'est pas tout à fait précise et nous l'avons déterminée en novembre car le prélèvement suivant était positionné en février à la fin de l'hiver. A l'avenir, je propose donc de rajouter quelques prélèvements au printemps, notamment un prélèvement mi-mars et un prélèvement mi-avril, ainsi qu'un à deux prélèvements en décembre, pour mieux caractériser les périodes de remobilisation de l'azote et ainsi estimer plus finement les flux endogènes calculés.

La variabilité de nos données, pouvant limiter la mise en évidence de différences concernant le fonctionnement azoté entre génotypes, correspond à la littérature : Arnoult et Brancourt-Hulmel (2015) calculent des coefficients de variation assez importants (6 à 19%) à propos de variables concernant la production de biomasse aérienne et les caractères morphologiques dans leur revue rassemblant une vingtaine de publications internationales. De la même manière Purdy *et al.* (2015) présentent des erreurs standards allant jusqu'à la moitié de la valeur de la moyenne à propos de biomasses souterraines. Les calculs des flux endogènes d'azote des plantes, se basant sur les différences entre les stocks d'azote à des moments clés du cycle de végétation, sont fortement impactés par cette variabilité. Dans la littérature, cette

variabilité est peu soulignée car le nombre de plantes échantillonnées était parfois réduit : ainsi, alors que nous avons prélevé chaque fois 9 plantes par génotype et par prélèvement, Strullu *et al.* (2011) ont prélevé les parties souterraines de trois plantes par prélèvement, 8 plantes pour Beale et Long (1997), 20 plantes lors du premier prélèvement puis seulement 5 chez Himken *et al.* (1997) et 4 plantes pour Dierking *et al.* (2017). De plus, les écarts-types ou erreurs-standard ne sont pas systématiquement présentées sur toutes les publications (Beale and Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997). Dans notre essai, les neuf plantes prélevées ont été sélectionnées car leur nombre de tiges était proche du nombre médian de tiges par plante, basé donc sur des critères morphologiques. Malgré cela la variabilité inter-plantes, intra-bloc et intra-génotypique était assez importante. Strullu *et al.*, (2011) ont basé leur critère de choix de plantes prélevées sur le même principe mais ont seulement sélectionné la plante dont le nombre de tiges était le plus proche du nombre de tiges médian, sur 3 blocs différents, et leurs résultats présentent moins de variabilité que les nôtres. Il est probable qu'en ne prenant dans notre étude qu'une seule plante par bloc, au lieu de 3, nous réduisions la variabilité observée. Mais cela soulève une autre question : Serait-il possible de n'utiliser qu'une seule plante choisie grâce à des indicateurs morphologiques, qui serait alors considérée comme représentative de l'ensemble du peuplement et de baser nos conclusions sur celle-ci ? Au vu du recul que nous avons sur la variabilité chez le miscanthus, je ne pense pas que le prélèvement d'une seule plante soit envisageable pour le moment, à moins de baser le choix sur une combinaison de composantes de rendement telles que le nombre de tiges par plante, la hauteur de la plante et le diamètre des tiges. L'utilisation de l'imagerie pourrait aider à caractériser ces plantes, et surtout à multiplier le nombre de plantes phénotypées, comme c'est déjà le cas chez d'autres espèces comme la vigne (Demestihis *et al.*, 2018).

Le choix des dates clés utilisées pour le calcul des flux a également un impact important sur les périodes de recyclage déterminées. Ainsi, une autre solution est d'objectiver le choix de ces dates. Nous avons tenté de réaliser cette démarche par la modélisation des quantités d'azote des plantes en fonction des temps thermiques cumulés, en utilisant les données obtenues par bloc, par un modèle linéaire segmenté, c'est-à-dire qui comprend des points de rupture entre des segments linéaires de pentes différentes, grâce à la fonction *segmented* version 1.1-0 du package {segmented} du logiciel R version 3.5.1 (R Core Team, 2018) (Muggeo, 2008). 100 itérations de ce modèle ont été réalisées pour chaque cas et la répétition donnant les meilleurs résultats (meilleur R^2 , plus petit BIC) était choisie. Cette fonction nous a permis d'obtenir les dates en DJC des points de rupture du modèle, avec leur intervalle de confiance, correspondant

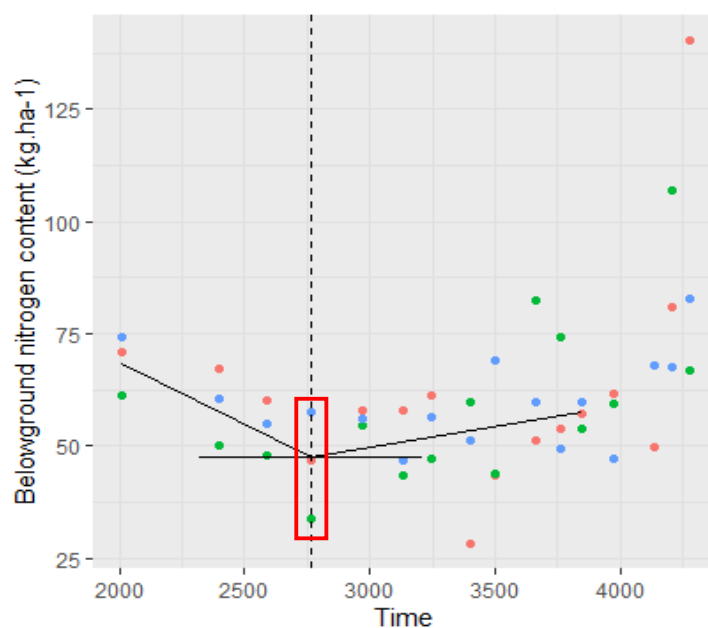


Figure 32. Résultat de la modélisation des quantités d'azote des parties souterraines modélisées par le modèle linéaire segmenté grâce à la méthode « segmented » chez *Miscanthus sinensis* Goliath en 2017

Les couleurs des points correspondent aux blocs. Les points encadrés en rouge correspondent aux points choisis par la méthode « visuelle ».

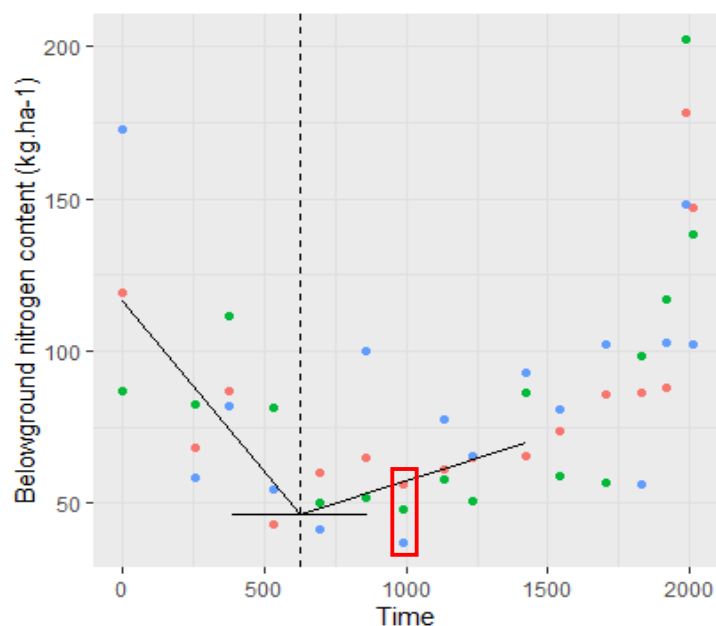


Figure 33. Résultat de la modélisation des quantités d'azote des parties souterraines modélisées par le modèle linéaire segmenté grâce à la méthode « segmented » chez *Miscanthus x giganteus* en 2016

Les couleurs des points correspondent aux blocs. Les points encadrés en rouge correspondent aux points choisis par la méthode « visuelle ».

alors aux quantités d'azote minimales ou maximales dans les plantes et donc aux dates clés utilisées dans le calcul des flux. Nous avons comparé les dates obtenues par cette méthode aux dates déterminées arbitrairement selon les méthodes déjà développées dans la littérature, à savoir le choix visuel des dates où les quantités d'azotes étaient maximales ou minimales. Des différences conséquentes de plusieurs semaines ont été trouvées entre les deux méthodes. À noter : l'utilisation des dates de la méthode « segmented » ne modifie pas les flux d'azote calculés. Dans certains cas, les dates obtenues par les deux méthodes correspondaient. Par exemple, chez *Msin* Goliath, la date de fin de remobilisation printanière déterminée par segmented était le 20/06/16, identique à celle déterminée selon la méthode visuelle (Figure 32). Mais dans certains cas, les dates étaient décalées de plusieurs semaines et le point pouvant être déterminé par la méthode « visuelle » n'était pas compris dans l'intervalle de confiance de la date estimée par la méthode « segmented ». C'était le cas de *Mxg* en 2016 où la fin de remobilisation printanière de l'azote était déterminée au 28/06/2016 avec un intervalle de confiance allant du 07/06/2016 au 18/07/2016 alors que la méthode « visuelle » nous permettait de déterminer cette date au 27/07/2016, qui n'est pas comprise dans l'intervalle de confiance de la méthode « segmented » selon la méthode visuelle (Figure 33). Cette méthode n'était sûrement pas adaptée à nos données.

Chapitre 3 : Stockage et remobilisation du carbone chez *Miscanthus × giganteus* et *Miscanthus sinensis* et comparaison avec l'azote

L'objectif de ce chapitre est de caractériser le stockage et la remobilisation des glucides non structuraux de réserve, et de comparer ce processus à celui de l'azote. Ce troisième chapitre constitue le manuscrit d'un second article en préparation pour le journal BioEnergy Research.

Carbon and nitrogen storage and their remobilisation in two miscanthus species

List of authors

J Leroy¹, C Giauffret¹, F Ferchaud², G Mouille³, J-O Narciso³, J Sechet³, E Mignot⁴, S Arnoult⁴,
M Brancourt-Hulmel¹, M Zapater^{1*}

¹BioEcoAgro Joint Research Unit, INRAE, Université de Liège, Université de Lille, Université de Picardie Jules Verne, 80200 Estrées-Mons, France

²BioEcoAgro Joint Research Unit, INRAE, Université de Liège, Université de Lille, Université de Picardie Jules Verne, 02000 Laon, France

³INRAE, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) F-78026 Versailles, France

⁴INRAE, UE GCIE, Estrées-Mons, F-80203 Péronne, France

*Corresponding author: marion.zapater@inrae.fr, Tel + 33(0)3 22 85 33 32

Résumé

Chez les cultures pérennes dédiées à la production de biomasse, les réserves carbonées assurent d'une part la pérennité en répondant à l'asynchronie entre la disponibilité du carbone et les besoins et d'autre part, participent à la maintenance hivernale en jouant un rôle d'osmoprotection contre le froid. La gestion de ces réserves pouvant être variable entre espèces, il est nécessaire de la caractériser chez les différentes espèces de *Miscanthus* pouvant être cultivées pour la production de biomasse. Notre essai a caractérisé les dynamiques des molécules principales de réserve du carbone, l'amidon et le saccharose, dans différentes parties du rhizome et les bas de tiges de trois géotypes de *Miscanthus*. Les teneurs maximales en glucides de réserve sont plus importantes chez *Miscanthus* × *giganteus* que chez les deux géotypes de *Miscanthus sinensis* (99 mg g⁻¹ vs 51 à 57 mg g⁻¹). Les proportions d'amidon et de saccharose au sein de ces réserves apparaissent différentes en fonction des espèces (70% d'amidon chez *M*×*g* contre 46% chez *Msin* Goliath). Nos résultats valident que le stockage du carbone dans le rhizome résulte de l'accumulation des glucides non structuraux au cours de la saison végétative alors que l'azote stocké provient majoritairement du recyclage à l'automne des nutriments des parties aériennes. Même si le rhizome reste le principal organe de stockage hivernal, les bas des tiges stockent provisoirement de l'amidon durant l'été. Les dynamiques sont variables entre les différentes parties du rhizome par exemple concernant l'évolution de la concentration en azote dans le rhizome principal et le rhizome associé aux bourgeons. Enfin, bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence un lien direct, l'émission continue de tiges pendant la saison végétative chez *Miscanthus sinensis* pourrait impacter la gestion des réserves carbonées et azotées. D'autres études, combinant un suivi rapproché du développement des plantes ainsi que des analyses des réserves carbonées et azotées doivent être réalisées pour le confirmer.

Abstract

In lignocellulosic perennial crops, on one hand, carbon reserves ensure perenniality by responding to the asynchrony between carbon supply and needs, and on the other hand, non-structural carbohydrate reserves participate in winter maintenance by acting as osmoprotection against cold. Since the management of these reserves can vary between species, their characterization for different *Miscanthus* species targeted for biomass production is of first interest. Our trial characterized the dynamics of the major carbon reserve molecules, starch and sucrose, in different parts of the rhizome and shoot bases in three *Miscanthus* genotypes. The maximum carbohydrate concentrations were higher in *Miscanthus* × *giganteus* than in the two studied *Miscanthus sinensis* genotypes (99 mg g⁻¹ vs 51 to 57 mg g⁻¹). Starch and sucrose proportions within the reserves appear to differ between species (70% of starch in *M*×*g* opposite to 46% for *Msin* Goliath). Our results also validate that rhizome carbon storage results from the accumulation of carbohydrates during the growing season, whereas the stored nitrogen comes mainly from the nutrients recycling from the above-ground parts during the fall. Although the rhizome remains the main winter storage organ, the shoot bases temporarily stored starch during

the summer. The dynamics vary between the different parts of the rhizome, for instance concerning nitrogen concentration in the main rhizome and the rhizome associated to the buds. Finally, although we were not able to show a direct link, the continuous emission of shoots during the vegetative season in *Miscanthus sinensis* could impact the management of C and N reserves. Further studies, combining monitoring of plant development and carbohydrate and nitrogen reserve patterns, are needed to confirm this.

Mots-clés

Plante pérenne, culture dédiée, biomasse lignocellulosique, stockage, amidon, azote, glucides non structuraux, relation source-puit

Keywords

Perennial crop, dedicated crop, lignocellulosic biomass, storage, starch, nitrogen, non-structural carbohydrates, sink-source relation

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge all the persons who participated in the work: Marie-Chantal Mansard, Marie Heumez, Stéphanie Lavette, Laura Fingar, Damian Martin, Servan Lenoir, Tiffany Trevaux, David Lanterne, Julia Deschamps, Mathilde Goutin. We would also like to thank the team “Adhésion cellulaire chez les plantes”, directed by Grégory Mouille, who warmly welcomed us to carry out the dosages of interest molecules and particularly Salem who also participated to the grinding. Finally, we wish to thank Andrea Rau for her precious help.

Abbreviations

AP: Above-ground parts

BP: Below-ground parts

C: Carbon

M×g: *Miscanthus* × *giganteus*

Msin: *Miscanthus sinensis*

Msin Goliath: *Miscanthus sinensis* Goliath

Msin Malepartus: *Miscanthus sinensis* Malepartus

N: Nitrogen

OD: Optical Density

Rhi_SB: the four centimetres of rhizome associated to the mature shoots

Rhi_buds: the four centimetres of rhizome associated to the buds

Rhi_M: the remaining of the rhizome called the main rhizome

SB: the stembases of the mature shoots

VSP: Vegetative Storage Protein

Introduction

Miscanthus × giganteus (*M×g*) is known as a good lignocellulosic biomass producer as it presents high yields and low environmental impacts (Hastings *et al.*, 2008; Cadoux *et al.*, 2014). These low environmental impacts are partly due to the nutrient recycling mechanism, a characteristic of perennial plants that ensures their longevity by constituting C and N reserves in vegetative organs (Guiboileau *et al.*, 2010). Indeed, miscanthus remobilizes nutrients from its above-ground parts (AP) at the end of the growing season to store them into below-ground parts (BP) during autumn and winter, which finally supports new shoots development before the plants can acquire autonomously carbon (C) and nutrients during the following spring (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Christian *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2009; Strullu *et al.*, 2011; Roncucci *et al.*, 2015). Currently, only a single clone of *M×g* is cultivated, limiting end-uses due to its unique biomass composition and presenting risks for crop security in case of climatic or pathogen events (Clifton-Brown *et al.*, 2015; Glowacka *et al.*, 2015). Varietal offer has to be expanded (Jørgensen, 2011) and *Miscanthus sinensis* (*Msin*) is a promising species as (i) it is more tolerant to different abiotic stresses than *M×g* (Clifton-Brown *et al.*, 2001; Lewandowski *et al.*, 2016), (ii) presents a large genetic diversity (Sun *et al.*, 2010), (iii) contrasted biomass composition (Zub and Brancourt-Hulmel, 2010; Belmokhtar *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2019), and (iv) is as efficient as *M×g* concerning nitrogen (N) recycling (Leroy *et al.*, submitted). These differences between the two miscanthus species could be linked with variations of their growth and development cycles. Indeed, as reported in literature (Arnoult and Brancourt-Hulmel, 2015) and shown in ***the first chapter of this manuscript***, some *Msin* genotypes have greater stem number than *M×g* although the latter presents a higher biomass production and a greater stem height than the former. Moreover, *M×g* emitted a single group of shoots (named cohort) at the beginning of the growing season that totally senesced during winter, while *Msin* emitted new shoots throughout the growing season and some of the latest emitted shoots even stays green during winter (Kobayashi and Yokoi, 2003; Stewart *et al.*, 2009). The length of the growing season varies also between genotypes as the total senescence of *M×g* and *Msin* Goliath occurred later than *Msin* Malepartus senescence (***first chapter of this manuscript***).

Carbon is the main constituent of plant biomass and constitutes almost half of the plant's dry matter in *M×g* harvested in February (Lewandowski *et al.*, 2000). It plays a structural role but also provides energy to physiological processes. Since 1893, it has been accepted that C is assimilated *via* photosynthesis although the mechanism was not yet fully understood at that

time (Barnes, 1893). During Calvin-Benson-Bassham cycle more commonly known as the Calvin cycle, CO₂ is reduced by RubisCo thanks to the initially produced energy by photochemical reactions, to form trioses-phosphates. *Miscanthus* is a C₄ species (NADP-ME type) which has a particular anatomy with large parenchyma cells surrounding vascular bundles, called Kranz anatomy (Greef and Deuter, 1993). This type of metabolism is characterised by a CO₂ assimilation pathway parallel to the Calvin cycle in the mesophyll cells: CO₂ is incorporated into oxaloacetate (a four-carbon molecule) by the PhosphoEnolPyruvate carboxylase (PEP carboxylase) called Hatch and Slack pathway (Hatch and Slack, 1966). This pathway allows to assimilate more CO₂, which will then feed the Calvin cycle in the cells of the perivascular bundle sheath, and thus be more efficient in terms of photosynthesis (Hatch and Slack, 1966; Lal, 2018b). The triose phosphates produced by the Calvin cycle can be used immediately for glycolysis or exported out of the chloroplast for sucrose biosynthesis, which is then transported through the phloem from these source plant parts to sink parts for growth, or to storage parts (Smith and Smitt, 2007; Zeeman, 2010). The time between triose phosphate synthesis and delivery to sink organs is variable and depends on the distance between organs, but also on environmental conditions, sap viscosity, and plant and phloem anatomies (Dietze *et al.*, 2014). For instance, the translocation time from photosynthates to roots is less than a day for woody shrubs of about 1 m and can reach more than 10 days for trees measuring more than 25 m (Dietze *et al.*, 2014). The triose phosphates can also be transformed into transitory starch, stored temporarily during the day in chloroplasts. The transitory starch storage pathway competes with the exportation pathway as sucrose for rapid use competes according to the growth of the plant (Purdy *et al.*, 2015b). Transitory starch is degraded during night to provide substrates for leaf respiration while sucrose is exported to the different plant parts, for growth and/or reproduction and/or long term storage depending the strength of the sink (Chapin *et al.*, 1990; Smith and Smitt, 2007; Zeeman, 2010; Lal, 2018a). When photosynthates exceed the need for growth, accumulation in the long-term storage organs occurs and photosynthates are transported as sucrose and then transformed into starch in storage organs. Note that studies tend to show that storage pathway is not only provided once other sinks are filled, but represents a sink that can compete with the other sinks like growth (Chapin *et al.*, 1990; Dietze *et al.*, 2014). Carbon reserves are very important as they provide, respiration, osmoregulation, respond to the asynchrony between supply and demand (plant maintenance, plant regrowth at spring or after defoliation or climatic events ...), provide substrates for defence molecule synthesis and supply nutrients to mycorrhizal fungi and/or symbiotic or free living bacteria in exchange for limiting nutrients (Dickson, 1989; Chapin *et al.*, 1990; Dietze *et al.*, 2014; Sarath *et al.*, 2014; Hartmann

and Trumbore, 2016). The accumulation of carbohydrates during the growing season have also been reported to be used in autumn to provide energy for assimilation of nitrates during summer in *Urtica dioica* known as stinging nettle (Schulze *et al.*, 2019). Like N reserves, they ensure the perennality of the crop. A part of non-structural carbohydrates as starch can be not remobilized and thus sequestered (Millard and Grelet, 2010). The stress protection role and the osmotic function of non-structural carbohydrates could be at the origin of the non remobilizable C pool (Dietze *et al.*, 2014). The main C reserve molecule in plants is starch (Chapin *et al.*, 1990), but some species stored C as sucrose like sugarcane or some sorghums (*Sorghum saccharum*), but also as fructans like *Allium* species, *Cichorium* (chicory) and *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke) (Heller, 1969; Lal, 2018a). Despite the phylogenetic proximity between miscanthus, sugarcane and sorghum (Hodkinson *et al.*, 2002; Swaminathan *et al.*, 2010), the main carbohydrate storage form found in rhizome and roots of *Mxg* is starch (Lebas 2012; de Souza 2013; Purdy *et al.*, 2015). Lebas (2012) showed that sucrose was also accumulated in rhizome of *Mxg* but in a smaller proportion than starch: 5% of the dry matter of the rhizome was constituted by sucrose in contrast to 20% for starch. In miscanthus, starch presents gradual accumulation from late spring to early winter that can reach 100 to 200 mg g⁻¹ (Lebas, 2012; de Souza *et al.* (2013); Purdy *et al.* (2015)).

Few studies characterize C storage in miscanthus and most of them focused on a single species only: Masuzawa and Hogetsu (1977) studied wild *Miscanthus sacchariflorus* and Lebas (2012) characterized carbohydrates dynamics in *Mxg*. To our knowledge, only Purdy *et al* (2015) compared the carbohydrates remobilisation and storage between different species: *Mxg*, *Msin* and *Miscanthus sacchariflorus*. *Mxg* and *Msin* present growth differences and particularly the persistence of stay-green small shoots during winter in *Msin*, which were able to recover growth at spring, when new buds emerge. Hence, in natural conditions with no harvest, we can hypothesize that *Mxg* has to rely only on its C reserves to provide the energy necessary for growth while *Msin* could produce photoassimilates sooner, assuming that the remaining green leaves are still functional according to the definition of “functional stay-green” given by (Hörtensteiner, 2009). It can be hypothesized that *Mxg* has greater C reserve stocks than *Msin*, and accordingly, a different C seasonal dynamics. This different types of C management according to plant functional or ecological strategies (evergreen, deciduous, pioneer, shade tolerant) have already been observed in trees as well as in herbaceous perennial grass. In trees, while the evergreen black spruce photosynthesizes early in the season, the deciduous western blend uses its C reserve to regrowth in spring (Furze *et al.*, 2018). In herbaceous

perennial grass, differences in carbohydrates dynamics were found according to their ecological strategies types (evergreen, deciduous, pioneer...) (Kanai and Masuzawa, 1993, Maslova *et al.*, 2010). In addition, functional strategies related to survival traits have been reported to influence the localisation of plant storage organs in tropical trees: for example, short-lived trees with rapid growth stored starch in parenchyma where it can be easily remobilised while long-lived trees with slow growth stored it in wood fibers (Herrera-Ramírez *et al.*, 2021). In the same way, it should be noted that the sink or source function of a particular organ has been reported to be reversible during the plant life in maize (Girardin, 1998).

As miscanthus rhizome could be separated into different perennial storage organs or compartment depending on their age (old rhizome and young rhizome, this later being directly attached to buds or stems of the current year), it is legitimate to wonder whether the different parts of the rhizome could play different roles in the storage and remobilisation of nutrients. Furthermore, considering the phylogenetic proximity between maize and miscanthus, and that stembases are storage organs in maize (Girardin, 1998), we wonder if the stembases in miscanthus also play a storage role.

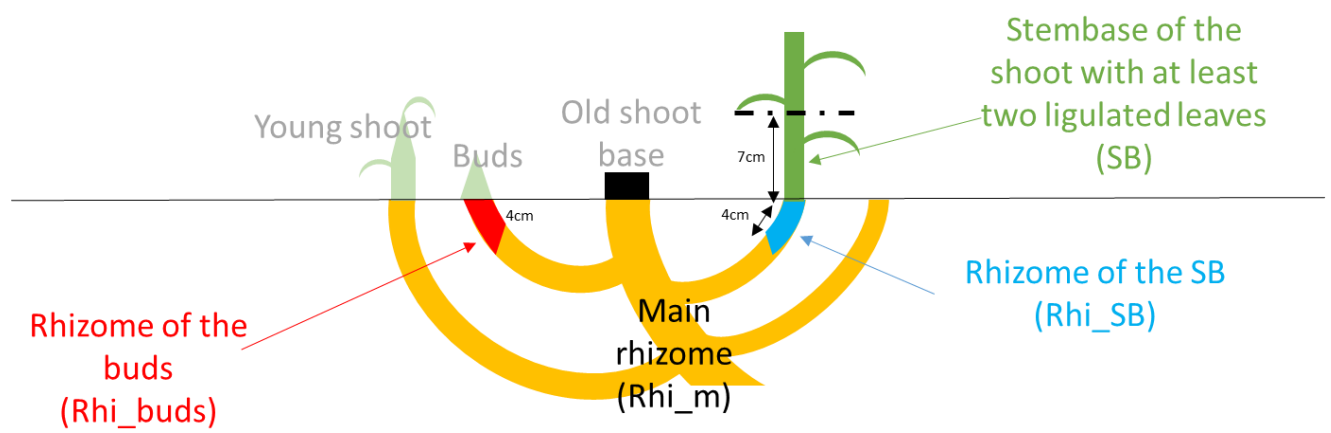
Nitrogen is also an essential element for plants as it is a constituent of proteins and enzymes, is involved in many metabolic processes and plays an important role in the biomass production. At the scale of the growing season, C and N storage and remobilisation in plants are not driven by the same mechanisms: C storage appears during the growing season, when photosynthates are in excess compared to growth needs, which avoids down regulation of photosynthesis caused by an accumulation of sugars in leaves (Chapin *et al.*, 1990; Millard and Grelet, 2010; Purdy *et al.*, 2015). N storage is intimately linked to plant phenology, seasonally programmed and linked to nutrients recycling during senescence (Chapin *et al.*, 1990; Millard and Grelet, 2010; Sarath *et al.*, 2014). N recycling is well characterized for *Mxg* and *Msin* (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Strullu *et al.*, 2011; Roncucci *et al.*, 2015; Dierking *et al.*, 2017; Leroy *et al.*, submitted). It was characterized according to changes in AP and BP N stocks during the growing season. But these methods may not distinguish N involved in rhizome metabolism and structure from storage. One alternative to work on storage consists on studying specific storage compounds. On the one hand, studies on different species focused on reserve molecules and pointed out proteins and amino acids as reserve molecules. Amino acids are not only storage molecule but also N preferential transport molecule (Dickson, 1989; Ourry *et al.*, 2001; Lambers *et al.*, 2008; Bhatla and Lal, 2018). On the other hand, soluble proteins are not only storage compounds, but also play a role in metabolic or enzymatic pathways (Heller,

1969). In this way, to characterize proteins related to storage, researchers highlight specific proteins called Vegetative Storage Proteins (VSPs) that are soluble proteins accumulated in vegetative parts of some plant species, not in seeds, when resources are in excess, representing at least 5% of the total soluble proteins (Staswick 1990; Ourry *et al.*, 2001). They participate to create N reserves during autumn and winter and are degraded during spring to support plant growth, or they can also support regrowth of herbaceous plant after defoliation during growing season (Volenec *et al.*, 1996; Ourry *et al.*, 2001; Avice *et al.*, 2003). There is a wide range of VSPs described in literature, and despite their generally common subcellular vacuolar location as proteins bodies, it appears to be little homology between VSPs from different species in term of molecular weight (from 15 to 60 kDa) and residual catalytic activities (Volenec *et al.*, 1996; Ourry *et al.*, 2001). For instance, in alfalfa or white clover, they measured 15, 19, 32 and 57 kDa and represent 40% of the total soluble proteins (Avice *et al.*, 2003). Volenec *et al.* (1996) reviewed that VSPs in soybean measured 27 and 29 kDa and Valenzuela Núñez *et al.* (2011) found a 26 kDa VSP in the stem sap wood of pedunculate oak which represents 50% of the soluble proteins at leaf shedding. Ourry *et al.* (2001) add another characteristic to the definition of VSP: “Their pattern of accumulation / mobilization should parallel the flux of N between source and sink tissues evaluated for example by ^{15}N labelling”. Indeed, few studies carried out on different forage species highlight proteins showing dynamics of accumulation and release like VSP proteins but which are not VSPs but still seemed to have a N storage role (Ourry *et al.*, 2001). In miscanthus, few studies dealt with N storage and highlight amino acids and proteins as storage molecules in BP (Lebas, 2012; Dierking *et al.*, 2017). Proteins are present in BP, declined during the spring and are accumulated during autumn, suggesting there can be VSPs (Dierking *et al.*, 2017). But Lebas (2012) did not show VSPs through cytological study. Although Lebas (2012) showed that in *Mxg* the main N reserve in BP is amino acids, soluble proteins follow the seasonal dynamic of amino acids in rhizome (Dierking *et al.*, 2017; Lebas, 2012). Accordingly, they can be used to characterize rhizome N filling.

In most miscanthus studies, C and N were conducted separately (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Strullu *et al.*, 2011; Roncucci *et al.*, 2015; Purdy *et al.*, 2015a; Dierking *et al.*, 2017). Only the study of Masuzawa and Hogetsu (1977) and the thesis of Lebas (2012) were conducted to characterize the storage of these two molecules at the same time but they did not share a common analyse.

The present study analysed the differences in C and N storage and remobilisation molecules and dynamics, in both *Miscanthus x giganteus* and *Miscanthus sinensis* for the first time. The

first objective was to characterize the C and N reserve molecules in the three genotypes. Then we could analyse the differences between genotypes C and N molecules patterns and dynamics. We also determined if C and N reserve molecules dynamics were interconnected. Finally, we characterized the spatial distribution of C and N reserves and the potential storage role of the different compartments. For that purpose, stem bases and rhizome were separated into different functional compartments according to their sink or source role during the growing season.



Chapter 3 - Fig1. Schematic representation of the different functional compartments according to their source or sink role. Above-ground parts: SB: stembase; Below-ground parts: Rhi_m: main part of the rhizome, Rhi_SB: rhizome associated to stembase, Rhi_buds: rhizome associated to buds

Materials and methods

Experimental site and trial design

The field was located in northern France in Estrées-Mons (49°87 N, 3°01 E) on a deep silt loam soil (Haplic Luvisol, IUSS Working Group WRB, 2006). The oceanic climate is characterized by an average temperature of 11.0°C and precipitation of 640 mm during the last ten years. Three contrasted genotypes were planted by hand in spring 2014 at a density of 2.08 plants m⁻² in three blocks according to a complete block design: *Miscanthus* × *giganteus* (*M*×*g*) triploid from ADAS, Yorkshire, UK, *Miscanthus sinensis* Goliath (*Msin* Goliath) tetraploid and *Miscanthus sinensis* Malepartus (*Msin* Malepartus) diploid both from Plant Estate, Netherlands. Crop emergence was observed for the three genotypes on April 5th in 2016 during the third growing year and April 23rd in 2017 during the fourth growing year. Irrigation and fertilization were applied to ensure non-limiting growing conditions each year (for further information, see Leroy *et al.*, submitted).

Biomass sampling

We conducted a fine temporal characterisation of biomass production of the three genotypes with sixteen whole plant sampling dates per year between February and November during the third (2016) and fourth (2017) growing years. The samples were separated in above-ground part (AP) and below-ground part (BP), for further information see Leroy *et al.* (submitted). To avoid the diurnal changes in carbohydrates, we followed the recommendation of Purdy *et al.* (2015), and the sampling was realised in the morning during three consecutive days, at the rate of one sampled block per day. AP were immediately weighted, BP (rhizome and roots) with stembases were washed with cold water and then separated into different compartments in relation with their supposed sink or source functions. Indeed, we considered two types of tissues: the young tissues hypothesized as C and N sinks corresponding to the four centimetres of rhizome close to the buds (Rhi_buds), the four centimetres of rhizome close to the mature shoots (shoots with at least two ligulated leaves, Rhi_SB) and these stembases (SB), and older tissues considered corresponding to the main rhizome (Rhi_m) (Fig1). The threshold of two ligulated leaves was arbitrary decided. Indeed, the transition to autotrophy in maize occurred at stage “four ligulated leaves” (Deleens *et al.*, 1994). Although miscanthus is a perennial plant with large below-ground reserve organ compared with maize which originated from the germination of a seed, we hypothesized that the greatest shoot number of miscanthus occurring

at early stage maybe forces it to turn its shoots in self-sufficient more rapidly than maize. Moreover, miscanthus photosynthesizes with the same efficiency at 20°C and 14°C, whereas maize decreases its photosynthesis at 14°C compared to 20°C (Naidu *et al.*, 2001; Naidu and Long, 2004). This ability of miscanthus to photosynthesize at a lower temperature than maize allows it to have self-sufficient shoot before the stage of “four ligulated leaves”. The four compartments previously defined were weighted. Subsamples were cut into small pieces on ice, frozen with liquid N and stored at -80°C before being lyophilized (VirTis BenchTop Pro, SP Scientific), ground in a modified paint agitator (SKANDEX SK350) to finally be stored at ambient temperature. The remaining of the compartments were dried at 65°C during 96 hours to determine dry matter weight.

Plant nitrogen content

The subsamples used to determine compartments biomass were ground (<500 µm) in order to analyse their N concentration using an elemental analyser (FLASH EA 1112 series, Thermo Electron, Germany). The compartments N content was determined using the following equation:

$$N \text{ content} = W \cdot [N]$$

where N content is the N content of the compartment (g plant⁻¹), W is the amount of dry matter (kg plant⁻¹) and nitrogen concentration, [N], is the N concentration of the compartment (g kg⁻¹).

Starch and soluble sugars extraction

20 mg of each lyophilised sample was weighted. Soluble sugars were extracted by four washes with ethanol 80% (v/v) at 80°C during respectively 20 and 10 minutes for the two firsts and at ambient temperature during respectively 20 and 10 minutes for the two others. Between washes, centrifugation was realised at 1,800g for 10 minutes to separate soluble sugars and starch. The supernatant containing the soluble sugars was stored in another test tube and the pellet stayed in the tube to be extracted again by ethanol. At the end, the tube with soluble sugars was stored at -80°C and the pellet was dried at ambient temperature during a night and then stored at -80°C.

Starch analysis

Starch determination was realised adapted from Megazyme modified protocol (Megazyme Total Starch Assay Procedure, Megazyme International, Ireland). Frozen pellet of starch was suspended in 200 μL of a KOH solution (0.2 M), mixed and incubated for 15 minutes at 90°C to gelatinize the starch grains. Then, 10 μL of α -amylase (Megazyme), 10 μL of amyloglucosidase (Megazyme) and 640 μL of sodium acetate buffer were added and incubation at 50°C during 30 minutes was realised. Centrifugation at 1,800g during 5 minutes separated supernatant with D-D-glucose from starch degradation and debris stayed in pellet. 600 μL of GOPOD Reagent (Megazyme) was finally added to 10 μL of supernatant, and after a last incubation at 50°C during 20 minutes, absorbance was read at 510 nm with a spectrophotometer (SpectrostarNano, BMG Labtech, Germany). Starch concentration was determined by comparison with a standard range of D-glucose (Megazyme). The detection limit of this test in our experimentation conditions was an optical density (OD) of 0.02 corresponding to a concentration of 1,96 mg of starch g^{-1} . 6% of our data were under this limit and were not taken into account.

Soluble sugars quantification

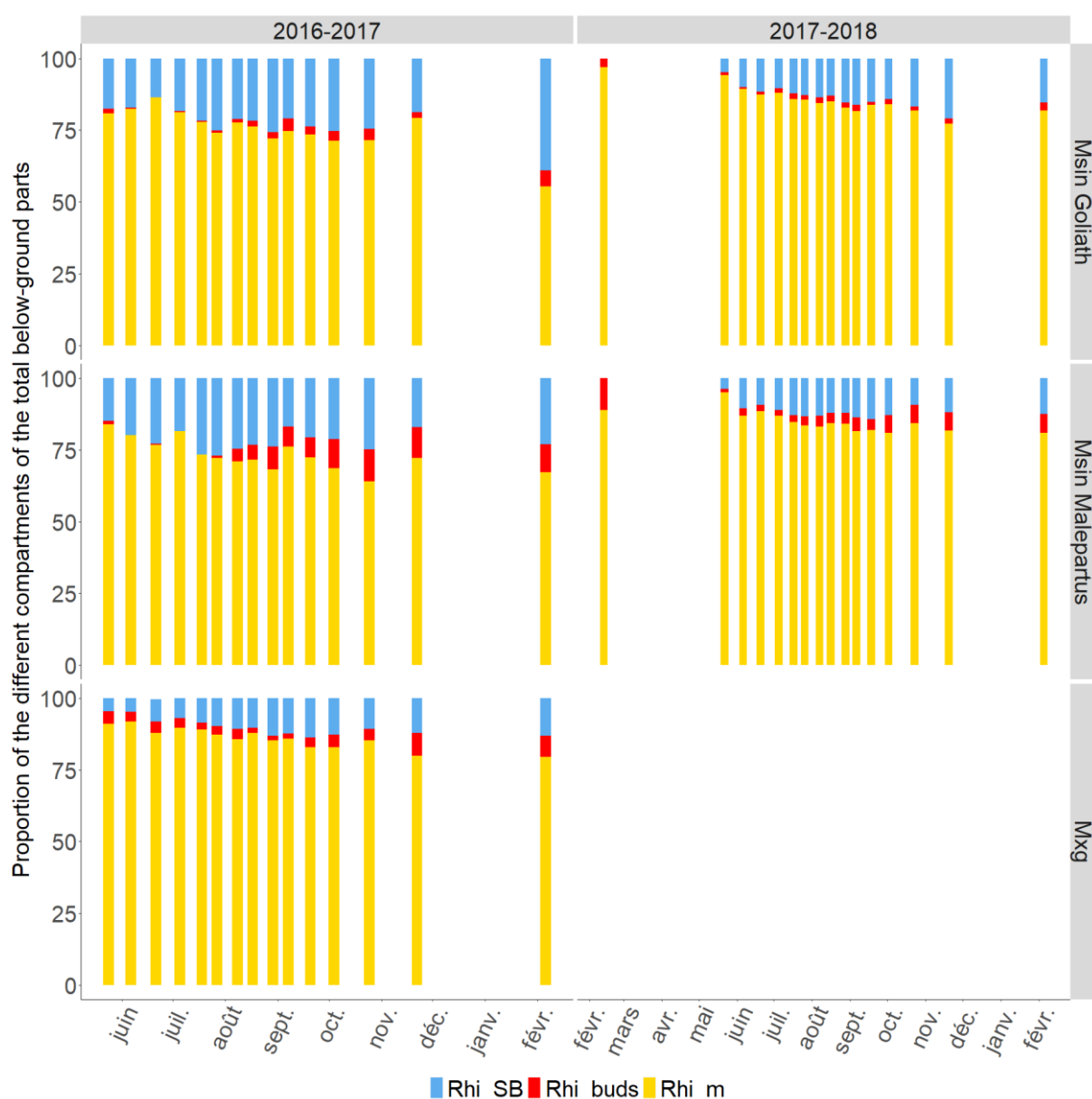
Sucrose dosage was also realised adapted from Megazyme modified protocol (Sucrose, D-Fructose and D-Glucose Assay Procedure, Megazyme International, Ireland). Frozen supernatant of soluble sugar was dried in a centrifugal evaporator (Thermoscientific SPD131DDA). Pellet was suspended in a 1200 μL of distilled water to dilute them, and mixed. Aliquots of 10 μL were placed in a 96-well microplate then 20 μL of β -Fructosidase (Megazyme) were added and incubated at ambient temperature during 5 minutes. Then 172 μL of distilled water, 10 μL of buffer 1 (Megazyme) and 10 μL of NADP⁺/ATP (Megazyme) were added, mixed and incubated at ambient temperature during 3 minutes. A first absorbance A1 was read at 340 nm. 20 μL of HK/G6P-DH (Megazyme) were added, mixed and incubated at ambient temperature during 20 minutes. NADPH from sucrose degradation was photometrically quantified at 340 nm (A2). Sucrose concentrations were determined according to calculations given by Megazyme protocol. The detection limit of this test in our experimentation conditions was an optical density (OD) of 0.002 corresponding to a concentration of 0.1 mg g^{-1} . 1% of our data concerning sucrose were under this limit and were consequently not taken into account.

Proteins extraction and dosage

For the proteins extraction, 500 μL of cold extraction buffer (Tricine 100 mM, CaCl_2 40 mM, Triton x-100 0,05% v/v, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Protease Inhibitor tablets) were added to 50 mg of milled sample. Centrifugation at 1.500 g during 15 minutes at 4°C separated soluble proteins in supernatant from debris in pellet. Proteins dosages were realised according to Bradford method: 10 μL of supernatant were mixed with 500 μL of Protein Dye Reagent (Bio-rad) diluted to 1/5th. Absorption of 200 μL of these solutions was read at 595 nm with a spectrophotometer (SpectrostarNano, BMG Labtech, Germany) to quantify soluble proteins and concentrations were determined by comparison with standard ranges of Bovine Serum Albumin (Bio-Rad). The detection limit of this test in our experimentation conditions was an optical density (OD) of 0.05 corresponding to a concentration of 0.37 mg g^{-1} . 7% of our data were under this limit and were not taken into account.

Statistical analysis

Statistical analyses have been performed with R Software version 4.0.3 (R Core Team, 2020). Linear models (ANOVA), performed with `anova` function of the package `{stats}`, were used to make the variance analysis with genotype, sampling, block, interaction between genotype and sampling and interaction between genotype and block as fixed effects for each compartment. The same model construction was used to analyse the variance for each genotype between (i) Rhi_m and Rhi_buds and (ii) Rhi_m and Rhi_SB with compartment, sampling date, block, interaction between compartment and sampling date and interaction between compartment and block as fixed effects. It is important to note that possible differences between years could be attributed to age, climate or sampling date effects that were impossible to partition. Spearman's correlation analyses were realised with `corr` function of the package `{stats}` to determine if there are positive or negative significant correlations between supposed storage molecules concentrations and contents in Rhi_m.



Chapter 3 - Fig2. Seasonal dynamics of the proportions (%) of the different belowground functional compartments (Rhi_buds, Rhi_m and Rhi_SB) relative to the total biomass of the below-ground parts of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years.

Rhi_m: main part of the rhizome, Rhi_SB: rhizome associated to stembases, Rhi_buds: Rhizome associated to buds

Results

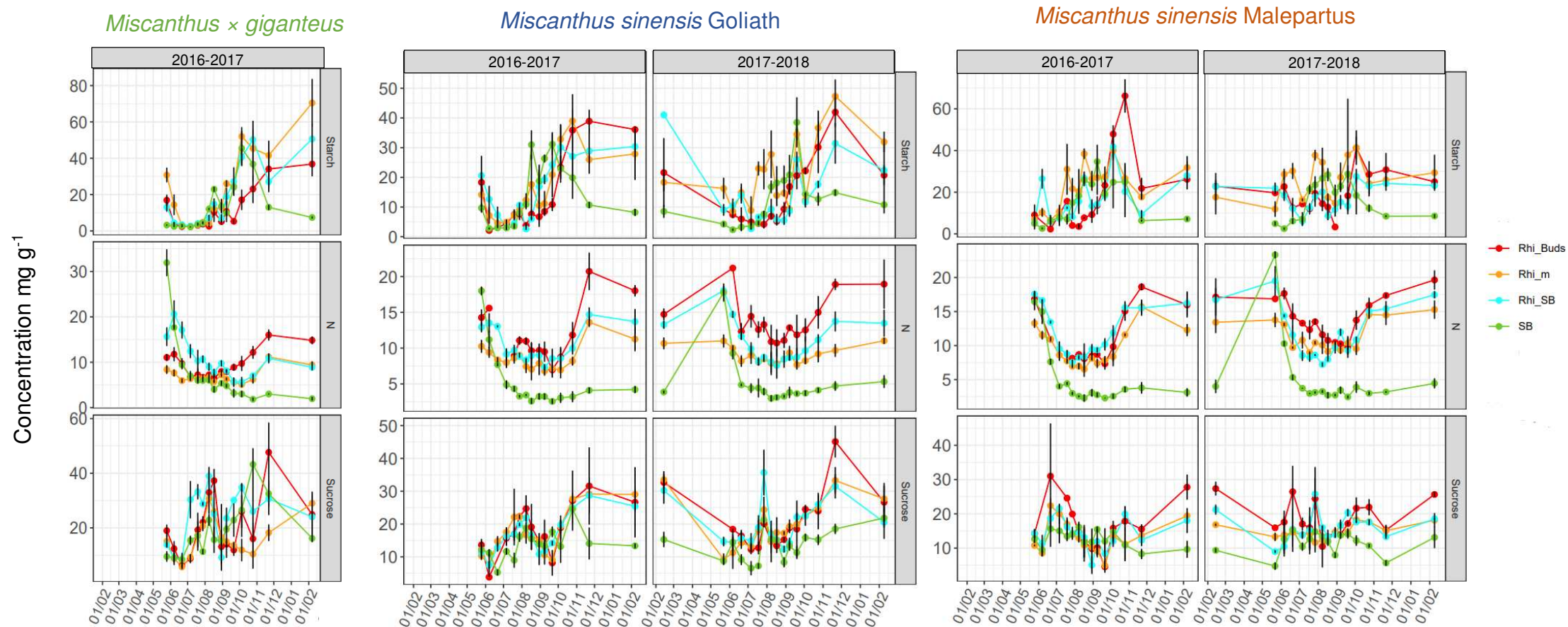
Seasonal variation of carbon and nitrogen storage molecules in the main rhizome

In this study, we analysed C and N reserve molecules seasonal dynamics to characterize C and N storage and remobilisation. BP were divided into three functional compartments as described in Fig1. The main rhizome (Rhi_m) was the most important compartment in terms of proportions of total rhizome biomass, for all samples, and represented 64 to 97% of the total BP biomass during the growing season of the third and fourth growing years (Fig2, yellow bars). Accordingly, reserve molecules stocks were higher in this compartment during autumn and winter than in the other compartments for the three genotypes (data not shown). Taking into account these two results about Rhi_m, we focused on the Rhi_m compartment to characterize C and N storage dynamic, and we analysed the enrichment or depletion of the tissues, following the evolution of starch, sucrose, and protein concentrations (Fig3).

For all genotypes and years, soluble proteins concentration in Rhi_m was low, under 6 mg g^{-1} (Fig4, blue diamonds) and no significant interaction between genotype and sampling date was observed (Table 1), suggesting that there was no difference between genotypes concerning soluble proteins dynamics and values. No seasonal trend of soluble proteins concentration could be observed, except for both *Msin* where the plateau of low values presented fluctuations (particularly in 2017) and a slight increase to reach a maximum in autumn (Fig4, blue diamonds). These variations appeared to be concomitant for the two *Msin*, albeit earlier for *Msin* Goliath.

As soluble proteins were N reserve molecules, we observed N and protein concentration dynamics on a same graphic (Fig4) and Spearman's correlation between them was tested: soluble proteins concentration and N concentration did not always present significant correlation (statistical analyse results not shown). In addition, when a significant positive correlation was shown, Spearman's coefficients were rather moderate: 0.49 and 0.51 for *Msin* Goliath in 2016 and *Msin* Malepartus in 2017, respectively (statistical analyse results not shown). The lack of expected marked seasonal trend in soluble proteins dynamic could be due to the protocol: by using small sample powder quantities and small volumes in the dosages, the concentrations values were possibly misestimated, which involved a clipping of the data.

Since the soluble proteins seemed not to be reliable in this study, it was decided to focus on the study of the N concentration dynamic and to compare N storage with starch and sucrose storage



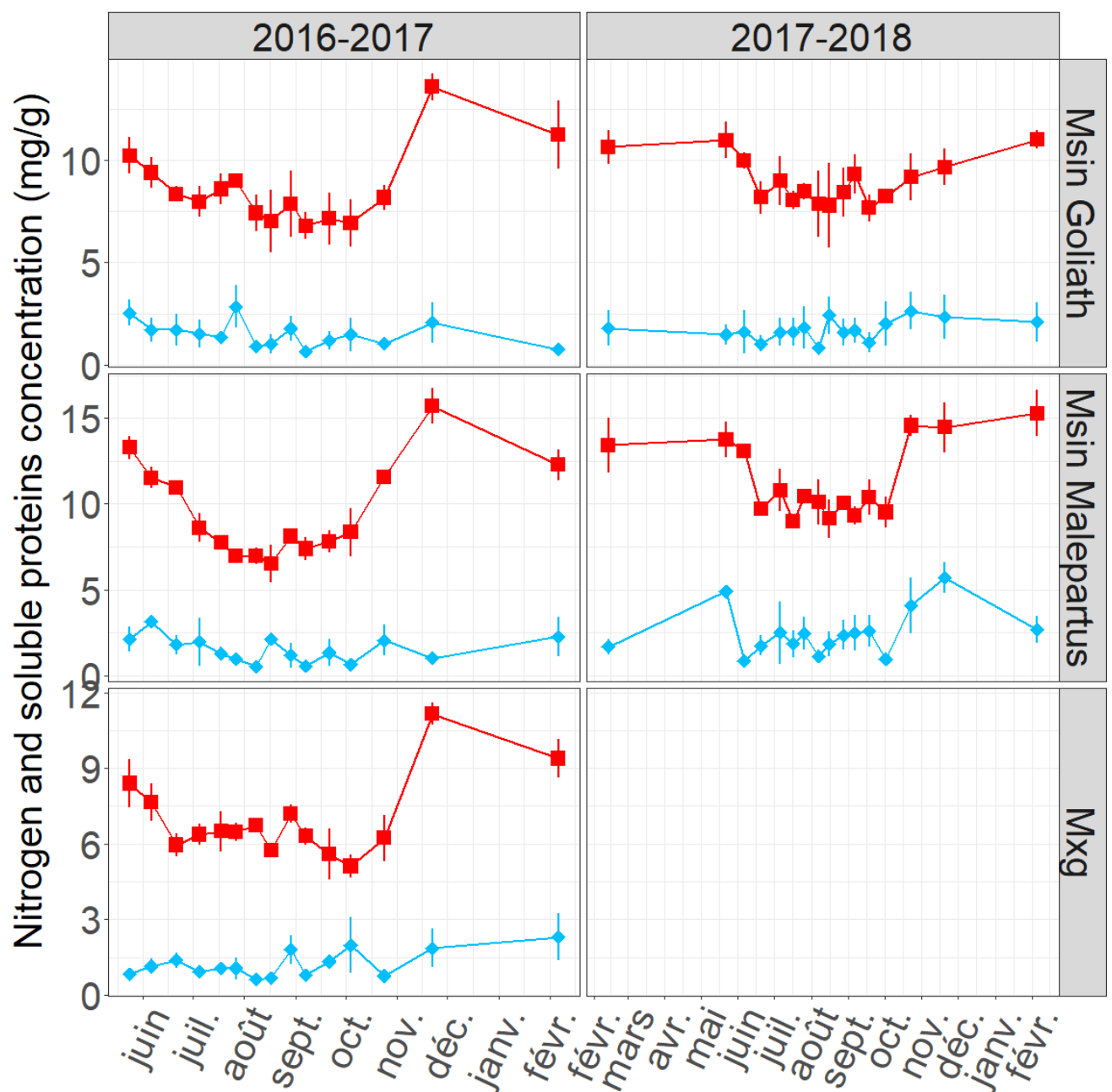
Chapter 3 - Fig3. Seasonal dynamic of carbon and nitrogen reserve molecules concentrations in the four functional compartments of *Miscanthus x giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and Malepartus during the third and fourth growing years (mean \pm standard errors)

SB: Stembase, Rhi_m: main part of the rhizome, Rhi_SB: rhizome associated to stembases, Rhi_buds: Rhizome associated to buds

in the following sections. In Rhi_m, N concentration decreased from May to summer and increased from August for *Msin* Malepartus and October for *Msin* Goliath and *M×g* in 2016 (Fig5, red squares). The beginning of this increase occurred at the same period in the third and fourth season for *Msin* Goliath but was delayed in the fourth season for *Msin* Malepartus.

Starch and sucrose concentrations presented different dynamics according to the genotype (Fig5, black crosses and purple circles). There was a significant effect (p -value < 0.05) of the interaction genotype and sampling date on the starch and sucrose concentrations in the four studied compartments, which means that seasonal dynamics and/or concentrations and contents of these C reserve molecules were different between genotypes (Table 1). During the third year, starch and sucrose concentrations decreased at the beginning of the growing season, except for starch of *Msin* Malepartus (Fig5, black crosses and purple circles). Then, while starch concentration remained low, particularly in *M×g*, sucrose concentration started to increase to reach high values in summer then decreased (Fig5, purple circles). Starch increased in late June-early July for *Msin*, earlier than *M×g* in August and reached its maximum between October and February of the year $n+1$, according to genotypes and years (Fig5, black crosses). A significantly higher maximum starch concentration was observed in *M×g* with 70 mg g^{-1} , which was twice higher than the two *Msin*, 28 to 32 mg g^{-1} (p -value < 0.10 , Table 2). It corresponded to 35 g of starch per main rhizome for *M×g*, always significantly higher than 5 and 6 g compartment $^{-1}$ for *Msin* (p -value < 0.05 , Table 2). The maxima in starch concentration and content in autumn and winter for *Msin* were quite similar between years (Table 2). Starch concentrations remained stable after reaching their maximum in *M×g* and *Msin* Goliath; this trend is less marked in *Msin* Malepartus for which a slight decrease seemed to occur (Fig 5). Sucrose concentration finally increased from the beginning of autumn to reach a maximum between October and February according to genotypes (Fig5, purple circles). Maximum sucrose concentrations in Rhi_m, observed during autumn and winter, were similar between *M×g* and *Msin* Goliath (29 mg g^{-1}) and significantly higher than those of *Msin* Malepartus (19 mg g^{-1}) (p -value < 0.05) (Table 2). The maximum sucrose content was significantly higher for *M×g* (15 g per Rhi_m) than *Msin* (3 and 6 g) due to the high biomass of *M×g*'s Rhi_m (p -value < 0.05).

The total C reserves, calculated as the sum of starch and sucrose concentrations, were significantly higher for *M×g* (99 mg g^{-1}) than *Msin* (51 to 57 mg g^{-1}) (p -value < 0.05 , Table 2). During the third year, *M×g* and *Msin* Malepartus C reserves were mainly constituted by starch, with a proportion between 61 and 70%, which was significantly higher than 46% observed for



Chapter 3 - Fig4. Seasonal dynamics of nitrogen (red squares) and soluble proteins (blue diamonds) concentrations in the main rhizome of *Miscanthus* \times *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and *Miscanthus sinensis* Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years (mean + standard error)

Msin Goliath (p-value < 0.10, Table 2), which involved a higher sucrose proportion. During the fourth year, proportions did not vary between *Msin* genotypes.

For *Msin* during the fourth year, starch dynamic showed substantial fluctuations (waves) occurring during the growing season (Fig5, black crosses). Sucrose concentration dynamic was different during the fourth year than during the third for *Msin*, particularly for *Msin* Goliath: while sucrose concentration seemed to increase consistently throughout the growing season in 2017, it increased between June and July, then decreased till September to finally increased during autumn in 2016.

As observed for C reserve molecule, the interaction between genotype and sampling date for N concentration in Rhi_m was significant (p-value < 0.10) which suggested that N concentration in Rhi_m evolved differently between the species, whether for the importance of the concentration or the dynamic of the enrichment (Table 1, Fig5, red squares). It decreased from May until summer, then increased in late summer-early autumn, depending on the genotype, and reached a maximum in November or February (Fig5, red squares). Maximum Rhi_m N concentration was significantly higher in *Msin* Malepartus (16 mg g⁻¹) than in M×g (11 mg g⁻¹) and intermediate in *Msin* Goliath (14 mg g⁻¹) (p-value < 0.05, Table 2). The N content was higher for M×g (7 g compartment⁻¹) than the two *Msin* (3 g compartment⁻¹) (p-value < 0.05, Table 2) due to higher biomass. This trend was also observed during the fourth year, with higher *Msin* Malepartus N concentration than *Msin* Goliath (p-value < 0.10, Table 2).

Increase in starch concentration (July-August) occurred earlier than N concentration (late summer-early autumn in September-October) in 2016 for the three genotypes (Fig5, black crosses and red squares). The comparison between starch and N dynamics was difficult to make in 2017 because of the starch fluctuations (waves) during the growing year (Fig5, black crosses).

Reserve molecules spatial distribution and enrichment dynamic in the different functional compartments

In the following sections, the supposed storage role of the different compartment was studied by comparing their starch, sucrose and N molecule concentrations with the main rhizome Rhi_m, used as a storage compartment reference. The results are illustrated in Fig3 and analyses of variance are presented in Table 3.

Chapter 3 - Table 1. Analysis of variance for starch, sucrose, soluble proteins and nitrogen concentrations and contents for each compartment ($p < 0.05$ are indicated in red, $p < 0.10$ are indicated in bold).

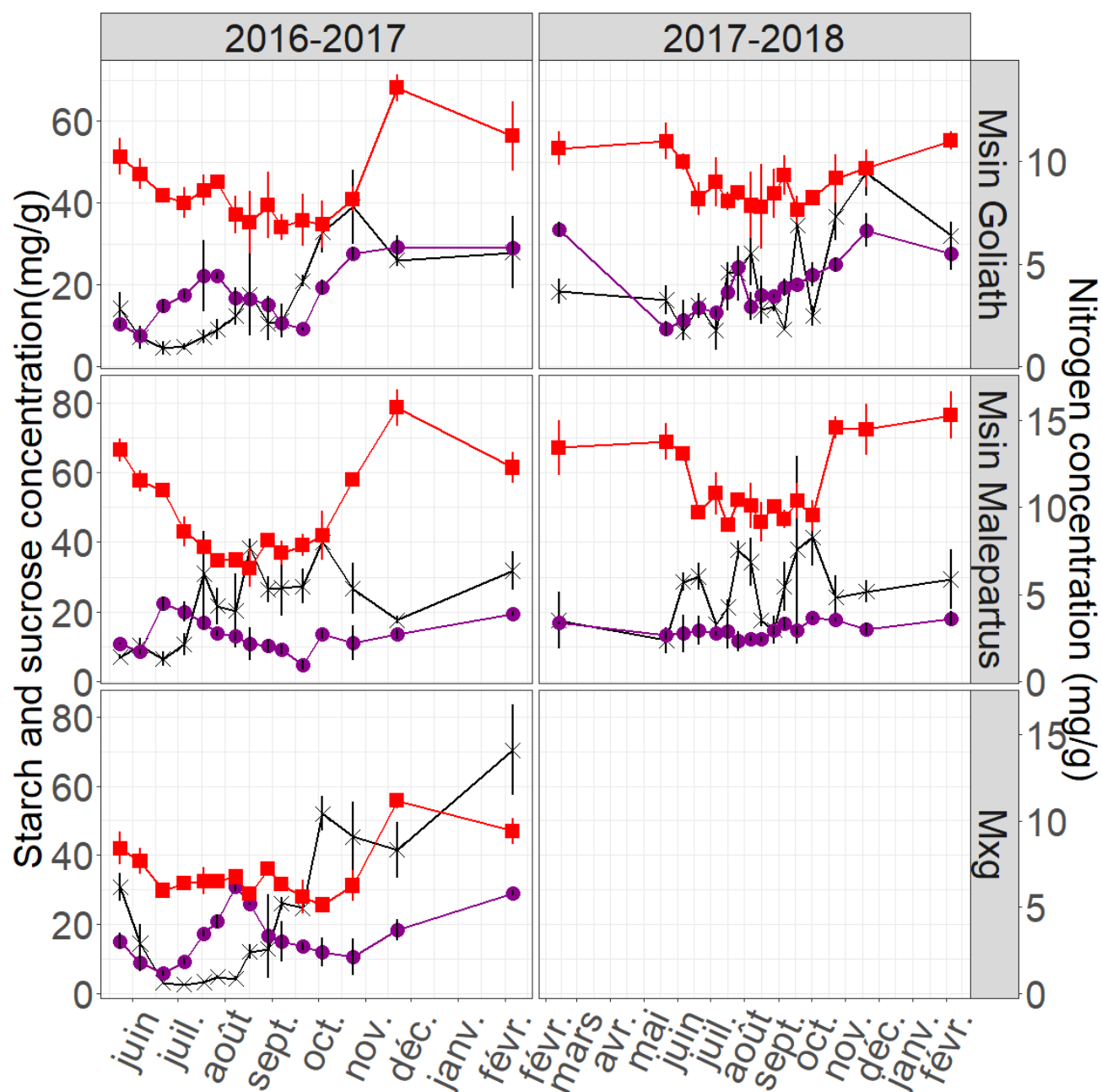
Degrees of freedom (Df) were sometime variable due to missing values.

Factor : G = Genotype, S = Sampling date

Compartment	Crop age	Factor	Starch				Sucrose				Soluble proteins				Nitrogen			
			Df	Concentration	Df	Content	Df	Concentration	Df	Content	Df	Concentration	Df	Content	Df	Concentration	Df	Content
Rhi_m	3	G		1.922e⁻⁰⁴		1.150e⁻¹³		0.003		<2.2e⁻¹⁶		0.296		2.594e⁻⁰⁹		3.22e⁻¹²		<2.2e⁻¹⁶
Rhi_m	3	S	74	4.833e⁻¹⁴	74	8.344e⁻¹⁵	74	9.492e⁻⁰⁷	74	1.513e⁻⁰⁵	74	0.181	74	0.095	74	<2.2e⁻¹⁶	74	6.573e⁻¹⁵
Rhi_m	3	G × S		6.069e⁻⁰⁶		8.104e⁻⁰⁴		2.479e⁻⁰⁴		0.003		0.211		0.229		0.058		0.016
Rhi_buds	3	G		1.313e⁻⁰⁴		6.685e⁻⁰⁷		0.028		1.587e⁻⁰⁷		0.428		0.006		5.518e⁻⁰⁵		9.063e⁻¹⁴
Rhi_buds	3	S	66	2.386e⁻¹⁶	64	<2.2e⁻¹⁶	71	2.272e⁻⁰⁶	68	4.760e⁻⁰⁷	70	0.080	69	0.001	69	6.760e⁻¹³	69	3.212e⁻¹⁶
Rhi_buds	3	G × S		0.007		0.001		0.012		0.159		0.738		0.344		0.321		9.150e⁻⁰⁵
Rhi_SB	3	G		0.251		0.203		9.126e⁻¹¹		3.943e⁻⁰⁸		0.124		0.059		0.002		0.183
Rhi_SB	3	S	73	1.701e⁻¹⁴	73	<2.2e⁻¹⁶	78	7.687e⁻¹⁰	78	1.277e⁻¹⁴	74	0.031	74	0.061	74	<2.2e⁻¹⁶	74	1.192e⁻¹²
Rhi_SB	3	G × S		7.997e⁻⁰⁵		5.876e⁻⁰⁷		1.802e⁻⁰⁴		4.066e⁻⁰⁴		0.815		0.807		5.215e⁻⁰⁶		0.279
SB	3	G		1.402e⁻⁰⁴		0.244		1.656e⁻⁰⁵		9.189e⁻⁰⁷		0.091		6.324e⁻⁰⁵		2.632e⁻⁰⁵		1.761e⁻¹²
SB	3	S	73	<2.2e⁻¹⁶	73	<2.2e⁻¹⁶	74	5.415e⁻⁰⁵	74	3.235e⁻¹⁰	74	5.786e⁻⁰⁴	74	5.435e⁻⁰⁴	74	<2.2e⁻¹⁶	78	3.890e⁻¹¹
SB	3	G × S		3.795e⁻⁰⁵		7.415e⁻⁰⁷		6.649e⁻⁰⁴		0.004		0.331		0.454		5.487e⁻⁰⁴		0.006
Rhi_m	4	G		0.027		0.248		1.448e⁻⁰⁷		1.873e⁻⁰⁶		0.011		0.090		5.586e⁻⁰⁸		0.002
Rhi_m	4	S	63	0.001	62	0.003	63	1.542e⁻⁰⁶	64	1.092e⁻⁰⁵	65	0.059	62	0.033	65	1.505e⁻⁰⁵	64	7.322e⁻⁰⁵
Rhi_m	4	G × S		0.009		0.079		4.37e⁻⁰⁴		0.002		0.330		0.651		0.531		0.189
Rhi_buds	4	G		3.274e⁻⁰⁴		3.327e⁻⁰⁶		0.141		2.348e⁻⁰⁶		0.691		0.001		0.700		1.680e⁻¹⁰
Rhi_buds	4	S	57	1.146e⁻⁰⁴	57	1.742e⁻⁰⁴	60	1.079e⁻⁰⁵	58	2.530e⁻⁰⁶	60	0.015	58	6.627e⁻⁰⁴	62	8.586e⁻⁰⁵	58	1.408e⁻⁰⁷
Rhi_buds	4	G × S		0.041		0.608		0.022		0.275		0.875		0.671		0.858		0.012
Rhi_SB	4	G		4.930e⁻⁰⁶		0.005		2.225e⁻⁰⁴		1.974e⁻⁰⁵		0.888		0.190		0.011		0.007
Rhi_SB	4	S	63	7.452e⁻⁰⁸	64	8.916e⁻¹⁰	63	5.085e⁻⁰⁷	62	4.397e⁻¹⁰	63	0.775	62	0.017	63	1.772e⁻¹¹	64	7.203e⁻¹¹
Rhi_SB	4	G × S		0.013		0.002		0.073		0.1562		0.941		0.984		0.303		0.528
SB	4	G		0.04		0.410		0.011		2.937e⁻⁰⁵		0.034		1.166e⁻⁰⁴		0.009		1.066e⁻¹¹
SB	4	S	62	1.078e⁻¹⁰	64	1.242e⁻⁰⁵	63	0.001	65	0.002	62	0.008	62	0.059	65	2.798e⁻¹⁴	74	2.466e⁻¹⁰
SB	4	G × S		0.007		0.090		0.014		0.016		0.304		0.251		0.304		0.019

Comparing Rhi_buds to Rhi_m, no significant interaction was observed between compartment and sampling date (C×S) on starch concentration of *M×g* and *Msin* Goliath in 2016 (Table 3), which suggested that starch concentrations co-evolved in both compartments (Fig3, red and yellow). For *Msin* Goliath in 2017 and *Msin* Malepartus during the two years, we observed a significant effect of C×S (p-value < 0.05) on starch concentrations (Table 3), maybe due to starch fluctuations that were only observed in Rhi_m (Fig3). Concerning sucrose concentration, no C nor C×S was observed for both *Msin*, which suggested a same behaviour throughout the season in the two compartments. In contrast, C, S and C×S effects were highlighted for *M×g* (Table 3, Fig3) with sucrose concentrations higher in Rhi_buds than in Rhi_m as well as variations in the observed periods of maximum and minimum values. It is interesting to note that in winter (corresponding to the two last sampling dates), either the concentration of starch or sucrose did not differ between the two compartments, whatever the genotype or the year considered. Finally, N concentration in winter was significantly higher in Rhi_Buds than in Rhi_m in the three genotypes and the two years (p-value < 0.10, statistical analyse results not shown). The C×S interaction was significant (p-value < 0.05, Table 3), except for both *Msin* in 2017, which indicated that N concentration in the two compartments did not follow exactly the same dynamic throughout the season, except for both *Msin* in 2017.

Comparing Rhi_SB to Rhi_m, significant C×S interactions were observed for starch concentrations, except for *Msin* Malepartus (p-value < 0.05, Table 3), which suggested that the two compartments presented similar seasonal dynamics for this genotype in contrast to the others. Concerning sucrose, Rhi_SB and Rhi_m of both *Msin* presented similar concentrations and similar seasonal dynamics (no significant effect of C and C×S), whereas in *M×g*, sucrose concentrations were significantly higher in Rhi_SB and seasonal dynamic was different between the compartments (statistical analyse results not shown). It is interesting to note that either starch or sucrose reserves concentration during winter did not differ significantly between both compartments for all genotypes and years (statistical analyse results not shown). Concerning N concentration, the effects of C and C×S were significant between Rhi_m and Rhi_Buds for all genotypes and years (p-value<0.05, Table 3). This highlighted higher N concentration in Rhi_SB than in Rhi_m and differences in seasonal dynamic that seemed to be more related to the N range values at a given sampling date than to a general seasonal trend. N reserves observed in winter were not significantly different between the two compartments for all genotypes except for *Msin* Malepartus, for which N concentration was significantly higher in Rhi_SB than in Rhi_m (p-value < 0.05, statistical analyse results not shown).



Chapter 3 - Fig5. Seasonal dynamics of starch (black crosses), sucrose (purple circles) and nitrogen (red squares) concentrations in the main rhizome of *Miscanthus × giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath and *Miscanthus sinensis* Malepartus during the third (2016) and fourth (2017) growing years (mean + standard error)

One of the objective of this work was to compare independently C and N reserve molecules dynamics between the stembases (SB) and their corresponding part of the rhizome (Rhi_SB) to identify if these compartments could play a reserve storage role regarding at least one of the reserve molecules. Starch concentration dynamic followed quite the same trend in SB (green) and their associated rhizome (blue) during the growing season (Fig3). Differences could be observed at the beginning and at the end of the sampling campaign (in February), when SB were totally senesced (Fig3). Starch concentration was low at the beginning of the growing season in SB and decreased from February in Rhi_SB to reach low values in late spring. Then, it increased from the beginning of summer to reach the highest values during the summer. Starch concentration accumulation seemed to reach a maximum between October and November for *M×g*, later than for *Msin* with maximum reached between August to October depending genotype and year. After reaching the maximum, starch concentration in SB decreased to reach minimum values in autumn, whereas it seemed to remain high in Rhi_SB. It suggested that SB accumulated starch temporarily during the summer, while Rhi_SB seemed to be a starch storage place during winter. The maximum N concentration in SB was observed at the beginning of the growing season. Then, it decreased to reach minimal values in early summer, according to the N dilution in the AP. A slight increase seemed to appear from August until winter, which was more pronounced for *Msin* Goliath. At the beginning of the growing season, N concentration also decreased in Rhi_SB, reaching low values during summer and early autumn, then increased from autumn to reach a maximum in November. In contrast to what was observed for starch in SB, SB did not store N during the summer while Rhi_SB stored C and N in autumn and winter. N concentration in late May in SB was significantly higher (p-value < 0.05, statistical analyse results not shown) for *M×g* (32 mg g⁻¹) than *Msin* (18 for *Msin* Goliath for the two years, and 16 and 23 mg g⁻¹ for *Msin* Malepartus in 2016 and 2017). In contrast, values of February of year *n+1* were similar (p-value > 0.10) between genotypes and years from 2 to 5 mg g⁻¹. At the end of growing season, Rhi_SB N concentration was significantly higher (p-value < 0.10) for *Msin* and particularly *Msin* Malepartus (15 mg g⁻¹) than *M×g* (11 mg g⁻¹) but were not different between years for *Msin*.

Chapter 3 - Table 2. Comparison of maximum carbon and nitrogen reserves molecules concentration and content in the four compartments in November or February of the next-year according to the genotype

Standard errors are indicated in brackets. Letters indicate the results of Tukey tests applied to the comparison between genotypes for a given year (A, B p < 0.05, a, b p < 0.10)

Genotype	Crop age	Carbon reserve molecules						Nitrogen		
		Starch		Sucrose		Total C reserves	Starch proportion (%)	Sucrose proportion (%)	Concentration (mg g ⁻¹)	Content (g compartment ⁻¹)
		Concentration (mg g ⁻¹)	Content (g compartment ⁻¹)	Concentration (mg g ⁻¹)	Content (g compartment ⁻¹)	Concentration (mg g ⁻¹)				
<i>Mxg</i>	3	70 (19) A a	35 (9) A a	29 (1) A a	15 (3) A a	99 (19) A a	70 (5) A a	30 (5) A a	11 (1) A a	7 (1) A a
<i>Msin</i> Goliath	3	28 (12) B b	6 (1) B b	29 (2) A a	6 (1) B b	57 (14) B b	46 (11) B b	54 (11) B b	14 (1) AB ab	3 (0.3) B b
<i>Msin</i> Malepartus	3	32 (8) AB b	5 (1) B b	19 (1) B b	3 (0.4) B b	51 (8) B b	61 (5) AB a	39 (5) AB a	16 (1) B b	3 (1) B b
<i>Msin</i> Goliath	4	47 (8) A a	15 (6) A a	33 (6) A a	11 (4) A a	81 (14) A a	59 (1) A a	41 (1) A a	11 (1) A a	4 (1) A a
<i>Msin</i> Malepartus	4	29 (12) A a	8 (3) A a	18 (3) A a	5 (1) A a	47 (9) A b	59 (13) A a	41 (13) A a	15 (2) A b	4 (0.4) A a

Discussion

Unlike *M×g*, *Msin* is characterized by continuous emissions of new shoots during the year and *stay-green* shoots of last cohort during winter, as observed in this trial (chapter 1) and in literature (Kobayashi and Yokoi, 2003; Stewart *et al.*, 2009). In addition, carbon (C) and nitrogen (N) storage is of primary importance for perennial plants cycle and development (Guiboileau *et al.*, 2010). As mechanisms of storage are known to be related to plant growth and growth strategy (Dickson, 1989; Kanai and Masuzawa, 1993; Millard, 1996; Maslova *et al.*, 2010; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016), we hypothesized in this study that storage pattern and its magnitude could be dependent of growth types in miscanthus. Indeed, according to the definition of “functional *stay-green*” given by Hörtensteiner (2009) and since *Msin* presents small green shoots that are maintained alive during the whole winter, we assumed that it can produce photosynthates very early in the season to supplement its reserves for the restart of the plant at spring. In contrast, *M×g* could only rely on its reserves for the development of its new buds since all its stems were senesced at the end of the winter.

In this study, C storage and remobilisation were studied in the three genotypes. A parallel with N recycling was made. First, we discussed the differences in C and N storage patterns and dynamics among the genotypes. Secondly, we analysed C and N storage patterns and dynamics in relation with the growth types of the genotypes. Finally, we discussed the supposed storage role of the different compartments and try to highlight ways to facilitate the phenotyping.

Carbon and nitrogen reserve molecules patterns and dynamics between genotypes

Our study aimed to characterize C and N storage and remobilisation for the three genotypes *M×g*, *Msin* Goliath and *Msin* Malepartus. We separated the below-ground parts (BP) into three compartments (Rhi_m, Rhi_buds and Rhi_SB) assuming that some parts of rhizome have source or sink functions, that could evaluate during the growing season. Because of Rhi_m was the most important compartment in terms of biomass (Fig2) and C and N quantities stored in this compartment were higher than in the others, it was chosen to characterize C and N storage pattern in the three genotypes. As it represented 64 to 97% of the total below-ground biomass (Fig2), it can be assimilated to the total rhizome, and then compared to the literature (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Strullu *et al.*, 2011; Lebas, 2012; Purdy *et al.*, 2015; Dierking *et al.*, 2017).

Chapter 3 - Table 3. Analysis of variance for starch, sucrose and nitrogen concentrations between Rhi_m and Rhi_buds for each genotype (upper part), and Rhi_m and Rhi_SB (lower part) for each genotype

(p<0.05 are indicated in red, p<0.10 are indicated in bold)

Degrees of freedom (Df) were sometime variable due to missing values.

Factor : C = Compartment, S = Sampling date

Compartments compared	Genotype	Crop age	Factor	Df	Starch Concentration	Df	Sucrose Concentration	Df	Nitrogen Concentration
<i>Rhi_m / Rhi_buds</i>	<i>M</i> × <i>g</i>	3	C		1.664e⁻⁰⁶		8.721e⁻⁰⁴		3.179e⁻¹³
	<i>M</i> × <i>g</i>	3	S	56	9.131e⁻¹¹	59	6.526e⁻¹¹	61	5.048e⁻¹³
	<i>M</i> × <i>g</i>	3	C × S		0.113		9.492e⁻⁰³		1.332e⁻⁰⁵
	<i>Msin</i> Goliath	3	C		0.638		0.650		1.087e⁻⁰⁸
	<i>Msin</i> Goliath	3	S	58	1.233e⁻⁰⁷	60	3.026e⁻⁰³	59	3.942e⁻⁰⁸
	<i>Msin</i> Goliath	3	C × S		0.212		0.927		2.243e⁻⁰²
	<i>Msin</i> Malepartus	3	C		5.851e⁻⁰⁴		0.205		6.784e⁻⁰⁷
	<i>Msin</i> Malepartus	3	S	59	4.952e⁻⁰⁷	59	5.489e⁻⁰⁵	56	5.969e⁻¹²
	<i>Msin</i> Malepartus	3	C × S		7.279e⁻⁰⁴		0.652		4.916e⁻⁰²
	<i>Msin</i> Goliath	4	C		3.501e⁻⁰⁶		0.235		4.045e⁻¹⁴
	<i>Msin</i> Goliath	4	S	63	9.274e⁻⁰⁷	61	5.259e⁻⁰⁹	61	1.046e⁻⁰⁶
	<i>Msin</i> Goliath	4	C × S		5.212e⁻⁰⁴		0.190		0.215
	<i>Msin</i> Malepartus	4	C		1.850e⁻⁰³		3.619e⁻⁰³		9.873e⁻¹⁰
	<i>Msin</i> Malepartus	4	S	60	7.308e⁻⁰⁵	63	2.638e⁻⁰²	63	1.930e⁻¹⁰
	<i>Msin</i> Malepartus	4	C × S		7.311e⁻⁰³		0.396		0.053
<i>Rhi_m / Rhi_SB</i>	<i>M</i> × <i>g</i>	3	C		2.668e⁻⁰⁴		1.015e⁻⁰⁵		4.908e⁻¹³
	<i>M</i> × <i>g</i>	3	S	59	1.253e⁻¹⁴	61	3.126e⁻⁰⁶	59	7.657e⁻¹¹
	<i>M</i> × <i>g</i>	3	C × S		7.123e⁻⁰³		6.138e⁻⁰³		8.676e⁻⁰⁹
	<i>Msin</i> Goliath	3	C		0.977		0.412		3.182e⁻¹⁰
	<i>Msin</i> Goliath	3	S	61	1.489e⁻⁰⁹	61	4.001e⁻¹¹	59	5.982e⁻¹⁴
	<i>Msin</i> Goliath	3	C × S		3.158e⁻⁰³		0.377		5.723e⁻⁰³
	<i>Msin</i> Malepartus	3	C		1.569e⁻⁰³		0.467		9.241e⁻¹³
	<i>Msin</i> Malepartus	3	S	61	6.138e⁻⁰⁷	59	6.988e⁻⁰⁵	61	<2.2e⁻¹⁶
	<i>Msin</i> Malepartus	3	C × S		0.073		0.554		2.861e⁻⁰⁴
	<i>Msin</i> Goliath	4	C		3.021e⁻⁰⁷		0.847		4.469e⁻⁰⁷
	<i>Msin</i> Goliath	4	S	62	6.534e⁻⁰⁸	62	2.678e⁻⁰⁷	64	2.119e⁻⁰⁹
	<i>Msin</i> Goliath	4	C × S		0.010		0.514		0.01
	<i>Msin</i> Malepartus	4	C		1.2e⁻⁰⁴		4.098e⁻⁰²		0.059
	<i>Msin</i> Malepartus	4	S	63	2.14e⁻⁰²	65	1.734e⁻⁰³	65	3.293e⁻¹²
	<i>Msin</i> Malepartus	4	C × S		0.332		0.054		1.845e⁻⁰³

We hypothesized that studying BP soluble proteins dynamic allowed us to more precisely characterize N recycling, by distinguishing structural N from N involved in plant metabolism and structure, as proposed by Dierking *et al.* (2017). Indeed, in their study, dynamic of soluble proteins concentration in rhizome seemed to correspond to the N recycling dynamic, with the end of decrease, *i.e.* end of N spring remobilisation, between June and August and the beginning of increase, *i.e.* start of autumn N remobilisation, from August. However, soluble proteins concentration found in our analyses was very low compared to literature: it varied between 0.6 and 2.4 mg g⁻¹ opposite to 3 to 8 mg g⁻¹ found by Dierking *et al.* (2017) and 10 to 20 mg g⁻¹ shown by Lebas (2012) (Fig5). Calculating the ratio between soluble proteins and N from the data of Dierking *et al.* (2017) to get the proportions of N involved in soluble proteins, we observed that it varied from 0.3 to 0.7, decreasing between March and June then increasing from August to November. In our study, it remained stable from 0.1 to 0.3 with no marked trend (data not shown). Nevertheless, we reported the same N concentration than Dierking *et al.* (2017), suggesting that we did not extract soluble proteins as efficiently as they did. We did not find any biological reason for this lower protein concentration, but technical reasons can be considered. Given the uncertainty of the Rhi_m soluble proteins concentration and content dynamics in our trial, we rather used N than proteins concentration to characterize N storage and remobilisation. We highlighted difference in N tissue enrichment in the three genotypes: N concentration was higher in *Msin* Malepartus than *Msin* Goliath and *M×g* (Table 2), suggesting that N reserves were higher in *Msin* Malepartus. Nevertheless, N concentration could also be related to other traits such as structural or metabolism related traits. In this way, it is important to validate these results by performing additional proteins and amino acids analyses maybe with another method or by increasing samples volumes and powder quantities.

Concerning C, the decrease of starch concentration in Rhi_m observed in *M×g* and *Msin* Goliath at the beginning of the growing season and the increase during the growing season for all genotypes (Fig5) confirmed that starch was a C reserve molecule in rhizome, as already mentioned in literature (Lebas, 2012; de Souza *et al.*, 2013; Purdy *et al.*, 2015a; Lal, 2018a). Nevertheless, our starch concentration ranged from 0 to 70 mg g⁻¹ in the three genotypes. These values were lower than those reported in literature: from 20 to 200 mg g⁻¹ for *M×g* and *Msin* Lebas (2012) and Purdy *et al.* (2015). However, it is important to note that non-structural carbohydrates dosage, in particular for starch, give very different results for a same sample according to laboratories even if the same method was applied (Quentin *et al.*, 2015). For instance, using the same method as we used for starch extraction and dosage, roots of a seedling

of *Eucalyptus globulus* aged of 70 days contained 7.9 mg of starch g⁻¹ according to Mitchell *et al.* (2013), more than five times higher than the 1.6 mg of starch g⁻¹ reported by Duan *et al.* (2013).

During spring, the starch decrease was concomitant with the increase of sucrose concentration. As sucrose is a C transport molecule in the plant (Heller, 1969), such starch and sucrose profile probably highlighted the starch transformation in sucrose that allow C remobilisation providing not only energy for the growth of new shoots, but also for rhizome metabolism and development. During autumn, a slight decrease in starch concentration, concomitant with a slight increase of sucrose concentration seemed to occur. It could be attributed to transformation of the starch into sugars to meet respiratory demand for plant maintenance and cold acclimation, as it was observed in miscanthus and other perennial and herbaceous species (Dietze *et al.*, 2014; Purdy *et al.*, 2015a; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016).

In the literature, sucrose is not only considered as a transport molecule, but also as a C reserve molecule, and is the preferential C storage molecule in some plants like sugarcane (Heller, 1969), a phylogenetically close related specie to miscanthus (Hodkinson *et al.*, 2002; Swaminathan *et al.*, 2010). Here, we showed an accumulation of sucrose in rhizome in all genotypes in winter from 18 to 33 mg g⁻¹, suggesting sucrose is a C storage molecule in miscanthus, as proposed by Lebas (2012). Even if these sucrose concentrations were smaller than starch concentrations in *M×g* and *Msin* Malepartus (29 vs 70 mg g⁻¹ and 19 vs 32 mg g⁻¹ respectively), sucrose concentrations were similar to starch in *Msin* Goliath. Regarding the proportion of each C storage molecule, we highlighted contrasted C storage patterns according to genotypes: *Msin* Goliath presented significantly higher sucrose proportion in total C reserves than *Msin* Malepartus and *M×g* in 2016 (respectively 54, 39 and 30%) (Table 2). As sucrose is an osmotically active molecule, it could be involved in protection to frost injuries (Purdy *et al.*, 2013; Fonteyne *et al.*, 2018). Hence, this higher rate of sucrose in *Msin* could be related to the better cold tolerance of *Msin* than *M×g* (Clifton-Brown *et al.*, 2001; Farrell *et al.*, 2006; Zub *et al.*, 2012; Fonteyne *et al.*, 2016).

***Miscanthus* genotypes displayed different carbon and nitrogen storage, which could be related to their growth types**

In this study, we hypothesized that *M×g* should present bigger C stocks and higher concentration than *Msin* due to its lack of green shoots during the winter, which involves that it relied only on endogenous C reserves to start the growing season. Accordingly, with our assumption, *M×g* presented significantly higher C reserves concentrations with 99 mg of total C reserves (starch + sucrose) per g of Rhi_m, compared to 51-57 mg g⁻¹ in *Msin*, but this was not surprising as its rhizome biomass was higher. This hypothesis was also validated regarding the concentrations, as *M×g* was characterized by sucrose concentration equal to *Msin* and higher starch concentration than *Msin* (Table 2).

As seen above, the different carbohydrates are known to play different roles: indeed, starch is considered as a storage molecule whereas soluble sugar like sucrose can have cold tolerance and plant maintenance roles in addition of its transport and reserve roles (Dietze *et al.*, 2014; Martínez-Vilalta *et al.*, 2016). The differences in the composition of total C reserve could not only be related to different cold tolerance as mentioned above, but also to the different growth types of the two species: while *M×g* was totally senesced and presented a high starch proportion, *Msin* maintained green shoots and presented high sucrose rate during winter, which could be attributed to a more active metabolism in winter.

As an indicator of storage in rhizome, starch concentration was monitored to define C reserve seasonal trend, with the description of periods corresponding to high and low concentration levels. The characterisation of such periods was not easy to carry out, due to large variability for this kind of variables in our dataset. Nevertheless, we defined the beginning of starch storage in rhizome when starch concentration began to increase, after the spring remobilisation period. In 2016, we could characterize this period for the three genotypes. It began from late June to early August, depending on species. In 2017, due to the occurrence of “waves” that corresponded to small periods of increase-decrease starch concentration, the characterization of the beginning of starch rhizome filling was not possible. In 2016, the accumulation seemed to be earlier in *Msin* Malepartus than in *Msin* Goliath and *M×g* (respectively late June, early July and early August). Despite these differences, the results were in accordance with Lebas (2012) in *M×g*, albeit a little later and with the only study dealing with seasonal carbohydrates dynamics in *M×g* and *Msin* (Purdy *et al.* 2015a): they defined the period of the beginning of starch storage in May – June depending on genotype and location. It corresponded also to the period reviewed by Stewart *et al.* (2009) on wild *Msin*. It is interesting to note that the earlier

beginning of starch storage period observed in *Msin* Malepartus was in accordance with a shorter length of vegetative growing season, as this genotype presented an earlier (one to two months) panicle emergence date than the other genotypes.

As protein concentration were not reliable to characterize N recycling in our study, we characterized N recycling period based on the N concentration increase in rhizome. It followed similar seasonal trends between species despite slight differences in the periods characterized by *minima* and *maxima* concentrations. It is interesting to note that N autumn remobilisation, characterized according to Rhi_m N concentration increase, was concomitant to the decrease of N content in above-ground parts, the variable used to describe N autumn remobilisation in Leroy *et al.*, (submitted, chapter 2). These results, even if they have to be confirmed, suggested that both N content in above-ground parts decrease and Rhi_m N concentration increase, are good indicators to characterize the beginning of autumn N remobilisation.

To our knowledge, the seasonal C and N reserve dynamics have never been analysed together in a same study, but only characterized independently for C storage (de Souza *et al.*, 2013; Purdy *et al.*, 2015a) or N recycling (Beale and Long, 1997; Himken *et al.*, 1997; Christian *et al.*, 2006; Strullu *et al.*, 2011; Roncucci *et al.*, 2015). In the present study where C and N dynamics were analysed together (Fig5), we showed that the beginning of storage period for C and N were not concomitant in miscanthus. These results were supported by the lack of correlation between starch and N or proteins concentration or even content (data not shown). This independence between C and N dynamics, highlighted here for the first time in miscanthus, has long been reported in literature in perennial plants as C and N storage were not driven by the same mechanisms: while N storage is seasonally programmed and linked with phenology, C storage depends on photosynthetic rates (Chapin *et al.*, 1990; Millard et Grelet 2010).

In 2017, we observed in *Msin* three to four waves characterizing rapid increase-decrease in starch and soluble proteins concentration and content from June to October, before the last increase in autumn (corresponding to autumn remobilisation). These waves could be associated to the “cohort phenomenon”, characterizing *Msin*, that have been reported in different studies (Kobayashi and Yokoi, 2003a; Kobayashi and Yokoi, 2017; Koike *et al.*, 1973; Stewart *et al.*, 2009). It suggested that little transitory stocks of C and N were constituted in Rhi_m to be rapidly remobilized for new shoots emission. As observed in trees capable to grow with successive foliar flushes (Dickson, 1989), mature shoots could provide N to immature’s ones. The waves observed in starch or proteins dynamics were less observed in the third year. One

possible explanation could be the fact that cohorts' emission may be dependent of climatic conditions or plant's age, as suggested by Kobayashi and Yokoi (2003a). Indeed, our two years of experiment were characterized by contrasted temperatures, and the trial was not conducted according to a staggered-start design. Accordingly, climate, age and interaction effects are difficult to appreciate (Loughin, 2006; Segura *et al.*, 2008; Tejera *et al.*, 2019). Moreover, cohorts' phenomenon may be not completely established as plants were probably not yet mature in the third year. This is indicated by the increase in BP biomass and N content, as well as shoots number per plant in the *Msin* between the third and the fourth year (Leroy *et al.*, submitted). This is corroborated by Kobayashi and Yokoi (2017) that reported the birth rate of *Msin* was not stabilized until five years.

These links between C and N management and growth have to be deeply investigated. This work presented a first step and have to be completed by additional C and N reserve dosages combined with a fine study of plant development.

Dynamics of carbon and nitrogen reserve molecules were different according to source or sink role of the functional compartments

One objective of this study was to determine if the four functional compartments, depending on their sink or source supposed role during growing season, presented the same dynamics concerning C and N. We separated the rhizome in different compartments, according to their expected sink or source role. Rhi_m corresponded to the main part of the rhizome and has been largely described in the previous sections. Rhi_buds, *i.e.* the rhizome associated to the buds, was always considered as a sink. In contrast, Rhi_SB corresponded to rhizome associated to “mature” shoot. This compartment evolved throughout the growing season, following the shoot development. Hence, at the beginning of the growing season, it still could be a sink compartment while at the end of the season it was supposed to store nutrients and be a source for the future. Finally, SB corresponded to the stembases and we wondered if it presented a storage role (in autumn and winter), as already observed in maize (Girardin, 1998).

The SB presented a contrasted seasonal trend concerning starch, N or sucrose, whatever the genotype (Fig3). SB starch concentration reached its maximum in late summer, but in contrast to the other compartments that maintained high level in starch, concentration dropped to minimal values in winter (Fig3). This was also observed by Lebas (2012) and suggests that SB can be a transitory storage compartment for starch during summer. The emptying of stembase

in autumn, during the senescence, to fill the rhizome, does not allow to consider SB as a storage compartment during winter. Sucrose concentration followed quite the same trends as starch, except for both *Msin* in 2017, for which the concentration did not seem to drop to minimal values in winter. As sucrose is an “active sugar” involved in metabolism and transport, this could be related to the *stay-green* character of the *Msin*, and suggests that the SB were still active in winter. Another hypothesis could be that SB acted as sucrose storage compartment. The analyses of SB as N storage compartment was not informative, as SB remained an above-ground parts that vary according to the N dilution curve (Gastal and Lemaire, 2002; Zapater *et al.*, 2017). We could still note a slight continuous increase from late summer in both *Msin*, which could either be related to the *stay-green* character or to a potential slight N storage.

In the following sections, we considered Rhi_m as a reference compartment for the nutrients storage. As a matter of fact, we compared the nutrient profile of the other compartments to Rhi_m.

As it is directly connected to buds, Rhi_buds referred to an expected sink compartment, which is supposed to be metabolically active. Then, we assumed that nutrient pattern accumulation was different in these two compartments. In this way, N concentration in autumn and winter were higher in Rhi_buds than in Rhi_m, which suggested that these young tissues were more active. The effective N storage could not be estimated, as our protein dosage was not reliable. In autumn and winter, we observed similar C reserve concentrations (either sucrose or starch) in both compartments for all genotypes. This suggests that Rhi_buds acted like Rhi_m, as a C storage compartment in winter (at least for starch, as sucrose also plays a role of transport), although probably more active during this period as the initiation of the new buds was observed, particularly in *M×g* at this time (Fig2). Moreover, we did not show interactions between C×S for starch in these two compartments in *M×g*, which suggested that both compartments showed similar seasonal dynamics for this genotype known to emit shoots only once at the beginning of the season. In contrast, in both *Msin* in 2017, when plants were mature and emitted a lot of new shoots throughout the growing season, we showed differences in seasonal starch concentration: the seasonal fluctuations in Rhi_m starch were not observed in Rhi_buds. Interestingly, the opposite was observed in sucrose dynamics in both *Msin*: while we observed different seasonal starch concentration dynamic between the two compartments, we highlighted a co-evolution concerning sucrose.

Another objective of this work was to determine if Rhi_SB behaves in a similar way to Rhi_m. Taking into account the difficulties and the destructiveness of below-ground parts sampling, if Rhi_SB could approximate Rhi_m, this will be of first importance in order to facilitate the plant phenotyping. This point was verified in winter (from November to February) for both C reserve molecules, all genotypes and years. If this method could be used, it will allow to multiply the number of genotypes took into account and to continue *Msin* species characterization. Nevertheless, no general trend could be done concerning the total growing season, as we observed CxS interactions between organs depending on the genotype or the year. Concerning N, *Msin* Malepartus presented higher values in Rhi_SB than in Rhi_m, whereas the two other genotypes presented similar concentrations. This complicates the possibility of generalizing the approximation of Rhi_m by Rhi_SB for N concentration. The results concerning N have to be completed regarding storage molecule (proteins and amino acids) and not only N concentration.

Conclusion

This study characterized finely both C and N reserve dynamics in three genotypes of miscanthus for the first time. The main rhizome was the compartment studied to characterize C and N storage and remobilisation. Our hypothesis concerning C reserve which could be higher for *M×g* than *Msin* was confirmed: *M×g* presented higher total C reserve concentration (starch + sucrose) during winter than *Msin*. Starch was the main C reserve molecule in *M×g* and *Msin*, but sucrose presented also a storage role, which was more abundant in *Msin* than *M×g* in terms of proportions, depending on genotype and year. Repeating this study during several years or in a staggered-start design would allow us to verify this fact and to distinguish age and climate effect on the C reserve proportions. We hypothesized that soluble proteins should help us to characterize storage N reserves. Nevertheless, the values obtained in our experiment were lower than in literature and N dynamics was accordingly restricted to the N dosage analyses. C and N dynamics were independent because their storage were caused by two different processes: an accumulation of carbohydrates during the growing season, followed by the autumn remobilisation of AP carbohydrates, and N was mainly recycled from AP at autumn. Even if no clear relation was highlighted, the “cohort phenomenon” characterizing the *Msin* could be at the origin of the differences between genotypes: it could have an impact on starch and proteins dynamics in rhizome and the greater starch reserve of *M×g* might be linked to the lack of stay green shoots during winter. This points have to be investigated more. Differences between functional compartments C and N reserve molecules dynamics were observed. Stembases played a temporary starch storage role during summer while their rhizome were a C and N storage place during winter. This stembases’ rhizome would also be used to simplify the phenotyping during winter but further studies are needed. Finally, as C and N storage and remobilisation periods were not identical between genotypes, it will be interesting to know what are the triggers for C and N recycling, for instance environmental conditions and developmental stages.

References

- Avice JC, Le Dily F, Goulas E, Noquet C, Meuriot F, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP, Ourry A (2003) Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany*, 81(12): 1198-1212. <https://doi.org/10.1139/b03-122>
- Barnes CR (1893) On the food of green plants. *Botanical Gazette*, 403-411
- Beale CV, Long SP (1997) Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy*, 12(6): 419-428. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00016-0)
- Belmokhtar N, Arnoult S, Chabbert B, Charpentier JP, Brancourt-Hulmel M (2017) Saccharification Performances of *Miscanthus* at the Pilot and Miniaturized Assay Scales: Genotype and Year Variabilities According to the Biomass Composition. *Frontiers in Plant Science*, 8: 740. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00740>
- Cadoux S, Ferchaud F, Demay C, Boizard H, Machet JM, Fourdinier E, Preudhomme M, Chabbert B, Gosse G, Mary M (2014) Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *Global Change Biology Bioenergy*, 6: 425-438. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12065>
- Chapin FS, Schulze E, Mooney HA (1990) The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 423-447. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.002231>
- Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Andersson B, Basch G, Christian DG, Kjeldsen JB, Jørgensen U, Mortensen JV, Riche AB, Schwarz KU, Tayebi K, Teixeira F (2001) Performance of 15 *Miscanthus* Genotypes at Five Sites in Europe. *Agronomy Journal*, 93: 1013-1019. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351013x>
- Clifton-Brown J, Schwarz K, Hastings A. (2015) History of the development of *Miscanthus* as a bioenergy crop: From small beginnings to potential realisation. *Biology and Environment Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115(1): 1-13. <https://doi.org/10.3318/BIOE.2015.05>
- Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Annals of Forest Science*, 46: 631-647. <https://doi.org/10.1051/forest:198905ART0142>

- Dierking RM, Allen DJ, Cunningham SM, Brouder SM, Volenec JJ (2017) Nitrogen Reserve Pools in Two *Miscanthus* × *giganteus* Genotypes under Contrasting N Managements. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01618>
- Dietze MC, Sala A, Carbone MS, Czimczik CI, Mantooth JA, Richardson AD, Vargas R (2014) Nonstructural Carbon in Woody Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65: 667-687. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040054>
- Deleens E, Cliquet JB, Prioul JL (1994) Use of ¹³C and ¹⁵N Plant Label near Natural Abundance for Monitoring Carbon and Nitrogen Partitioning. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21(2): 133-146. <https://doi.org/10.1071/PP9940133>
- De Souza AP, Arundale RA, Dohleman FG, Long SP, Buckeridge MS (2013) Will the exceptional productivity of *Miscanthus* × *giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂? *Agricultural and Forest Meteorology*, 171-172: 82-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.11.006>
- Duan H, Amthor JS, Duursma RA, O'Grady AP, Choat B, Tissue DT (2013) Carbon dynamics of eucalyptus seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO₂] and elevated temperature. *Tree Physiol*, 33:779–792. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt061>
- Fonteyne S, Muylle H, Lootens P, Kerchev P, Van den Ende W, Staelens A, Reheul D, Roldán-Ruiz I (2018) Physiological basis of chilling tolerance and early-season growth in miscanthus. *Annals of Botany*, 121(2): 281–295. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx159>
- Foyer CH, Ferrario-Mery S, Noctor G (2001) Interactions between carbon and nitrogen metabolism. In: *Plant Nitrogen*, Edition Springer, 237-254.
- Furze ME, Jensen AM, Warren JM, Richardson AD (2018) Seasonal patterns of nonstructural carbohydrate reserves in four woody boreal species. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 145(4): 332-339. <https://doi.org/10.3159/TORREY-D-18-00007.1>
- Gastal F, Lemaire F (2002) N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*, 53(370): 789–799. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.789>
- Giaquinta RT (1979) Sucrose Translocation and Storage in the Sugar Beet. *Plant Physiology*, 63: 828-832. <https://doi.org/10.1104/pp.63.5.828>
- Girardin P (1998) Ecophysiologie du maïs. *AGPM*, 201-242.

- Glowacka K, Clark LV, Adhikari S, Peng J, Stewart JR, Nishiwaki A, Yamada T, Jørgensen U, Hodkinson TR, Gifford J, Juvik JA, Sacks EJ (2015) Genetic variation in *Miscanthus* × *giganteus* and the importance of estimating genetic distance thresholds for differentiating clones. *GCB Bioenergy*, 7:386-404. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12166>
- Greef JM, Deuter M (1993) Syntaxonomy of *Miscanthus* × *giganteus* GREEF et DEU. *Angewandte Botanik* 67: 87–90.
- Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4) : 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.01.016>.
- Hartmann H, Trumbore S (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist*, 211: 386-403. <https://doi.org/10.1111/nph.13955>
- Hastings A, Clifton-Brown J, Wattenbach M, Stampfl P, Mitchell CP, Smith P (2008) Potential of *Miscanthus* grasses to provide energy and hence reduce greenhouse gas emissions. *Agronomy for Sustainable Development*, 28:465-472. <https://doi.org/10.1051/agro:2008030>
- Heller R (1969) Les glucides. In: *Biologie végétale-II Nutrition et métabolisme*. Edition Masson et Compagnie, 187-222
- Himken M, Lammel J, Neukirchen D, Czypionka-Krause U, Olfs HW (1997) Cultivation of *Miscanthus* under West European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilisation. *Plant and Soil*, 189:117-126.
- Hodkinson TR, Chase MW, Lledo MD, Salamin N, Renvoize SA (2002). Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (*Saccharinae*, *Andropogoneae*, *Poaceae*) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *Journal of Plant Research*, 115:381–392. <https://doi.org/10.1007/s10265-002-0049-3>
- Hörtensteiner S (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci*, 14(3):155-62. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.002>.
- Jørgensen U (2011) Benefits versus risks of growing biofuel crops: the case of *Miscanthus*. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3:24-30. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2010.12.003>

- Hatch MD, Slack CR (1966) Photosynthesis by sugar-cane leaves: A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemical Journal*, 101(1): 103-111. <https://doi.org/10.1042/bj1010103>
- Kanai T, Masuzawa T (1993) Seasonal Changes in reserve substances of herbaceous perennials in the alpine zone of Mt. Fuji. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, 6:126-132
- Khatpalia R, Bhatla SC (2018) Plant Mineral Nutrition. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Bhatla SC, Lal MA. Springer edition, 37-82. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Kobayashi K, Yokoi Y (2003a) Shoot population dynamics of persisting clones of *Miscanthus sinensis* in the warm-temperate region of Japan. *Journal of Plant Research*. 116:443-453. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0119-1>
- Kobayashi K, Yokoi Y (2017) Shoot density of *Miscanthus sinensis* populations in different habitats and their maintenance mechanisms in relation to shoot growth. *J plant Research*, 130:143-156.
- Koike K, Shoji S, Yoshida S (1973) Above-ground biomass and litter in *Miscanthus sinensis* community. *Ecological studies of Japanese grasslands - Draft of JIBP synthesis*, vol. 1973, 46-55
- Lal MA (2018a) Metabolism of Storage Carbohydrates. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Bhatla SC, Lal MA. Springer edition, 339-377. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Lal MA (2018b) Photosynthesis. In: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Bhatla SC, Lal MA. Springer edition, 159-226. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Lambers H, Stuart Chapin III F, Pons T.L (2008) *Plant Physiological Ecology*, second edition. Springer, 605 p.
- Lebas.G (2012) Etude du métabolisme carboné et azoté de *Miscanthus* × *giganteus*. Thèse soutenue à l'Université de Picardie Jules Verne
- Leroy J, Ferchaud F, Giauffret C, Mary B, Fingar L, Mignot E, Arnoult S, Lenoir S, Martin D, Brancourt-Hulmel M, Zapater M (submitted) *Miscanthus sinensis* is as efficient as *Miscanthus* × *Giganteus* for Nitrogen Recycling in Spite of Smaller N Fluxes. *Bioenergy Research*, in submission. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-180481/v1>

Lewandowski I, Clifton-Brown JC, Scurlock JMO, Huisman W (2000) *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 19(4): 209-227. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00032-5)

Lewandowski I, Clifton-Brown J, Trindade LM, van der Linden GC, Schwarz KU, Müller-Sämann K, Anisimov A, Chen CL, Dolstra O, Donnison IS, Farrar K, Fonteyne S, Harding G, Hastings A, Huxley LM, Iqbal Y, Khokhlov N, Kiesel A, Lootens P, Meyer H, Mos M, Muylle H, Nunn C, Özgüven M, Roldán-Ruiz I, Schüle H, Tarakanov I, van der Weijde T, Wagner M, Xi Q, Kalinina O (2016) Progress on Optimizing *Miscanthus* Biomass Production for the European Bioeconomy: Results of the EU FP7 Project OPTIMISC. *Frontiers in Plant Science*, 7(1620). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01620>

Linde-Laursen IB (1993) Cytogenetic analysis of *Miscanthus* ‘Giganteus’, an interspecific hybrid. *Hereditas*, 119: 297-300

Martínez-Vilalta J, Sala A, Asensio D, Galiano L, Hoch G, Palacio S, Piper FI, Lloret F (2016) Dynamics of non- structural carbohydrates in terrestrial plants: a global synthesis. *Ecological Monographs*, 86(4), 495-516. <https://doi.org/10.1002/ecm.1231>

Maslova SP, Tabalenkova GN, Golovko TK (2010) Respiration and Nitrogen and Carbohydrate Contents in Perennial Rhizome-Forming Plants as Related to Realization of Different Adaptive Strategie. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(5):631-640

Masuzawa T, Hogetsu K (1977) Seasonal Changes in the Amount of Carbohydrate and Crude Protein in the Rhizome of *Miscanthus sacchariflorus*. *The Botanical Magazine Tokyo*, 90:181-191.

Millard P (1996) Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 159: 1-10. <https://doi.org/10.1002/JPLN.1996.3581590102>

Millard P, Grelet G (2010) Nitrogen storage and remobilisation by trees : ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology*, 30 :1083-1095.

Mitchell PJ, O’Grady AP, Tissue DT, White DA, Ottenschlaeger ML, Pinkard EA (2013) Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist*, 197:862–872. <https://doi.org/10.1111/nph.12064>

- Naidu S, Al Shoabi A, Long SP (2001) Cold-tolerant C4 photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*. Science Access, 3. <https://doi.org/10.1071/SA0403401>
- Naidu SL, Long SP (2004) Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: an *in vivo* analysis. Planta, 220: 145–155. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1322-6>
- Ourry A, Macduff JH, Volenec JJ, Gaudillere JP (2001) Nitrogen Traffic During Plant Growth and Development. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF (eds) Plant Nitrogen, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_10
- Preiss J, Sivak MN (1996) Starch synthesis in sink and source. In: Photoassimilate Distribution Plants and Crops Source-Sink Relationships, Zamski E, Schaffer AA, Routledge Edition, 63-96.
- Purdy SJ, Maddison AL, Jones LE, Webster RJ, Andralojc J, Donnison I, Clifton-Brown J (2013) Characterization of chilling-shock responses in four genotypes of *Miscanthus* reveals the superior tolerance of *M. x giganteus* compared with *M. sinensis* and *M. sacchariflorus*. Ann Bot., 111(5): 999-1013. <https://doi.org/10.1093/aob/mct059>.
- Purdy SJ, Cunniff J, Maddison AL, Jones LE, Barraclough T, Castle M, Davey C.L, Jones C.M, Shield I, Gallagher J, Donnison I, Clifton-Brown J (2015a) Seasonal Carbohydrate Dynamics and Climatic Regulation of Senescence in the Perennial Grass, *Miscanthus*. Bioenergy Research, 8: 28-41. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9500-2>
- Purdy SJ, Maddison AL, Cunniff J, Donnison I, Clifton-Brown J (2015b) Non-structural carbohydrates profiles and ratios between soluble sugars and starch serve as indicators of productivity for a bioenergy grass. AoB PLANTS, 7 :1-12. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv032>
- Roncucci N, Nassi O Di Nasso N, Tozzini C, Bonari E, Ragaglini G (2015) *Miscanthus × giganteus* nutrient concentrations and uptakes in autumn and winter harvests as influenced by soil texture, irrigation and nitrogen fertilization in the Mediterranean. GCB Bioenergy, 7:1009-1018. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12209>
- Sarath G, Baird LM, Mitchell RB (2014) Senescence, dormancy and tillering in perennial C4 grasses. Plant science, 217-218, 140-151

Schulze ED, Beck E, Buchmann N, Clemens S, Müller-Hohenstein K, Scherer-Lorenzen M (2019) Plant Ecology, 2nd edition. Ed. Springer, 428-442

Staswick PE (1990) Novel Regulation of Vegetative Storage Protein Genes. The Plant Cell, 2:1-6. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.1.1>

Stewart JR, Toma Y, Fernández FG, Nishiwaki A, Yamada T, Bollero G (2009) The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. GCB Bioenergy, 1:126–153. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x>

Strullu L, Cadoux S, Preudhomme M, Jeuffroy MH, Beaudoin N (2011) Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus* × *giganteus* as influenced by nitrogen stocks in below-ground organs. Field Crops Research, 121:381-391. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.01.005>

Swaminathan S, Alabady MS, Varala K, De Paoli E, Ho I, Rokhsar DS, Arumuganathan AK, Ming R, Green PJ, Meyers BC, Moose SP, Hudson ME (2010) Genomic and small RNA sequencing of *Miscanthus giganteus* shows the utility of sorghum as a reference genome sequence for *Andropogoneae* grasses. Genome Biology 11, R12. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r12>

Tejera M, Boersma N, Vanlooocke A, Archontoulis S, Dixon P, Miguez F, Heaton E (2019) Multi-year and Multi-site Establishment of the Perennial Biomass Crop *Miscanthus* × *giganteus* Using a Staggered Start Design to Elucidate N Response. BioEnergy Research, 12:471-483.

Thomas HL, Arnoult S, Brancourt-Hulmel M, Carrère H (2019) Methane Production Variability According to *Miscanthus* Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content. BioEnergy Research, 12(2):325-337. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5>

Valenzuela Núñez LM, Gérant D, Maillard P, Bréda N, González Cervantes G, Sánchez Cohen I (2011) Evidence for a 26kDa vegetative storage protein in the stem sapwood of mature pedunculated oak. Interciencia, 36(2):142-147

Volenec JJ, Ourry A, Joern BC (1996) A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. Physiologia Plantarum, 97:185-193.

Zapater M, Catterou M, Mary B, Ollier M, Fingar L, Mignot E, Ferchaud F, Strullu L, Dubois F, Brancourt-Hulmel M (2017) A single and robust critical nitrogen dilution curve for

Miscanthus × *giganteus* and *Miscanthus sinensis*. *Bioenergy Research*, 10(1):115-128.
<https://doi.org/10.1007/s12155-016-9781-8>

Zub HW, Brancourt-Hulmel M (2010) Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30:201-214. <https://doi.org/10.1051/agro/2009034>

Comment optimiser l'étude de l'évolution des réserves carbonées et azotées ?

Une des optimisations possibles de cette étude concerne le dosage des protéines solubles. En effet, nous avons suivi l'hypothèse suggérée par Dierking *et al.* (2017) qui consistait à analyser la dynamique des protéines solubles dans le rhizome pour caractériser plus finement le stockage de l'azote en distinguant l'azote de structure de celui impliqué dans les réserves. Nous avons pris la précaution de réaliser des tests de dosage avant les dosages effectifs. Malgré cela, les dosages que nous avons réalisés donnent des résultats non satisfaisants qui ne nous permettent pas d'utiliser la dynamique des protéines solubles, molécules de réserve de l'azote, pour suivre le stockage de l'azote et séparer l'azote de structure et le métabolisme de l'azote de réserve. Ces résultats sont probablement liés à la modification du protocole de dosage par rapport au mode opératoire des kits de dosage, afin de pouvoir utiliser des petites quantités et petits volumes d'échantillons pour travailler en microplaques et optimiser le temps d'analyse. Ces dosages sont à réitérer en utilisant de plus gros volumes. Les acides aminés sont des molécules de transport de l'azote mais également des molécules de stockage de l'azote, particulièrement l'asparagine et l'arginine chez *Mxg* (Lebas, 2012). Pour des raisons de coût, nous ne pouvions doser qu'un seul type de molécule, à savoir les protéines ou les acides aminés. Etant donné que les acides aminés pouvaient être des molécules de transport, nous avons choisi de doser les protéines uniquement car elles constituaient des molécules de réserve. Lorsque nous referons des dosages, il serait intéressant de doser les acides aminés totaux, pas uniquement l'asparagine et l'arginine, car les acides aminés relatifs au stockage peuvent différer selon les espèces.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre le début de la remobilisation de l'azote et celui de la sénescence. Chez le miscanthus, le port de la plante et la taille de celle-ci engendrent un phénomène de « sénescence séquentielle » ou recyclage de l'azote des feuilles d'ombre situées au bas des plantes pour le transférer vers les feuilles plus jeunes situées en haut de la canopée, ce qui est aussi observé chez d'autres plantes (Guiboileau *et al.*, 2010 ; Crowley and Wingler, 2020). Il nous est alors difficile de déterminer la date de début de la sénescence strictement liée à la remobilisation des nutriments pour le stockage hivernal à long-terme. Le statut C/N des feuilles et leur taux de sucres sont liés au déclenchement de la sénescence (Wingler *et al.*, 2006 ; Wingler *et al.*, 2009 ; Guiboileau *et al.*, 2010 ; Thomas and Ougham, 2015). Il est également connu que l'accumulation des glucides issus de la photosynthèse régulent négativement celle-ci et que le déclin de la photosynthèse est lié à la sénescence

(Quirino *et al.*, 2000 ; Franck *et al.*, 2006). En ce sens, il serait intéressant de déterminer le statut C/N des feuilles et de l'analyser en lien avec la sénescence. La variation de ce statut suggérerait alors le début de la sénescence pouvant être liée à la remobilisation des nutriments. Il serait également utile de réaliser des mesures de photosynthèse au cours de la saison de végétation pour savoir si celle-ci pourrait être corrélée aux dynamiques des glucides non structuraux et de la sénescence. Si c'est le cas, une mesure simple instrumentée de photosynthèse pourrait nous renseigner sur l'état du stockage des nutriments, permettant un phénotypage plus facile des plantes pour la sélection.

Partie IV - Discussion générale

Chez $M \times g$, les besoins azotés pour la production de la biomasse aérienne sont dépendants du stock d'azote hivernal des parties souterraines (Strullu *et al.*, 2011). L'étude du stockage et de la remobilisation de l'azote et du carbone chez différents géotypes de miscanthus est donc de première importance. Elle permet de mieux comprendre les facteurs impliqués dans les mécanismes de stockage de ces nutriments et ainsi d'adapter les variétés aux zones de production et les pratiques culturales aux variétés en préservant le recyclage des nutriments pour optimiser la production de biomasse. L'acquisition de ces connaissances sur la gestion et le recyclage des nutriments présente deux finalités :

La première finalité est de fournir à la sélection variétale des clés pour permettre de faciliter le phénotypage et de choisir des géotypes ayant une production de biomasse optimale et des impacts environnementaux limités. La seconde est de pouvoir affiner les formalismes des modèles de fonctionnement de culture comme STICS, permettre le calibrage de nouveaux géotypes pour pouvoir simuler les impacts environnementaux des différents systèmes de production (géotype-pratiques culturales dans un environnement donné) et explorer *in silico* de futurs idéotypes pour optimiser la production de biomasse.

Dans le premier chapitre, il a été montré que les trois géotypes étudiés diffèrent d'abord de par leur morphologie et leur architecture ainsi que par leur rendement en biomasse aérienne. En effet, $M \times g$ est le géotype le plus productif, le plus haut mais possède un nombre de tiges réduit par rapport aux $Msin$ (Tableau 4). Le développement est aussi variable : $M \times g$ émet l'ensemble de ses tiges au début de la saison végétative alors que les $Msin$ émettent de nouvelles tiges tout au long de l'année appelées cohortes (Figure 23). Même si la date d'émergence est identique, la phénologie et les dates d'apparition des stades de développement ne sont pas les mêmes entre géotypes : l'émission de la feuille étendard, qui est la dernière feuille ligulée émise avant la floraison, ainsi que la sortie de la panicule ont lieu plus précocement chez $Msin$ Malepartus, puis apparaissent chez $Msin$ Goliath et enfin de manière tardive chez $M \times g$ (Tableau 5). La sénescence débute à la même période pour les trois géotypes, mais ne présente pas la même dynamique entre espèces : $M \times g$ présente une vitesse constante de sénescence du début à la fin alors qu'elle est assez faible chez les $Msin$ durant les premières semaines et accélère ensuite. La saison de végétation est plus courte pour $Msin$ Malepartus que les deux autres géotypes avec une sénescence totale des tiges de la première cohorte intervenant plus tôt (Tableau 7). De plus, à la fin de l'hiver, alors que l'ensemble des tiges émises l'année précédente sont totalement sénescentes chez $M \times g$, une partie des tiges de petite taille des

cohortes tardives sont restées vertes chez les *Msin* (Figure 31). Finalement, l'interception des rayonnements pour la production de biomasse aérienne est également différente avec une efficacité d'interception maximale atteinte plus tôt chez *M×g* que chez les *Msin* (Figure 25) et un indice de surface foliaire ou LAI nécessaire pour atteindre cette efficacité maximale plus faible chez *Msin* Goliath que *Msin* Malepartus et *M×g* (Figure 26), un coefficient d'extinction plus élevé chez ce premier génotype suggérant un port de feuilles plus horizontal (Tableau 5). L'efficacité d'utilisation du rayonnement ou RUE est significativement plus importante chez *M×g* que chez les *Msin*.

Le second chapitre nous a permis de conclure que le fonctionnement azoté n'était pas significativement différent entre génotypes. En effet, malgré des flux endogènes et exogènes d'azote plus élevés chez *M×g* que chez les *Msin*, les efficacités de recyclage ne sont pas significativement différentes, tout comme les proportions d'azote total issues de l'absorption d'azote exogène ou qui sont perdues pendant l'hiver (Chapter 2 - **Tables 2, 3**). Les dates de fin de remobilisation printanière de l'azote sont légèrement différentes avec une fin de remobilisation printanière plus tardive pour *Msin* Goliath, alors que la remobilisation automnale a lieu à la même période pour les trois génotypes (Chapter 2 - **Table 1**).

En revanche, le stockage du carbone, décrit dans le troisième chapitre, semble plus contrasté entre génotypes. D'une part, la teneur en glucides de réserve est plus importante chez *M×g* que chez les *Msin* et la proportion d'amidon par rapport aux réserves carbonées totales est aussi plus élevée chez *M×g*. Les *Msin* stockent aussi une partie des glucides de réserve non structuraux sous forme de saccharose (Chapter 3 - **Table 2**). Enfin, la période d'enrichissement des tissus en glucides non structuraux de réserve dans le rhizome est plus précoce que celle d'enrichissement en azote (Chapter 3 - **Fig5**). Ces résultats confirment l'indépendance des dynamiques de stockage à long-terme du carbone et de l'azote liée aux deux processus distincts à l'origine de ces stockages : les glucides sont accumulés pendant la saison végétative, en lien avec la photosynthèse, alors que l'azote est principalement stocké grâce au recyclage de l'azote contenu dans les parties aériennes lors de la sénescence de celles-ci à la fin de la saison végétative.

Toutes ces différences concernant la croissance et le développement, le fonctionnement azoté et le stockage et la remobilisation de l'azote et du carbone des plantes entre génotypes, nous invitent à suggérer que les facteurs climatiques et phénologiques du stockage de ces nutriments pourraient être différents entre espèces et que le type de fonctionnement des trois

génotypes pourrait être également variable. L'hypothèse d'une gestion des ressources endogènes différente entre génotypes est également appuyée par leurs tolérances contrastées aux stress abiotiques. En effet, Maslova *et al.* (2010), ont montré sur des espèces végétales rhizomateuses que les plus productives étaient moins résistantes au stress, et présentaient une plus grande quantité d'azote et une plus forte respiration que les espèces tolérantes ; ces dernières sont caractérisées par une croissance lente et une plus forte accumulation de molécules de réserve dans leur rhizome. Ceci pourrait notamment expliquer la meilleure tolérance à différents stress abiotiques de *Msin* par rapport à *Mxg*, et en particulier la tolérance au froid (Clifton-Brown *et al.*, 2001 ; Zub et Brancourt-Hulmel, 2010 ; Lewandowski *et al.*, 2016).

Cette discussion générale est organisée en trois parties. La première partie a pour objectif d'identifier les corrélations entre production de biomasse, variables climatiques, variables développementales et les variables en lien avec et le stockage de l'azote et du carbone, afin de comprendre le déterminisme du stockage et de la remobilisation de l'azote et du carbone. La seconde partie vise à déterminer les variables permettant de distinguer des types de fonctionnement différents entre génotypes. Nous présenterons également les caractéristiques que devrait combiner un idéotype de miscanthus pour une production de biomasse qui tient compte de la gestion des réserves endogènes. Dans une troisième partie, nous identifierons les variables clés les plus simples possible à mesurer pour pouvoir prendre en compte la gestion des réserves endogène de la plante dans les schémas de sélection variétale. Des applications concrètes de nos résultats pour optimiser la production de biomasse d'un point de vue agronomique seront également proposées.

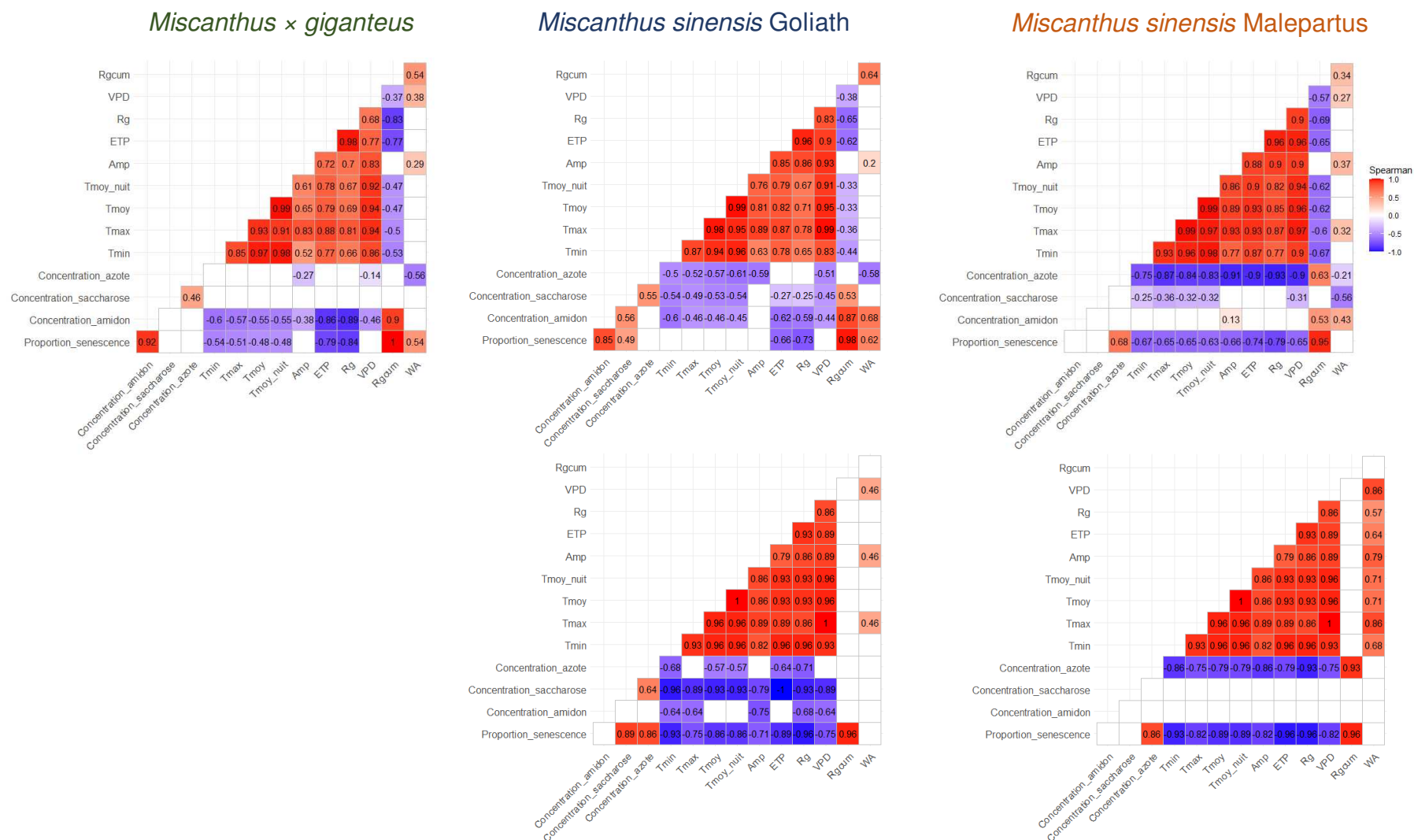


Figure 34. Corrélations de Spearman entre les teneurs en molécules de réserve de l'azote et du carbone dans le rhizome principal, la hauteur relative de tige sénescence et les principales variables environnementales pour *Miscanthus × giganteus* en 2016, *Miscanthus sinensis* Goliath en 2016 et 2017 et *Miscanthus sinensis* Malepartus en 2016 and 2017.

Seuls les coefficients de corrélation positive (rouge) et négative (bleu) significatifs sont présentés ($p < 0.10$).

Corrélations entre les variables clés impliquées dans le stockage de l'azote et du carbone et les variables environnementales et développementales

Chez de nombreuses espèces dont les espèces pérennes, le recyclage des nutriments, et notamment de l'azote, est lié à la sénescence (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010 ; Sarath *et al.*, 2014 ; Thomas et Ougham, 2015 ; Bhatla *et al.*, 2018). Il a aussi été relié à la floraison chez certaines espèces, notamment le switchgrass, une espèce proche du miscanthus (Sarath *et al.*, 2014). La sénescence dépend des conditions environnementales comme la diminution des températures ou la photopériode (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2007 ; Guiboileau *et al.*, 2010 ; Robson *et al.*, 2012). La diminution de la photopériode indique aux plantes qui y sont sensibles que l'hiver, et les stress qui y sont liés, approchent (Thomas et Ougham, 2015). Chez le miscanthus, Robson *et al.* (2012) montrent que la sénescence est sous contrôle génétique mais également liée aux temps thermiques et à la photopériode. Purdy *et al.* (2015) précisent que l'initiation de la sénescence pourrait être liée à la photopériode mais que son accélération par la suite serait engendrée par les températures minimales journalières. Le statut C/N des feuilles et leur taux de sucres sont également des déclencheurs de la sénescence chez de nombreuses espèces (Wingler *et al.*, 2006 ; Wingler *et al.*, 2009 ; Guiboileau *et al.*, 2010 ; Thomas and Ougham, 2015). Enfin, le stade de développement et notamment la floraison sont reliés à la sénescence chez certaines espèces (Sarath *et al.*, 2014) mais pas chez d'autres comme le tabac ou le miscanthus (Thomas et Stodart, 1980 ; Masclaux *et al.*, 2000 ; Jensen *et al.*, 2017). Dans cette section, nous avons donc cherché à déterminer les corrélations et liens entre les variables climatiques et phénologiques vis-à-vis du stockage du carbone et de l'azote au sein des plantes. La matrice de corrélations de Spearman (Figure 34) présente des variables relatives à l'évolution des concentrations en glucides de réserves (amidon et saccharose) et celle de l'azote dans le rhizome, la hauteur relative de sénescence, le rendement des parties aériennes (WA) et des variables climatiques. Le rayonnement global cumulé (Rgcum) correspond à la somme des Rg depuis l'émergence jusqu'à la date de chaque prélèvement. L'amplitude thermique (Amp) correspond à l'amplitude entre T_{\min} et T_{\max} journalières. $T_{\text{moy_nuit}}$ correspond à la moyenne des températures nocturnes. Les variables concernant les températures, l'ETP, le Rg et le VPD ont été moyennées sur la période séparant deux prélèvements consécutifs. Le but étant de caractériser la constitution des stocks de réserve hivernale, les analyses ont été menées sur des jeux de données ne concernant que la période de remplissage du rhizome.

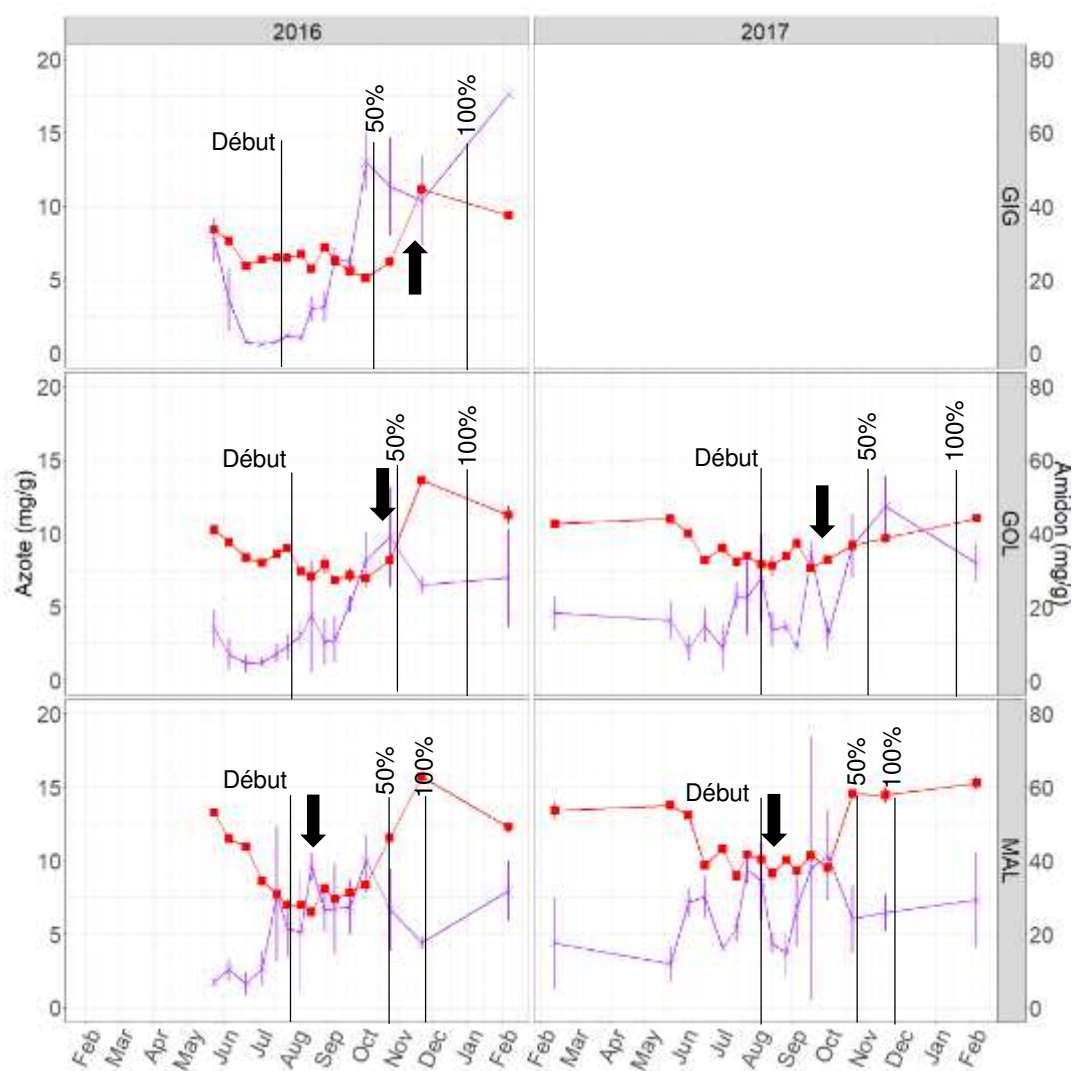


Figure 35. Dynamique saisonnière de la concentration en amidon (violet) et en azote (rouge) dans le rhizome principal de *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis* Goliath et *Miscanthus sinensis* Malepartus en 2016 et 2017
(moyenne ± erreur standard)

La flèche noire représente la date de sortie de la panicule, les traits indiquent les proportions des hauteurs de tige sénescentes (proportion indiquées au-dessus du trait).

La sénescence est un mécanisme lié au recyclage des nutriments. Il nous est difficile de déterminer quels sont les déclencheurs et facteurs de la sénescence chez les trois génotypes car nous n'avons pas pu caractériser précisément le début de la sénescence. L'évolution de la hauteur relative de sénescence est corrélée négativement de manière significative ($p < 0,10$) avec les températures (T_{\min} , T_{\max} , T_{moy} , $T_{\text{moy_nuit}}$ et Amp) et le VPD. Notons que cette corrélation est moins forte chez *Mxg* (coefficients de corrélation de Spearman de -0,48 à -0,54) que chez *Msin* Goliath en 2017 et *Msin* Malepartus (coefficients de -0,63 à -0,93, Figure 34). Cette corrélation semble moins forte chez les *Msin* en 2016 qu'en 2017, ce qui explique peut-être pourquoi elle n'a pas été mise en évidence en 2016 chez *Msin* Malepartus. Cette corrélation signifie que l'augmentation de la proportion de sénescence intervient en même temps que la diminution des températures et du VPD, en fin de saison à partir de septembre (Figure 9). Etant donné que les conditions environnementales sont identiques pour les trois génotypes puisqu'ils ont émergés à la même date (Figure 9 et Tableau 2) et que leurs dynamiques de sénescence diffèrent, le déroulement de la sénescence n'est pas uniquement une conséquence de facteurs environnementaux mais semble être en partie lié à des mécanismes intrinsèques à la plante. En effet, même si la sénescence semble être liée à la température et à la photopériode chez le miscanthus, elle est également en partie sous contrôles génétique et physiologique, ce qui permet d'observer de la variabilité entre génotypes qui poussent dans un même environnement (Robson *et al.*, 2012 ; Purdy *et al.*, 2015a).

Dans notre étude, la sénescence est corrélée positivement et de manière significative avec l'amidon chez *Mxg* et *Msin* Goliath 2016 mais pas chez *Msin* Malepartus en raison de sa dynamique différente de remplissage du rhizome en amidon, ni en 2017 chez *Msin* Goliath en raison de fluctuations de la concentration en amidon pendant la saison végétative (chapitre 3).

Nous avons également cherché à corréler les variables de réserve d'azote et de carbone avec les autres variables observées (production de biomasse, développement, conditions environnementales) afin de comprendre le déterminisme de l'accumulation des réserves dans les parties souterraines. La concentration en amidon est globalement corrélée avec les variables climatiques (température, VPD et R_g) chez le *Mxg*, de manière moins forte chez le *Msin* Goliath et pas du tout chez *Msin* Malepartus. La corrélation entre amidon et WA est également loin d'être systématique, elle apparaît seulement en 2016 chez les deux sinensis. Tout comme ce qui était observé pour l'amidon, des corrélations entre la concentration en saccharose et les variables climatiques sont mise en évidence chez *Msin* Goliath, renforçant le fait que le saccharose puisse fonctionner comme une molécule de réserve chez ce génotype en particulier.

Tableau 8. Description des variables utilisées dans les ACP

Variables relatives au fonctionnement azoté (cf. chapitre 2)

AR_a/NA_2	Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes remobilisée à l'automne pour être transférée vers le rhizome (%)
AR_b/NA_2	Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes mise en réserve dans le rhizome à l'automne (%)
L/NT_3	Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière perdue pendant l'hiver (%)
N_{dff}/NT_3	Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption de la fertilisation marquée (%)
N_{other}	Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption d'azote hors fertilisation marquée (%)
SR/NA_2	Proportion de la quantité d'azote maximale des parties aériennes issue de la remobilisation de l'azote du rhizome au printemps (%)
Teneur_N_max	Teneur en azote maximale dans le rhizome pendant l'hiver ($mg\ g^{-1}$) (cf. chapitre 3)
Teneur_N_PA_P16	Teneur en azote dans les parties aériennes au prélèvement 16, à la fin de l'hiver en février
U/NT_3	Proportion de la quantité d'azote maximale de la plante entière issue de l'absorption d'azote exogène (%)

Variables relatives au stockage du carbone des plantes (cf. chapitre 3)

Prop_Reserve_amidon	Proportion de la teneur en amidon parmi la teneur en glucides de réserves max (%)
Prop_Reserve_saccharose	Proportion de la teneur en saccharose parmi la teneur en glucides de réserves max (%)
Teneur_glucides_max	Teneur en glucides de réserve maximale dans le rhizome pendant l'hiver ($mg\ g^{-1}$)

Variables relatives à la croissance et au développement des plantes (cf. chapitre 1)

Ei_max_TT	Degrés jours cumulés pour atteindre l'efficacité d'interception maximale du rayonnement
Hauteur	Hauteur maximale de dernière feuille ligulée (cm)
k	Coefficient d'extinction de la culture
RUE	Efficacité d'utilisation des rayonnements lumineux
Senes_50_TT	Degrés jours cumulés pour atteindre 50% de hauteur relative de tige de la première cohorte sénescence
Senes_50_Rgcum	Rayonnement global cumulé pour atteindre 50% de hauteur relative de tige de la première cohorte sénescence
SP_{an_Rgcum}	Rayonnement cumulé jusqu'à la sortie de la panicule
SP_{an_TT}	Degrés jours cumulés jusqu'à la sortie de la panicule
Tiges_juin	Proportion du nombre maximal de tiges déjà émises en juin, au prélèvement 4 (%) = $(\text{Nombre de tiges émises au prélèvement 4} / \text{Nombre maximal de tiges}) * 100$
Tiges_vertes_fevrier	Proportions du nombre de tiges vertes parmi les parties aériennes totales en février de l'année n+1 (%) = $(\text{Nombre de tiges vertes} / \text{Nombre de tiges vertes} + \text{tiges sèches} + \text{bourgeons}) * 100$
WA_{max}	Rendement maximal des parties aériennes ($t\ MS\ ha^{-1}$) (cf. chapitre 2)

Ces relations ne sont en revanche observées ni chez *M×g* ni chez *Msin* Malepartus en 2017. La corrélation positive entre la concentration en saccharose et celle en azote chez *M×g* et *Msin* Goliath souligne la co-augmentation de ces deux molécules en fin de saison. Ceci suppose un recyclage du carbone en même temps que celui de l'azote, ce qui a également été suggéré dans la littérature chez les arbres par exemple (Millard and Grelet, 2010).

La sénescence consiste dans le démantèlement de l'appareil photosynthétique de la plante, recyclant ainsi l'azote de la chlorophylle contenue dans les chloroplastes pour le réallouer ailleurs, et en l'occurrence chez les herbacées pérennes, pour le stocker dans les organes souterrains de stockage à long terme. Une corrélation positive assez forte (0,68 à 0,86) est observée entre la concentration en azote et la proportion de sénescence chez *Msin* Goliath en 2017 et *Msin* Malepartus. Chez *M×g* et *Msin* Goliath en 2016, la principale augmentation de la teneur en azote a lieu alors que 50% de la plante est déjà sénescente, ce qui ne permet pas d'établir une corrélation entre azote et proportion de sénescence (Figure 34), mais rappelons qu'il aurait été préférable de regarder les dynamiques des molécules de réserve comme les protéines plutôt que celles de l'azote. Comme pour la sénescence et la concentration en amidon, la concentration en azote est corrélée négativement avec les températures, le Rg, l'ETP et le VPD chez les *Msin*, puisque celle-ci augmente en fin de saison végétative lorsque toutes ces variables climatiques diminuent. Cette corrélation entre l'azote et les températures peut être liée au fait que la concentration en azote est corrélée positivement avec la proportion de sénescence chez *Msin* Goliath en 2017 et *Msin* Malepartus les deux années, et que la sénescence est dépendante des températures, notamment car son accélération est liée à la diminution des températures minimales journalières (Purdy *et al.*, 2015a).

Finalement, le stockage du carbone et de l'azote ainsi que la sénescence ne semblent pas être liés à la floraison chez le miscanthus. En effet, la remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes, qui débute aux alentours du 7/09/2016 et 28/08/2017, a lieu deux mois avant la date de sortie de la panicule chez *M×g*, un mois avant environ chez *Msin* Goliath et à la même période pour *Msin* Malepartus (Figure 35). C'est également le cas pour la mise en réserve du carbone puisque l'accumulation d'amidon dans le rhizome commence dès le début de l'été (Figure 35). Purdy *et al.* (2015) ont également montré que la dynamique de stockage de l'amidon n'était pas liée à la floraison mais à des facteurs environnementaux. Concernant le lien entre sénescence et floraison, chez *M×g* la sortie de la panicule, lorsqu'elle a lieu, intervient après le stade 50% de hauteur relative sénescente, alors qu'elle intervient avant chez les *Msin*

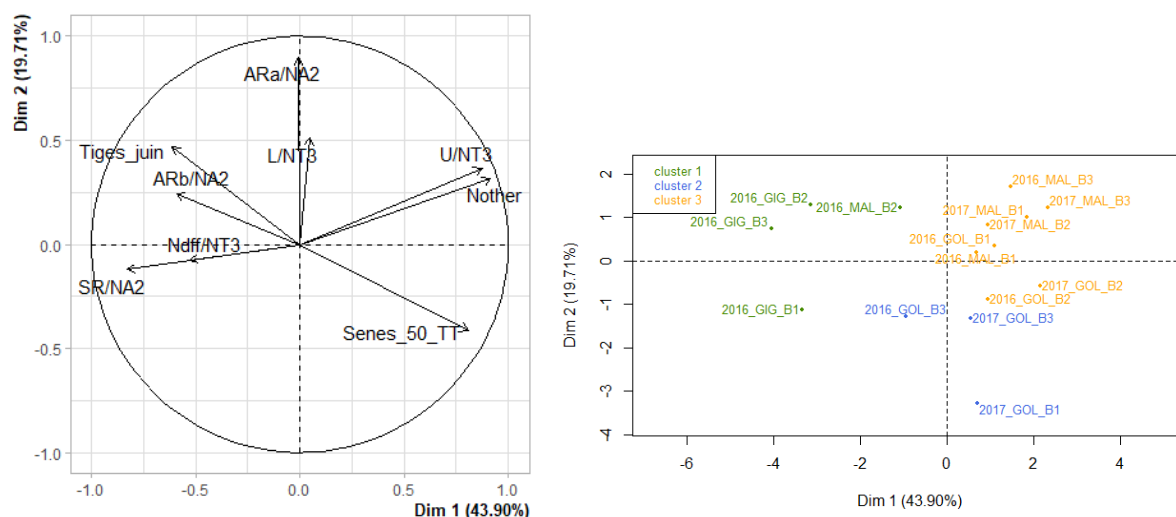


Figure 36. Projection des 9 variables (à gauche) et des individus colorés selon 3 clusters (à droite) selon le plan factoriel F1x F2 de l'analyse en composantes principales relative au fonctionnement azoté des plantes (ACP 1).

Les variables sont relatives au recyclage de l'azote, à la proportion d'azote total de la plante issue de l'absorption et celle perdue pendant l'hiver, aux degrés jours cumulés permettant d'atteindre 50% de hauteur relative sénescence et à l'émission des tiges au cours de l'année. L'ensemble des variables sont décrites en détail dans le tableau 8.

Tableau 9. Contributions et \cos^2 des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au fonctionnement azoté des plantes (ACP 1, Figure 36)

Variable	Dimension F1		Dimension F2	
	Contribution	Cos ²	Contribution	Cos ²
AR_a/NA₂	8e ⁻⁰⁴	3e ⁻⁰⁵	45	0,8
AR _b /NA ₂	9	0,4	3	6e ⁻⁰²
L/NT ₃	6e ⁻⁰²	2e ⁻⁰³	15	0,3
N _{dff} /NT ₃	7	0,3	0,3	5e ⁻⁰³
N_{other}	21	0,8	6	9e ⁻⁰²
Senes_50_TT	17	0,7	10	0,2
SR/NA₂	17	0,7	0,8	1e ⁻⁰²
Tiges_juin	9	0,4	12	0,2
U/NT₃	19	0,8	8	0,1

(Figure 35). L'absence de corrélation entre la floraison et la sénescence chez le miscanthus a également été observée par Jensen *et al.* (2017).

Types de fonctionnement des trois génotypes étudiés

Pour répondre aux enjeux contextuels liés à la production de biomasse, la sélection variétale doit intégrer dans ses schémas des éléments permettant de sélectionner des génotypes permettant une production avec des impacts environnementaux limités. Pour cela, appréhender les stratégies de fonctionnement quant à la gestion des réserves, et particulièrement des réserves azotées est primordial. Une première étape est de caractériser des types fonctionnels sur la gestion de l'azote et des réserves carbonées, soulignant les points forts et les points faibles de nos génotypes, ainsi que les compromis entre les mécanismes mis en œuvre. Pour cela, trois analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées grâce à la fonction *PCA* du package {FactoMineR} du logiciel R version 4.0.3 (R Core Team, 2020) (Lê *et al.*, 2008), sur les données obtenues par génotype, année et bloc (Figures 36, 37 et 38). Les individus correspondent aux combinaisons génotype \times année \times bloc. L'ensemble des variables utilisées dans ces ACP sont décrites dans le Tableau 8. Elles sont relatives (i) au fonctionnement azoté des espèces, intégrant les efficacités de recyclage de l'azote, les proportions d'azote absorbé pendant la saison végétative et perdu durant l'hiver, (ii) au stockage du carbone, intégrant le taux de réserves glucidiques souterraines ainsi que la part d'amidon et de saccharose qui les constitue, et (iii) des variables relatives à la production de biomasse, à la croissance et au développement des plantes. Une analyse de classification réalisée grâce à la fonction *HCPC* du package {FactoMineR}, permet de séparer les individus en 3 groupes (clusters) sur la base de leurs coordonnées sur les deux premières dimensions de l'ACP (Figures 36, 37 et 38). Les trois ACP ont été réalisées sur les données des deux années cumulées, mais étant donné que nous n'avons les données de $M \times g$ qu'en 2016, les mêmes ACP ont été réalisées sur les données de 2016 uniquement (données non présentées). Elles donnent des résultats similaires à celles qui sont présentées avec les données des deux années cumulées.

La première ACP (ACP1, Figure 36) présente la projection de 9 variables étudiées dans le chapitre 2 et qui sont relatives au fonctionnement azoté. Elles concernent les trois génotypes étudiés. Les deux premiers axes expliquent 64% de la variabilité observée. Le premier axe ségrège les individus selon les sources d'azote qu'ils utilisent pour leur production de biomasse. Ainsi, la proportion d'azote total de la plante issue de l'absorption exogène (U/NT3), dont la

proportion non issue de la fertilisation (N_{other}), et l'efficacité de remobilisation printanière de l'azote (SR/NA_2) sont les variables qui contribuent le plus à cet axe avec des contributions respectives de 19%, 21% et 17% et des \cos^2 de 0,8, 0,8 et 0,7 (Tableau 9). La variable relative aux degrés jours cumulés pour atteindre 50% de la hauteur relative des tiges de première cohorte à l'état sénescence (Senes_50_TT) contribue à 17% à cet axe et y est bien représentée ($\cos^2 = 0,7$). Cette variable permet de juger de l'activité de la sénescence puisque les premiers 20% de hauteur relative sénescence seraient plutôt attribués à de la sénescence séquentielle liée à la compétition entre les feuilles pour les ressources, plus qu'à la sénescence liée à la remobilisation des nutriments. Selon l'axe 1, certains individus favoriseraient la remobilisation printanière de l'azote alors que d'autres favoriseraient l'absorption. Le second axe ségrège les individus selon l'efficacité de remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes (AR_a/NA_2) qui contribue à 45% ($\cos^2 = 0,8$). Les autres variables ne contribuent pas beaucoup à cet axe et sont assez mal représentées (contributions inférieures à 15% et \cos^2 inférieurs à 0,3). Cette ACP ne permet pas de mettre en évidence un lien entre l'émission des tiges au cours de la saison végétative (Tiges_juin) et le fonctionnement azoté. Même si dans le chapitre 3, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence significative entre génotypes pour les efficacités de remobilisation printanière et pour l'absorption, mais seulement pour la remobilisation automnale et la capacité à utiliser l'engrais fourni (Chapter 2 - Tables 2, 3), cette analyse exploratoire de toutes les variables en même temps tend à ségréger $M \times g$ des $Msin$ par rapport aux sources d'azote utilisées et au stockage de l'azote à l'automne. L'analyse de classification montre que les individus appartenant au génotype $Msin$ Goliath sont plus dispersés que ceux de $Msin$ Malepartus et $M \times g$. $M \times g$ s'oppose sur l'axe 1 aux $Msin$. $Msin$ Malepartus est plutôt distribué sur ce premier axe et $Msin$ Goliath sur le second. Ainsi, $M \times g$ est caractérisé par une efficacité de recyclage de l'azote (remobilisations printanière et automnale) élevée, alors que $Msin$ Malepartus présente une part d'azote issue de l'absorption plus importante pour la constitution du stock d'azote aérien tout en ayant une efficacité de remobilisation automnale assez importante. $Msin$ Goliath présente la même source d'azote majoritaire pour la production de biomasse aérienne que $Msin$ Malepartus, mais une plus faible efficacité de remobilisation automnale de l'azote. Concernant l'utilisation d'azote exogène, dans notre essai la part d'azote exogène des $Msin$ ne provient pas de la fertilisation mais d'autres sources puisque la variable N_{other} se situe du côté positif de l'axe 1 où les $Msin$ sont bien représentés. Dans le premier article, les résultats montraient que le fonctionnement azoté n'est pas significativement différent entre génotypes. Toutefois, cette analyse multifactorielle, qui prend en compte l'ensemble des variables relatives au fonctionnement azoté, permet de dégager

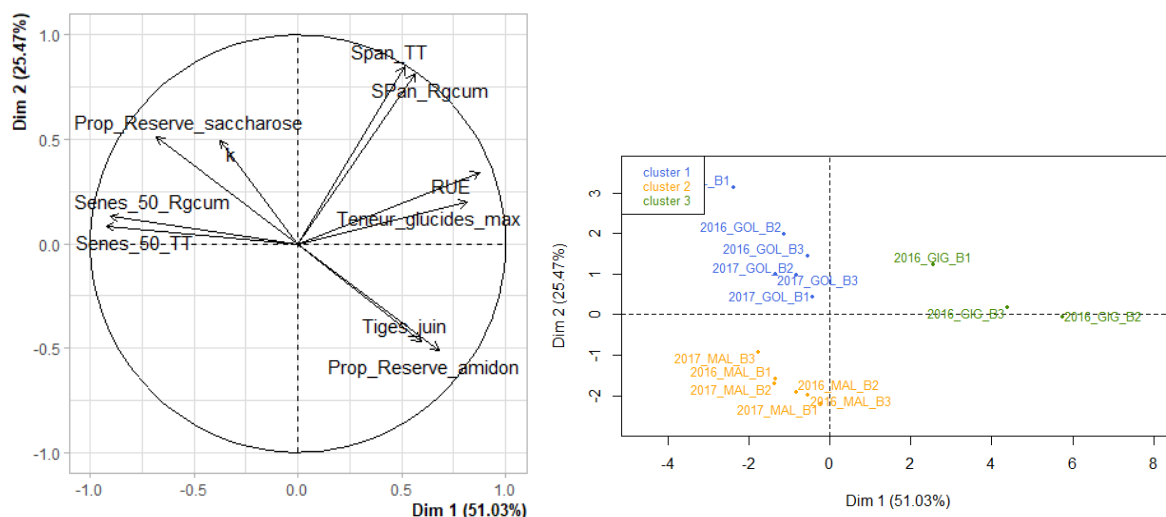


Figure 37. Projection des 10 variables (à gauche) et des individus colorés selon 3 clusters (à droite) selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative au stockage du carbone des plantes (ACP 2).

Les variables sont relatives aux formes de réserve de carbone et aux teneurs maximales de glucides de réserve dans le rhizome, à l'émission des tiges au cours de l'année, à la RUE, à la date de sortie des panicules, aux degrés jours cumulés permettant d'atteindre 50% de hauteur relative sénescence et au coefficient d'extinction de la culture. L'ensemble des variables sont décrites en détail dans le tableau 8.

Tableau 10. Contributions et cos² des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au stockage du carbone des plantes (ACP 2, Figure 37)

Variable	Dimension F1		Dimension F2	
	Contribution	Cos ²	Contribution	Cos ²
k	3	0,1	10	0,2
Prop_Reserve_amidon	9	0,5	10	0,3
Prop_Reserve_saccharose	9	0,5	10	0,3
RUE	15	0,8	4	0,1
Senes_50_Rgcum	16	0,8	0,6	2e ⁻⁰²
Senes_50_TT	17	0,9	0,3	7e ⁻⁰³
SP_{an}_Rgcum	6	0,3	26	0,7
SP_{an}_TT	5	0,3	28	0,7
Teneur_glucides_max	13	0,7	2	4e ⁻⁰²
Tigres_juin	7	0,4	9	0,2

trois clusters distincts correspondant assez bien aux trois génotypes, même si quelques individus d'un génotype se retrouvent dans le cluster d'un autre (par exemple *Msin* Goliath chez *Msin* Malepartus). Ainsi, les clusters de *Msin* Malepartus et *Msin* Goliath ont tendance à être proches. Ils se placent tous deux sur le côté positif de l'axe 1. Les individus seraient alors caractérisés par une sénescence active (*Senes_50_TT*) plus tardive et une préférence pour l'absorption d'azote exogène pour produire de la biomasse. Les individus appartenant au cluster de *M×g* seraient plus efficaces en terme de recyclage de l'azote, et notamment de remobilisation printanière.

La seconde ACP (ACP 2, Figure 37) présente la projection de 10 variables relatives au stockage du carbone pour les trois génotypes étudiés. Ces variables sont principalement issues des chapitres 1 et 3. Les deux premiers axes expliquent 77% de la variabilité entre individus. Le premier axe est lié à l'acquisition des ressources carbonées par les plantes avec une contribution de 51% (Tableau 10). Les individus bien représentés sur la partie positive de ce premier axe présentent une RUE élevée (contribution de 15%, $\cos^2 = 0,8$) et une forte teneur en glucides de réserve l'hiver (*Teneur_glucides_max*, contribution de 13%, $\cos^2 = 0,7$). Les individus positionnés sur le côté négatif présentent un cumul de degrés jours et un rayonnement global cumulé importants pour atteindre 50% de hauteur relative de tige de première cohorte sénescence. Le second axe concerne la date de sortie de la panicule déterminée en degrés jours et en rayonnement global cumulés (*SPan_TT* et *SPan_Rgcum*, contributions respectives de 17% et 16%, $\cos^2 = 0,9$ et $0,8$). La sortie de la panicule puis la floraison annonce la fin de la période de croissance possible des parties aériennes principales (cohorte 1). Cette date est d'ailleurs régulièrement utilisée comme date de fin de saison de végétation puisque la floraison succède à l'arrêt de la croissance végétative (Guiboileau *et al.*, 2010). Les proportions d'amidon (*Prop_Reserve_amidon*) et de saccharose (*Prop_Reserve_saccharose*) composant les réserves glucidiques hivernales maximales contribuent à 9% chacun mais présentent un faible \cos^2 ($0,5$). *Prop_Reserve_amidon* se positionne du même côté que la RUE et la teneur en glucides max : c'est-à-dire que les individus qui présentent une forte RUE présentent également une forte proportion d'amidon dans leur réserve glucidique. En revanche, *Prop_Reserve_saccharose* se positionne du même côté que *Senes_50_TT* et *Senes_50_Rgcum*, signifiant que les individus qui présentent le stade « 50% de hauteur relative de tige de première cohorte sénescence » de manière tardive présentent plus de saccharose en proportion dans leurs réserves glucidiques hivernales. L'analyse des clusters des individus montre que *M×g* est plus dispersé cette fois que les autres génotypes, et qu'il semble y avoir une séparation des années pour *Msin* Goliath

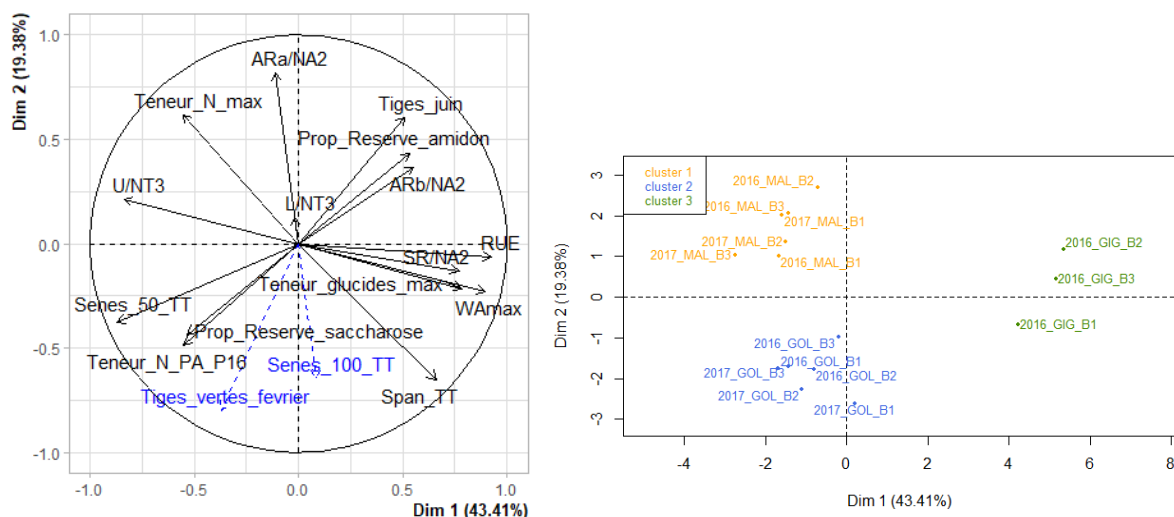


Figure 38. Projection des 17 variables (à gauche) et des individus colorés selon 3 clusters (à droite) selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative au type de fonctionnement des plantes (ACP 3).

Les 15 variables actives (en noir) sont celles utilisées dans les ACP 1 et 2, additionnées de variables au rendement maximal des parties aériennes. Les variables explicatives (en bleu) n'ont pas été prises en compte dans l'analyse. L'ensemble des variables sont décrites en détail dans le tableau 8.

Tableau 11. Contributions et \cos^2 des variables utilisées dans l'analyse en composantes principales relatives au type de fonctionnement des plantes (ACP 3, Figure 38)

Variable	Dimension F1		Dimension F2	
	Contribution	Cos ²	Contribution	Cos ²
AR_a/NA₂	0,2	1e ⁻⁰²	23	0,7
AR _b /NA ₂	5	0,3	5	0,1
L/NT ₃	4e ⁻⁰³	3e ⁻⁰⁴	0,6	1e ⁻⁰²
Prop_Reserve_amidon	4	0,3	7	0,2
Prop_Reserve_saccharose	4	0,3	7	0,2
RUE	13	0,9	0,1	3e ⁻⁰³
Senes_50_TT	12	0,8	5	0,1
SP _{an} _TT	7	0,4	15	0,4
SR/NA₂	9	0,6	0,6	1e ⁻⁰²
Teneur_glucides_max	9	0,6	2	4e ⁻⁰²
Teneur_N_max	5	0,3	13	0,4
Teneur_N_PA_P16	5	0,3	8	0,2
Tiges_juin	4	0,3	13	0,4
U/NT₃	11	0,7	2	4e ⁻⁰²
WAm_{max}	12	0,8	2	5e ⁻⁰²

sur l'axe 2. Ainsi les 3 individus de *Msin* Goliath présentent une date de sortie de panicule plus tardive et sont représentés sur l'extrémité haute de l'axe 2. Cette distinction entre années n'est pas retrouvée au sein des individus chez *Msin* Malepartus que ce soit sur l'axe 1 ou l'axe 2. Les trois génotypes étudiés sont ségrégés sur les deux axes : $M \times g$ est caractérisé par une forte RUE et une teneur en glucides de réserve élevée, et une date de sénescence à 50% assez précoce contrairement à *Msin* Goliath qui présente des caractéristiques opposées. *Msin* Malepartus présente des caractéristiques de sénescence similaires à *Msin* Goliath mais présente une date de sortie de panicule plus précoce que les deux autres génotypes.

La troisième ACP a été réalisée dans le but d'intégrer à la fois les fonctionnements carboné et azoté des plantes (ACP 3, Figure 39). Cette ACP regroupe les variables importantes des deux premières ACP ainsi que des variables de croissance et développement des plantes. Les deux premiers axes de cette analyse expliquent 63% de la variabilité. Le premier axe regroupe les axes 1 de l'ACP 1 et de l'ACP 2 et explique plus de 43% de la variabilité observée : il distingue les individus en fonction des sources d'azote privilégiées pour la production de biomasse (SR/NA_2 , U/NT_3), les variables liées à la production de biomasse aérienne (RUE, W_{max}) et les réserves carbonées. Le second axe est identique à l'axe 2 de l'ACP 1, c'est-à-dire influencé par la part d'azote remobilisée des parties aériennes à l'automne. Les individus positionnés du côté positif de l'axe 1 présentent une forte production de biomasse aérienne (W_{max} , contribution de 12%, $\cos^2 = 0,8$), une forte RUE (contribution de 13%, $\cos^2 = 0,9$), privilégient la remobilisation printanière (contribution de 9%, \cos^2 de 0,6) et présentent une forte teneur en glucides de réserve (contribution de 9%, \cos^2 de 0,6) (Tableau 11). A l'inverse, les individus positionnés du côté négatif de cet axe privilégient l'absorption d'azote exogène (contribution de 11%, $\cos^2 = 0,7$), ont une sénescence active tardive (contribution de 12%, $\cos^2 = 0,8$). La variable contribuant le plus à l'axe 2 est ARa/NA_2 (23%, $\cos^2 = 0,7$). La date de sortie de la panicule ($SPan_TT$) présente une forte contribution à cet axe (15%) mais est mal représentée ($\cos^2 = 0,4$) tout comme la proportion de tiges déjà émises en juin ($Tiges_juin$) (13%, $\cos^2 = 0,4$) et $Teneur_N_max$ (13%, $\cos^2 = 0,4$). La proportion du nombre de tiges restées vertes en février de l'année $n+1$ parmi le nombre de tiges total ($Tiges_vertes_fevrier$) a été placée en variable explicative car elle est issue d'une expérimentation complémentaire sur d'autres plantes de la même parcelle. Nous avons choisi de la représenter en variable explicative car elle soutient l'hypothèse que nous faisons d'un fonctionnement différent des *Msin* en lien avec ces tiges de dernière cohorte qui ne sénescent pas l'hiver. Cette variable se place sur le côté négatif de l'axe 2, du côté des génotypes ayant

Tableau 12. Classement fonctionnel des trois géotypes étudiés

Genotype	Croissance et développement				Recyclage de l'azote et limitation des impacts environnementaux		Réserves glucidiques			
	Rendement	Durée de la période de croissance active des parties aériennes	Senescence active tardive	Durée de la saison de végétation	Remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes	Teneur en azote à la récolte	Utilisation de l'azote endogène pour produire de la biomasse	Importance des réserves glucidiques hivernales dans le rhizome	Importance de l'amidon dans les réserves	Importance du saccharose dans les réserves
<i>Mxg</i>	+++	++	--	++	+	-	+++	+++	++	-
<i>Msin</i> Goliath	-	+	++	++	--	++	-	-	-	++
<i>Msin</i> Malepartus	--	-	+	--	++	+	--	--	+	+

une longue période de croissance possible des parties aériennes principales (cohorte 1) (SPan_TT). L'analyse de classification des individus présente une distinction nette des trois génotypes avec aucun individu d'un génotype observé dans le cluster d'un autre génotype. Dans un même cluster, les individus sont bien regroupés et il ne semble pas y avoir de différence entre années. Cette dernière ACP nous permet de distinguer des types de fonctionnement différent entre génotypes. *M×g* apparaît efficient concernant le recyclage de l'azote, produit beaucoup de biomasse avec une sortie de panicule, lorsqu'elle a lieu, plus tardive et une forte RUE. Ces éléments avaient déjà été soulignés dans la littérature (Zub and Brancourt-Hulmel, 2010 ; Gauder *et al.*, 2012 ; Robson *et al.*, 2013). Sa période de photosynthèse plus longue lui permet d'accumuler une plus forte teneur en glucides de réserve, majoritairement sous forme d'amidon, phénomène également observé chez d'autres espèces. En effet, Kanai et Masuzawa (1993) observent que trois des six espèces d'herbacées pérennes qu'ils étudient présentent une longue saison de végétation, une forte accumulation de glucides de réserve et une importante réutilisation de ces ressources au printemps suivant. Le fonctionnement de *M×g* s'oppose à celui des deux *Msin* sur l'axe 1, constitué par les variables relatives à l'acquisition des réserves carbonées et aux sources d'azote utilisées pour la production de biomasse. *Msin* Malepartus présente une sénescence active plus tardive, absorberait beaucoup d'azote exogène et présenterait une floraison plus précoce. Son rhizome serait plus riche en azote l'hiver et ses réserves glucidiques seraient composées d'une part importante de saccharose. *Msin* Malepartus et *Msin* Goliath sont bien distincts par rapport à l'axe 2 : *Msin* Goliath présente une efficacité de remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes plus importante et des réserves glucidiques plutôt composées de saccharose. La saison végétative de *Msin* Malepartus serait plus réduite que celle de *Msin* Goliath. *Msin* Goliath différencierait également par un important nombre de tiges émises après le mois de juin, alors que *M×g* a déjà émis l'ensemble de ses parties aériennes et une forte teneur en azote restante dans ses parties aériennes à la fin de l'hiver. *Msin* Goliath, de par sa forte proportion de tiges qui restent vertes l'hiver, peut être considéré comme un génotype *stay-green* en sens qu'il conserve des parties aériennes vertes durant l'hiver. Clifton-Brown *et al.* (2001) montrent que ce type de fonctionnement est lié à une remobilisation incomplète des nutriments à l'automne, notamment en cas de gel qui détruit les feuilles sans en avoir remobilisé les nutriments, ce qui appuie les résultats de notre expérimentation à savoir que l'efficacité de remobilisation automnale de l'azote des parties aériennes est moindre que chez les deux autres génotypes. Finalement, nous distinguons trois types de fonctionnement correspondant à nos trois génotypes (Tableau 12). *M×g* est efficient concernant le recyclage de l'azote, possède de fortes réserves en glucides pendant l'hiver, et sa

RUE importante est liée à sa forte production de biomasse aérienne. *Msin* Malepartus est également efficient dans sa remobilisation automnale d'azote de ses parties aériennes, présente une forte teneur en azote dans son rhizome durant l'hiver et privilégie l'azote exogène absorbé pour la production de biomasse, plus faible que *M×g*. Enfin *Msin* Goliath privilégie aussi l'absorption d'azote exogène, semble être moins efficient en terme de remobilisation automnale de l'azote de ses parties aérienne engendrant une plus forte teneur en azote restante dans celles-ci à la fin de l'hiver impliquant une plus grosse exportation de nutriment par tonne de biomasse lors de la récolte et présente un nombre de tiges de cohorte émise tardivement encore vertes important. Il est possible de rapprocher ces différents types de fonctionnement des concepts des stratégies de fonctionnement primaires, ou classification CSR (*Competitive*, *Stress-Tolerant* et *Ruderal*), développés par Grime (1977), classant les espèces végétales selon trois types de stratégie de fonctionnement : les espèces compétitives (C), les espèces tolérantes au stress (S) et les espèces rudérales (R) c'est-à-dire poussant dans des espaces perturbés et instables. A la lumière de nos résultats, nous pouvons suggérer que *M×g* présente une stratégie de compétition par rapport aux ressources du milieu alors que les *Msin* présentent plutôt une stratégie de tolérance au stress. Cependant, pour vérifier cette hypothèse, une analyse plus poussée des différents traits de croissance doit être menée et l'utilisation de l'outil « StrateFy Tool », rapporté par Crowley et Wingler (2020), basé sur les caractéristiques des feuilles (surface, poids frais, poids sec) (Pierce *et al.*, 2017) pourrait être envisagée. Finalement, selon ce classement fonctionnel des génotypes (Tableau 12), *M×g* peut être considéré comme un bon idéotype pour la production de biomasse, qui présente un recyclage des nutriments performant, lui permettant de présenter des impacts environnementaux limités dans nos conditions d'essai, *Msin* Goliath présente une croissance et un développement intéressant pour la production de biomasse mais n'est pas très adapté pour limiter les impacts environnementaux, en ce sens que son recyclage et l'utilisation et *Msin* Malepartus semble être performant pour limiter les impacts environnementaux mais sa croissance et son développement correspondent moins aux attentes en terme de quantité de biomasse produite. Si *Msin* est effectivement une espèce présentant une stratégie de fonctionnement de type S, il serait probablement mieux adapté aux terres marginales où de nombreux stress sont rencontrés.

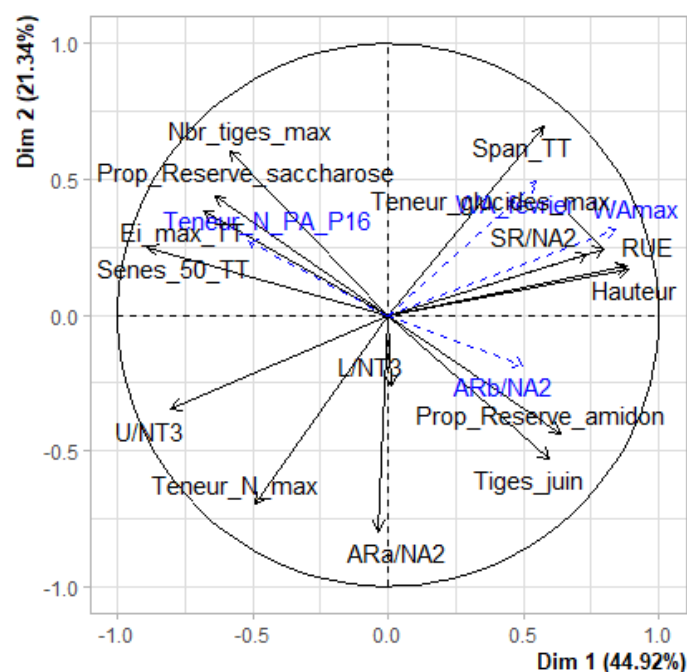


Figure 39. Projection des 19 variables selon le plan factoriel F1xF2 de l'analyse en composantes principales relative aux variables clés (ACP 4)

Les 16 variables actives (en noir) sont celles des variables potentiellement indicatrices des variables explicatives (en bleu) qui sont les variables d'intérêts pour produire de la biomasse en tenant compte de la gestion des réserves. L'ensemble des variables sont décrites en détail dans le tableau 8.

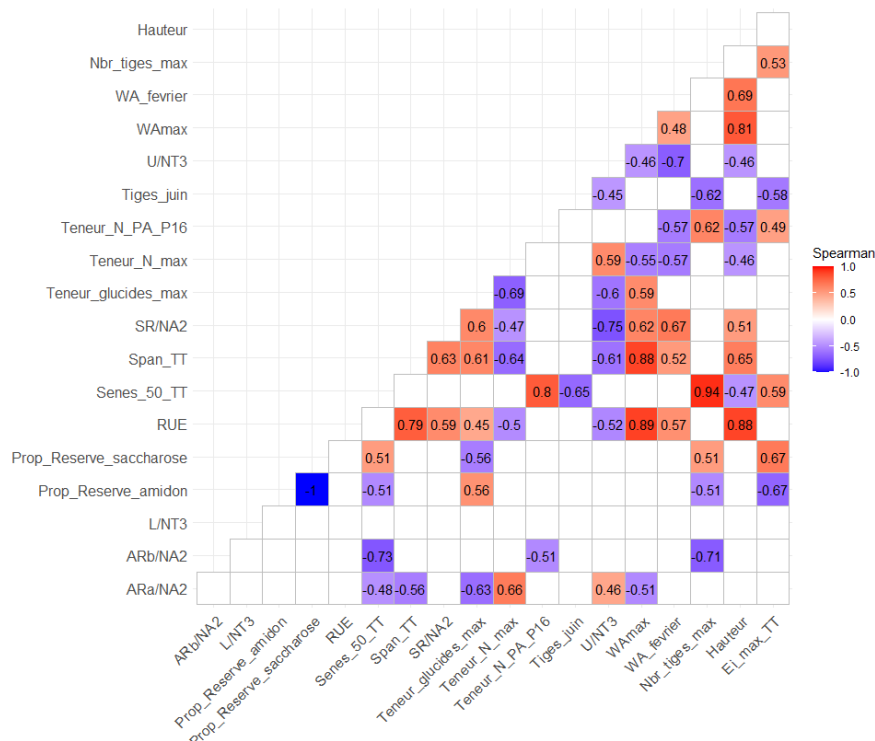


Figure 40. Corrélations de Spearman entre les variables de l'ACP 4 pour les trois génotypes pendant les deux années de culture.

Seuls les coefficients de corrélation positive (rouge) et négative (bleu) significatifs sont présentés ($p < 0.10$).

Pistes de travail à destination de la sélection variétale et de l'agronomie pour optimiser la production de biomasse

Ce lourd travail expérimental, qui a sollicité 5 personnes à temps plein de début mai à fin novembre pendant 2 ans, a permis de mettre en évidence des types de fonctionnement contrastés entre nos génotypes, regroupant nos variables étudiées en types fonctionnels. Ceci nous a permis de montrer que $M \times g$ se rapproche d'un idéotype pour la production de biomasse, puisqu'il est non seulement le génotype qui produit le plus de biomasse aérienne, mais aussi celui qui utilise le plus efficacement ses réserves endogènes, dans les conditions expérimentales de notre essai. Ce travail constitue une première étape, et a permis de souligner des variables d'importance dans le fonctionnement de la plante en lien avec la gestion de ses réserves. Ces variables sont : la production de biomasse aérienne, la teneur en azote des parties aériennes au moment de la récolte (que nous souhaitons la plus faible possible) ainsi que l'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines. Il est à noter que Yu *et al.*, (2013) avaient déjà souligné l'importance de la prise en compte de la teneur en azote des parties aériennes exportées à la récolte dans les pratiques agricoles et les schémas de sélection variétale chez le *Msin*. A l'issue de ce travail de doctorat, il me semble important d'ajouter à cette démarche une variable liée à l'efficacité de mise en réserve, tenant compte du fait qu'une partie non négligeable (44 à 82%) de l'azote retiré des parties aériennes n'est pas retrouvé dans les parties souterraines (Leroy *et al.*, submitted).

Ces variables d'importance dans le fonctionnement de la plante sont difficiles à mesurer pour les sélectionneurs qui travaillent sur un grand nombre de génotypes. En effet, elles impliquent de lourdes expérimentations, souvent destructives tels que la récolte et la mesure du rendement des parties aériennes et de leur contenu en azote pour chaque génotype ou encore le calcul du flux d'azote mis en réserve dans les parties souterraines à l'hiver, impliquant le prélèvement de l'ensemble du rhizome de tous les individus aux dates clés, dates qui sont variables entre génotypes, et qui demande donc la connaissance de ces dates pour chaque génotype. Il est alors intéressant de relier d'autres variables, plus facilement mesurables, à celles d'intérêt pour faciliter le phénotypage des génotypes. Pour ce faire, nous avons réalisé une quatrième ACP (Figure 39) et des corrélations de Spearman (Figure 40) pour déterminer les liens entre les variables de production de biomasse, d'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines et la teneur en azote restante dans les parties aériennes en fin d'hiver.

Ainsi, d'après notre étude, les variables indicatrices d'une production de biomasse aérienne élevée seraient surtout une forte RUE, une date de sortie de panicule tardive et une forte proportion d'azote remobilisée au printemps. Nos résultats confirment que les individus les plus grands sont ceux qui présentent les plus forts rendements ce qui fait de la hauteur des plantes un critère de choix pour la sélection variétale, comme rapporté par Arnoult et Brancourt-Hulmel (2015). Ainsi, pour choisir les génotypes qui présenteront les plus forts rendements, les sélectionneurs devraient opter pour les individus les plus grands qui présentent une sortie de panicule et donc une floraison la plus tardive possible, à condition qu'ils comportent un nombre de tiges élevé. En effet, Clifton-Brown *et al.* (2001) a démontré que les génotypes ayant une floraison tardive ne présentent pas systématiquement de hauts rendements si leur nombre de tiges n'est pas suffisant. A noter que, bien que nous ne l'ayons pas caractérisé dans notre étude, il serait intéressant de doser les glucides non structuraux dans les parties aériennes et de rentrer ces variables dans notre ACP : en effet plusieurs études ont montré que les profils glucidiques (fructose, saccharose et amidon) des parties aériennes pourraient être indicatrices de la productivité des génotypes (Purdy *et al.*, 2015b ; Maddison *et al.*, 2017). Ainsi, les génotypes comportant de fortes teneurs en amidon présentent de plus faibles rendements par rapport aux génotypes à croissance rapide et à hauts rendements, qui allouent plus de carbone à la structure de la biomasse et présentent plus de fructose (Purdy *et al.*, 2015b ; Maddison *et al.*, 2017).

Pour limiter les impacts environnementaux de la production de biomasse chez le miscanthus, et préserver la pérennité de la culture, les individus doivent présenter une faible teneur en azote dans leurs parties aériennes à la fin de l'hiver, lors de la récolte, pour limiter l'exportation des nutriments, d'autant plus s'ils présentent une forte biomasse aérienne. Pour choisir ces individus dont la teneur en azote des parties aériennes en février est faible, il serait nécessaire de privilégier ceux qui présentent une sénescence active précoce et un nombre de tiges assez faible. Un dosage du saccharose et de l'amidon dans le rhizome de ces individus permettrait également d'écarter ceux présentant une plus forte proportion de saccharose que d'amidon, puisque ceux-ci possèdent également dans notre analyse une forte teneur en azote dans leurs parties aériennes au moment de la récolte. Comme abordé dans le troisième chapitre, le dosage des molécules de réserve implique le prélèvement du rhizome complet qui ne serait pas réalisable si l'on multiplie le nombre de génotypes à caractériser. Le rhizome associé aux tiges matures présente des concentrations en molécules de réserve carbonées et en azote similaires au rhizome principal en hiver (chapitre 3), suggérant que cette partie de rhizome pourrait être utilisée en remplacement d'un prélèvement de rhizome complet, comme l'a fait

Lebas (2012). Ainsi, les sélectionneurs pourraient prélever un fragment de rhizome de tiges matures, entre novembre et février, et y doser la concentration en amidon et en saccharose pour écarter les génotypes présentant de fortes proportions en saccharose.

Enfin, nous avons montré une corrélation négative significative entre l'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines à l'automne (AR_b/NA_2) et la teneur en azote des parties aériennes à la fin de l'hiver (Teneur_N_PA_P16) chez nos trois génotypes pendant les deux années d'expérimentation. Cela suggère que plus l'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines est faible, plus la teneur en azote des parties aériennes à la fin de l'hiver est élevée. Une première perspective de travail est de consolider cette corrélation qui permettrait, par une simple analyse de la teneur en azote des parties aériennes en février, d'estimer l'efficacité de mise en réserve automnale de l'azote. La consolidation de cette relation passera par l'utilisation des données déjà existantes dans la littérature, mais également par une expérimentation complémentaire. Pour cela, je propose de choisir une dizaine de génotypes contrastés à propos de la production de biomasse, de l'émission des cohortes et du caractère *stay-green*, de prélever tous les quinze jours à partir du mois d'août leurs parties aériennes et d'en mesurer la teneur en azote jusqu'à la date à laquelle la quantité d'azote de celles-ci diminue, indiquant le début de la mise en réserve de l'azote. A cette date, nous prélèverons les parties souterraines pour déterminer leurs stocks d'azote et ainsi calculer l'efficacité de mise en réserve dans celles-ci grâce à un deuxième prélèvement de rhizome en novembre ou décembre. Une dernière mesure de la teneur en azote des parties aériennes en février complétera les données dont nous avons besoin pour consolider la corrélation. En parallèle, nos résultats suggèrent qu'il est possible d'approcher l'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines en s'intéressant à la proportion de tiges totales déjà présentes en juin : en effet les individus ayant émis une grande proportion de leur nombre de tiges final en juin possèdent également une forte proportion d'amidon dans leurs rhizomes et sont ceux qui présentent la plus forte efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines. Ainsi, les génotypes dont l'émission de tiges est continue durant la saison de végétation, et d'autant plus, ceux qui possèdent une forte proportion de saccharose dans leurs réserves rhizomateuses glucidiques hivernales, sont à contre-sélectionner puisqu'ils présenteraient une faible efficacité de mise en réserve de l'azote dans leurs parties souterraines. Or, les besoins azotés pour la production de la biomasse aérienne étant dépendants du stock d'azote hivernal des parties souterraines au moins chez *M×g* (Strullu *et al.*, 2011), cette constitution des réserves est essentielle pour limiter les impacts environnementaux.

En plus des indicateurs proposés précédemment, d'autres caractéristiques relevées dans notre expérimentation sont à prendre en considération non seulement dans le domaine de la sélection variétale mais également pour dans celui des pratiques culturales. Une attention particulière doit être portée au caractère *stay-green* présent chez les *Msin* puisque les nutriments contenus dans les parties aériennes restées vertes l'hiver peuvent être perdus en cas de gel à l'automne qui n'aurait pas permis à la plante de les remobiliser complètement (Clifton-Brown *et al.*, 2001). De plus, il existe deux types de fonctionnement *stay-green* : le type *functional stay-green* peut augmenter les rendements produits puisqu'il garde ses capacités photosynthétiques alors que le type *cosmetic stay-green* possède encore de la chlorophylle mais ne présente plus de capacités photosynthétiques et n'a donc pas le potentiel d'accroître le rendement (Thomas and Smart, 1993 ; Hörtensteiner, 2009). De ce fait, il est plus intéressant de sélectionner des génotypes de type *functional stay-green*. Du côté agronomique, si l'on utilise des génotypes *stay-green*, il est important de porter une attention aux zones d'implantation en évitant les zones avec des gels d'automne ou d'hiver fréquents et intenses. Il est également important de garder à l'esprit que la présence de ces tissus verts peut induire des différences de composition de la biomasse récoltée et augmenter le taux d'humidité, nécessitant alors un séchage de la biomasse avant stockage pour éviter le développement de moisissures dans celle-ci mais impacter les analyses de cycle de vie. Jensen *et al.* (2017) rapportent ainsi que les sénescences tardives entraînent des contenus en N, P, K, CL, cendres et humidité supérieurs et donnent une biomasse dont la qualité n'est pas adaptée aux processus thermochimiques. La date de récolte influence également la composition de biomasse mais aussi les impacts environnementaux de la production. La récolte « en vert » au début de l'automne entraîne l'exportation des nutriments et nuit à la pérennité de la culture si aucune fertilisation n'est apportée (Strullu *et al.*, 2011 ; Ruf *et al.*, 2017 ; Parrish *et al.*, 2021) alors que la récolte « en sec » à la fin de l'hiver respecte complètement le recyclage des nutriments et préserve la durabilité de la culture (Beale et Long, 1997 ; Himken *et al.*, 1997 ; Strullu *et al.*, 2011 ; Schwartz et Amasino, 2013). Une récolte possible en décembre, sans impacter le recyclage des nutriments, a été suggérée par plusieurs auteurs si la qualité du sol le permet (Heaton *et al.*, 2009 ; Besnard *et al.*, 2013 ; Jensen *et al.*, 2017). Nos résultats confirment ce fait pour les trois génotypes puisque les quantités d'azote dans les parties aériennes ne diminuent plus entre novembre et février et le remplissage du rhizome en azote semble être complet. Cependant, d'autres éléments sont essentiels à la production de la biomasse chez le miscanthus tels que le phosphore, le potassium ou le magnésium et le recyclage de ces nutriments, même s'il est très probablement lié à la sénescence comme pour l'azote, doit être

pris en compte dans le choix de la date de récolte. Enfin, une récolte en décembre engendrerait une suppression des tiges encore ornées de quelques feuilles qui offre une protection contre le froid et le gel des rhizomes et jeunes bourgeons (Zapater, communication personnelle). Des études complémentaires doivent être menées pour s'assurer qu'une suppression du couvert en décembre ne mettrait pas « à nu » trop tôt les rhizomes pendant la période hivernale, notamment lors des premières années lorsque le *mulch* n'est pas encore assez épais, et plus particulièrement chez *Mxg* qui est plus sensible au gel.

Msin Malepartus est un génotype caractérisé par une floraison précoce et une saison de végétation courte, qui, même s'il ne possède pas de hauts rendements, pourrait être intéressant car il semble assez efficace dans le recyclage de l'azote. Des précautions doivent être prises avec ce type de génotype notamment à propos de la gestion du caractère invasif puisqu'une floraison précoce en saison augmente le risque de production de graines viables pouvant se disperser. Une option est de cultiver des génotypes stériles pour éviter ce risque. Les britanniques optent pour la sélection de génotypes à floraison très tardive (Clifton-Brown *et al.*, 2018) car les conditions climatiques ne permettront pas la pollinisation et l'obtention de graines viables. Cependant, une étude récente réalisée par notre équipe (Hou *et al.*, submitted) a montré qu'une diminution de 3°C des températures minimales et maximales journalières avant l'initiation florale a retardé la floraison de trois semaines dans une population de 159 génotypes de *Msin* cultivée en Picardie. Si les génotypes très tardifs sont adaptés pour la Grande-Bretagne, les conditions climatiques françaises plus douces rendraient leur culture plus risquée en France car le risque d'anticipation de la floraison devient réel. Au vu de l'accentuation du changement climatique actuel, il ne semble pas raisonnable à première vue de baser la gestion du risque invasif sur ce fait en France. Dans le cadre du projet français « Biomass pour le Futur », la stérilité a donc été visée de deux manières. La première, la plus classique, est produite par un niveau de ploïdie impair, le plus souvent triploïde, en croisant un génotype tétraploïde avec un génotype diploïde. Le seul mode de reproduction de ce génotype triploïde se réalise alors par la voie végétative. La seconde vise l'édition du gène diplogamète pour produire des triploïdes à graines stériles qui se reproduiraient ensuite par voie végétative également.

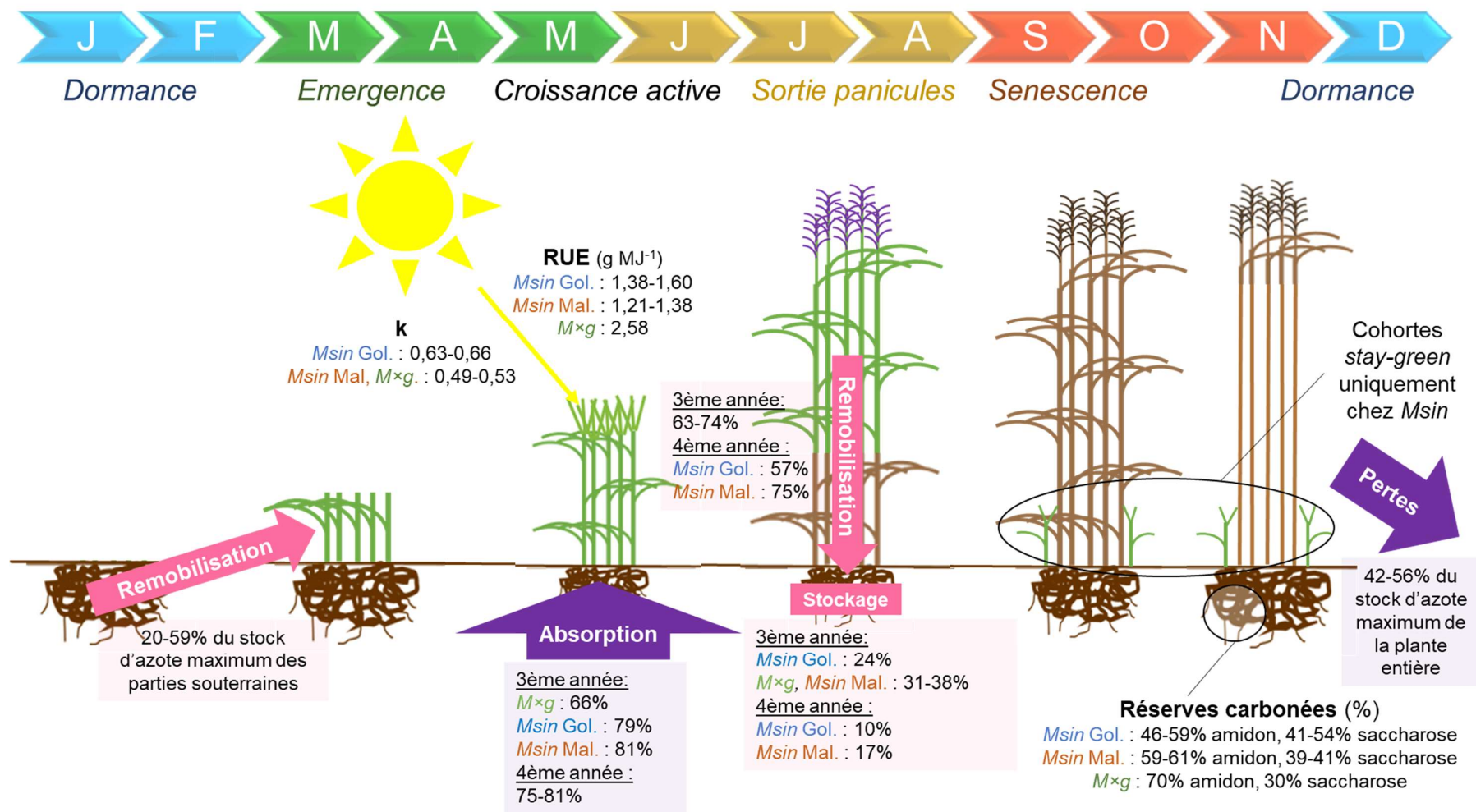


Figure 41. Schéma récapitulatif du fonctionnement des trois génotypes étudiés
 Si les génotypes ne sont pas indiqués, alors les valeurs ne sont pas significativement différentes entre eux
 (Source : INRAE – Julie LEROY)

Partie V - Conclusion et perspectives

5.1. Conclusion

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet français Biomass For the Future (BFF) dont le but était d'optimiser la production et l'utilisation de la biomasse lignocellulosique issue du miscanthus et du sorgho par la création variétale et le développement de nouveaux débouchés en limitant les impacts environnementaux. La création variétale chez le miscanthus nécessite une connaissance du fonctionnement des différents génotypes de miscanthus, notamment du recyclage des nutriments puisque c'est ce mécanisme qui permet de limiter les impacts environnementaux de la production.

Les résultats obtenus dans notre étude nous ont permis de réaliser un schéma récapitulatif du fonctionnement de nos 3 génotypes (Figure 41). Ils nous permettent également d'apporter une partie de ces connaissances et de répondre aux questions posées au début de ce manuscrit :

Existe-t-il des différences de morphologie, d'architecture et de croissance entre $M \times g$ et $Msin$ qui pourraient avoir un lien avec des fonctionnements différents ?

Des différences de morphologie et de développement entre $M \times g$, $Msin$ Goliath et $Msin$ Malepartus, pouvant impacter leur fonctionnement azoté et carboné, ont effectivement été mises en évidence. Les plus hauts rendements de $M \times g$ ne semblent pas avoir un impact sur son fonctionnement azoté. En revanche, les différences de dynamique de sénescence, de durée de saison de croissance des parties aériennes et de saison de végétation pourraient avoir un impact sur la gestion des réserves carbonées. Enfin, une différence notable entre $M \times g$ et $Msin$ réside dans l'émission continue des tiges chez cette dernière espèce dont les deux génotypes étudiés peuvent être caractérisés de *stay-green*, caractère suspecté d'avoir un impact sur la gestion des réserves carbonées et azotées mais dont aucune preuve claire n'a pu être mise en évidence.

Le recyclage de l'azote de M_{sin} est-il aussi performant que celui de $M \times g$?

Même si les flux d'azote endogènes sont plus importants chez $M \times g$ que chez les deux M_{sin} , ce qui est expliqué en partie par des biomasses plus importantes de ce premier génotype, l'étude des efficacités de recyclage de l'azote ne nous a pas permis d'identifier de différence significative entre génotypes, peut-être à cause de la variabilité de nos données.

Les flux exogènes d'azote, correspondant aux acquisitions et pertes d'azote par la plante, sont-ils similaires chez M_{sin} et $M \times g$?

Comme pour les flux endogènes d'azote, les flux exogènes, c'est-à-dire les quantités d'azote absorbé par la plante et perdu pendant l'hiver, sont supérieurs chez $M \times g$ par rapport à M_{sin} . Cependant, en terme de proportion de ces flux par rapport au stock d'azote total maximum des plantes, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre génotypes. Nos résultats mettent en évidence que l'absorption d'azote exogène est importante pour les trois génotypes et surtout la présence de pertes non négligeables : 42 à 56% de la quantité d'azote maximale de la plante totale est perdue durant l'automne et l'hiver.

Existe-t-il des différences concernant le stockage et la remobilisation du carbone en termes de molécules et de dynamiques entre M_{sin} et $M \times g$?

Nos travaux ont mis en évidence que les teneurs en glucides maximales de réserve étaient plus importantes chez $M \times g$ et principalement composées d'amidon chez ce génotype contrairement à M_{sin} Goliath qui présente une forte proportion de saccharose.

Est-ce que les dynamiques de stockage et de remobilisation du carbone et de l'azote diffèrent en fonction du statut (source ou puits) des différents tissus du rhizome et des bas de tige ?

Des rôles différents dans le stockage des molécules de carbone et d'azote ont été mis en évidence entre les différents compartiments fonctionnels définis : les bas de tiges stockent provisoirement de l'amidon pendant l'été uniquement, et les rhizomes qui leurs sont associés, ainsi que le rhizome associé aux bourgeons, sont des organes de stockage du carbone et de l'azote durant l'hiver.

Les dynamiques de stockage d'azote et de carbone sont-elles identiques ?

L'indépendance des dynamiques de stockage d'azote et de carbone, étudiée simultanément chez trois génotypes pour la première fois dans notre étude, est liée aux processus distincts à l'origine de ces stockages : accumulation de carbone pendant la saison de végétation liée à la photosynthèse et au recyclage de l'azote des parties aériennes durant la sénescence. Un recyclage de carbone en parallèle de celui de l'azote durant la sénescence, mais ne contribuant qu'à une faible part de la quantité de réserves hivernales, a été suggéré.

Peut-on établir des corrélations entre les variables environnementales, phénologiques et de gestion des réserves carbonées et azotées ?

Nous avons pu mettre en évidence des corrélations entre les conditions environnementales (températures, rayonnement), la sénescence et le stockage du carbone et de l'azote. Les résultats suggèrent également que les déclencheurs de la sénescence et du recyclage de l'azote ne sont pas uniquement liés à la photopériode et/ou à la température chez le miscanthus mais sont également sous contrôle génétique et physiologique.

Peut-on proposer des types fonctionnels, qui correspondraient aux trois génotypes, pour produire de la biomasse en tenant compte des réserves endogènes des plantes ?

L'analyse en composantes principales réunissant les variables importantes générées dans les précédents chapitres ségrège les trois génotypes étudiés selon deux composantes : une première qui concerne les sources d'azote utilisées pour la production de biomasse et l'acquisition des réserves carbonées, avec la RUE qui contribue le plus à cet axe, sur lequel les *Msin* s'opposent à *M×g*, et une seconde qui concerne l'efficacité de remobilisation automnale de l'azote séparant *Msin* Malepartus de *Msin* Goliath et sur lequel *M×g* est intermédiaire. Trois types fonctionnels correspondant aux trois génotypes ont pu être mis en évidence : *M×g* peut être considéré comme un bon idéotype pour la production de biomasse, avec un recyclage performant des nutriments et un rendement important, *Msin* Goliath présente une croissance et un développement intéressant pour la production de biomasse mais ne semble pas très adapté pour limiter les impacts environnementaux et *Msin* Malepartus semble être performant pour limiter les impacts environnementaux mais sa croissance et son développement correspondent moins aux attentes en terme de quantité de biomasse produite.

Quelles sont les variables indicatrices pouvant être proposées aux sélectionneurs et les caractéristiques à prendre en compte pour optimiser la production de biomasse d'un point de vue agronomique ?

Des variables indicatrices permettant de faciliter le phénotypage pour caractériser la production de biomasse et l'utilisation des ressources endogènes ont pu être proposées. Une forte RUE, une date de sortie de panicule tardive et une forte proportion d'azote remobilisée au printemps seraient des indicateurs de forte production de biomasse aérienne. Une sénescence active précoce et un nombre de tiges faible, associés à une plus forte proportion d'amidon que de saccharose dans les réserves carbonées du rhizome l'hiver, seraient liés à une faible teneur en azote dans les parties aériennes à la fin de l'hiver. En plus de ces indicateurs, d'autres caractéristiques importantes sont à prendre en compte par la sélection variétale et l'agronomie. Le caractère *stay-green* présenté par les *Msin* est à prendre en compte dans le choix des génotypes utilisés et de l'adaptation aux différentes zones de production, de la composition de biomasse souhaitée et dans l'analyse de cycle de vie. La floraison, même si elle ne semble pas clairement liée à la sénescence ou au recyclage des nutriments, marque le moment à partir

duquel la croissance des parties aériennes n'est plus possible et présente un impact sur les rendements produits. Chez les trois génotypes étudiés, d'un point de vue physiologique, la date de récolte pourrait être avancée en décembre sans perturber le recyclage de l'azote. Cependant, d'autres faits sont à prendre en compte dans l'avancement de la date de récolte, telle que la composition de biomasse, son taux d'humidité et l'éventuelle dégradation du sol s'il n'est pas assez portant.

En conclusion *Msin* est une espèce prometteuse pour élargir l'offre variétale puisqu'elle présente une capacité de production de biomasse intéressante et un recyclage de l'azote assez efficient. Cependant, l'étude de certaines caractéristiques pouvant impacter le fonctionnement et la gestion des réserves carbonées et azotées doit être approfondie.

5.2. Perspectives

Etant donné que la culture du miscanthus ne doit pas entrer en compétition avec les ressources alimentaires, elle doit être réalisée sur des terres marginales. Ces terres, où la production alimentaire durable n'est pas envisageable, sont caractérisées par différents types de stress abiotiques (froid, sécheresse, inondation, sol peu riche et peu profond...). Notre étude a caractérisé le fonctionnement de trois génotypes de miscanthus en conditions optimales mais il est à l'avenir nécessaire d'étudier la réponse en terme de fonctionnement, et particulièrement de la gestion des réserves carbonées et azotées, chez différents génotypes dans des contextes pédoclimatiques variés. La caractérisation de ces seuls trois génotypes a mobilisé des moyens humains, techniques et financiers conséquents et la multiplication du nombre de génotypes dans une telle étude n'est pas envisageable. Nous avons proposé des variables indicatrices de l'efficacité du recyclage de l'azote et de la production de biomasse, caractères d'intérêt dans les schémas de sélection variétale. Par exemple, la corrélation négative significative entre l'efficacité de mise en réserve de l'azote dans les parties souterraines à l'automne (AR_b/NA_2) et la teneur en azote des parties aériennes à la fin de l'hiver (Teneur_N_PA_P16) discutée précédemment doit être validée pour que la teneur en azote des parties aériennes puisse être utilisée comme variable indicatrice de l'efficacité de recyclage de l'azote pour faciliter le phénotypage à plus grande échelle et dans des contextes pédoclimatiques variés. Les autres variables indicatrices proposées doivent également être validées par l'acquisition de données semblables sur plusieurs génotypes contrastés. Concevoir les futures expérimentations en *staggered-start design* (implantation des mêmes génotypes avec une année de décalage)

présenterait l'avantage de pouvoir distinguer les effets de la variabilité liée aux conditions environnementales et à l'âge de la culture sur les variables mesurées (Loughin, 2006 ; Segura *et al.*, 2008 ; Tejera *et al.*, 2019). Il faut toutefois noter que ce type de dispositif nécessite des moyens humains, techniques et financiers plus importants.

Une autre approche pour multiplier le nombre de génotypes étudiés dans des contextes pédoclimatiques variés serait l'utilisation de la modélisation. Le modèle de fonctionnement sol-plante-atmosphère STICS permettrait l'exploration *in silico* d'idéotypes de miscanthus pour la production de biomasse. STICS a récemment été adapté aux plantes pérennes et à $M \times g$ mais il serait nécessaire de pouvoir l'utiliser pour d'autres espèces de miscanthus. Grâce à notre étude, de nombreuses variables caractérisant la morphologie, le développement, la croissance et le fonctionnement de deux génotypes de *Msin* ont été générées. Ce type de variables seraient utilisées pour calibrer le modèle sur les *Msin*. Après évaluation de la qualité du modèle nouvellement calibré, nous pourrions simuler la production de biomasse, les impacts environnementaux et explorer *in silico* des idéotypes.

Des pertes d'azote non négligeables par la plante entière, déjà mentionnées dans la littérature mais dont les origines n'ont pas été élucidées, ont été mises en évidence chez nos trois génotypes. L'étude de l'origine de ces pertes paraît essentielle pour assurer la durabilité de la production de biomasse. En effet, une des hypothèses expliquant l'origine des pertes serait l'émission d'ammoniac (NH_3) ou de protoxyde d'azote N_2O par les plantes, qui aurait dans ce cas un impact environnemental négatif. Une première approche pour tester cette hypothèse consisterait à cultiver des plantes en chambres individuelles et à mesurer les émissions de N_2O et de NH_3 des parties aériennes par des prélèvements d'air dans ces chambres. En revanche, si ces pertes sont attribuées à de la rhizodéposition, une autre des hypothèses émises, elles contribueraient au développement d'une communauté bactérienne et/ou fongique qui pourrait alors fournir des nutriments à la plante en retour. Une analyse de la rhizodéposition pourrait être menée grâce à marquage (^{15}N) entre juin et août par la technique du *split-root*, qui consiste en la séparation des parties souterraines dans deux compartiments, ce qui permet de marquer une partie des racines dans le premier compartiment et d'analyser le contenu rhizodéposé par l'autre partie des racines dans le second compartiment. En complément de cette approche en *split-root*, il serait intéressant de caractériser les micro-organismes de la rhizosphère des différents génotypes. En effet, nous avons pu observer qu'en proportion, les *Msin*, absorbent plus d'azote exogène qui ne provient pas de la fertilisation que $M \times g$ ce qui pourrait être

expliqué en partie par des différences de symbiose avec des organismes fixateurs d'azote entre génotypes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abas N, Kalair A, Khan N (2015) Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69 : 31-49. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2015.03.003>.

Agindotan B, Okanu N, Oladeinde A, Voigt T, Long S, Gray M, Bradley C (2013) Detection of Switchgrass mosaic virus in *Miscanthus* and other grasses. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(1):81–6. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.752763>

Ahonsi MO, Agindotan BO, Williams DW, Arundale R, Gray ME, Voigt TB, Bradley CA (2010) First Report of *Pithomyces chartarum* Causing a Leaf Blight of *Miscanthus* × *giganteus* in Kentucky. *Plant Dis.*, Apr;94(4):480. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0480C>.

Andrejić G, Gajić G, Prica M, Dzeletovic Z, Rakic T (2018) Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll a fluorescence in Zn-stressed *Miscanthus* × *giganteus* plants. *Photosynthetica*, 56 : 1249–1258. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0827-3>

Anzoua KG, Suzuki K, Fujita S, Toma Y, Yamada T (2014) Evaluation of morphological traits, winter survival and biomass potential in wild Japanese *Miscanthus sinensis* Anders. Populations in northern Japan. *Grassland Science*, 61 :83-91. <https://doi.org/10.1111/grs.12085>

Arnoult (2014) Contribution à la définition d'idéotypes de miscanthus valorisables pour la production de bioéthanol de 2^{ème} génération et perspectives en sélection. Thèse soutenue le 29 septembre 2014 à l'Université Lille 1.

Arnoult S, Brancourt-Hulmel M (2015) A review on miscanthus biomass production and composition for bioenergy use : genotypic and environmental variability and implications for breeding. *Bioenergy Research*, 8 :502-526. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9524-7>

Avise JC, Ourry A, Lemaire G, Volenec JJ, Boucaud J (1997) Root Protein and Vegetative Storage Protein Are Key Organic Nutrients for Alfalfa Shoot Regrowth. *Crop Science*, 37: 1187-1193. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700040027x>

Avise JC, Le Dily F, Goulas E, Noquet C, Meuriot F, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP, Ourry A (2003) Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany*, 81(12) :1198-1212. <https://doi.org/10.1139/b03-122>

B

Barbosa B, Boléo S, Sidella S, Costa J, Duarte MP, Mendes B, Cosentino SL, Fernando AL (2015) Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using the Perennial Energy Crops *Miscanthus* spp. and *Arundo donax* L.. *Bioenerg. Res.* 8: 1500–1511. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9688-9>

Barnes CR (1893) On the food of green plants. *Botanical Gazette*, 403-411

Bausenwein, U, Millard, P, Raven, J.A. (2001) Remobilized old-leaf nitrogen predominates for spring growth in two temperate grasses. *New Phytologist*, 152, 283-290

Bhatla, Satish C, Lal, Manju A. (2018) *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer Edition, 1237 p.

Beale CV, Bint DA, Long SP (1996) Leaf photosynthesis in the C₄-grass *Miscanthus x giganteus*, growing in the cool temperate climate of southern England. *Journal of Experimental Botany*, 47(295), 267-273. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.2.267>

Beale CV, Long SP (1997) Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C₄-grasses *Miscanthus x giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy*, 12(6):419-428. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(97\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(97)00016-0)

Beale CV, Morison JIL, Long SP (1999) Water use efficiency of C₄ perennial grasses in a temperate climate. *Agricultural and Forest Meteorology*, 96(1-3) :103-115. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(99\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(99)00042-8).

Beccari G, Covarelli L, Balmas V, Tosi L (2010) First report of *Miscanthus x giganteus* rhizome rot caused by *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum* and *Mucro hiemalis*. *Australasian Plant Disease Notes*, 5 : 28-29. <https://doi.org/10.1071/DN10011>

Bellamy PE, Croxton PJ, Heard MS, Hinsley SA, Hulmes SJ, Hulmes S, Nuttall P, Pywell RF, Rothery P (2009) The impact of growing miscanthus for biomass on farmland bird populations. *Biomass and Bioenergy*, 33(2) : 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.07.001>.

Belmokhtar N, Arnoult S, Chabbert B, Charpentier JP, Brancourt-Hulmel M (2017) Saccharification Performances of *Miscanthus* at the Pilot and Miniaturized Assay Scales: Genotype and Year Variabilities According to the Biomass Composition. *Frontiers in Plant Science*, 8:740. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00740>

Ben Fradj N, Rozakis S, Borzęcka M, Matyka M (2020) *Miscanthus* in the European bio-economy : A network analysis. *Industrial Crops and Products*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112281>

Besnard A, Ferchaud F, Levraut F, Marsac S, Nguyen E, Savouré ML (2013) LIGNOGUIDE : Guide d'aide au choix des cultures lignocellulosiques. [Rapport de recherche] auto-saisine. 2013. fahal-01603736

Bolus S, Malapi-Wight M, Grinstead SC, Fuentes-Bueno I, Hendrickson L, Hammond RW, Molloy D (2020) Identification and characterization of *Miscanthus* yellow fleck virus, a new poliovirus infecting *Miscanthus sinensis*. *PLoS ONE*, 15(9): e0239199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239199>

Bradshaw JD, Prasifka JR, Steffey KL, Gray M.E (2010) First Report of Field Populations of Two Potential Aphid Pests of the Bioenergy Crop *Miscanthus x giganteus*. *The Florida Entomologist*, 93(1), 135-137. <https://doi.org/10.1653/024.093.0123>

Bréda N, Soudani K & Bergonzini J (2002). Mesure de l'indice foliaire en forêt. ECOFOR

(Ed.). 157 p

Brosse N, Dufour A, Meng X, Sun Q, Ragauskas A (2012) *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofpr*, 6(5): 580-598. <https://doi.org/10.1002/bbb.1353>

C

Cadoux S, Riche A.B, Yates N.E, Machet J.M (2012) Nutrient requirements of *Miscanthus* × *giganteus*: Conclusions from a review of published studies. *Biomass and Bioenergy*, 38 :14-22. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.015>

Cadoux S, Ferchaud F, Demay C, Boizard H, Machet JM, Fourdinier E, Preudhomme M, Chabbert B, Gosse G, Mary B (2014) Implications of productivity and nutrient requirements on greenhouse gas balance of annual and perennial bioenergy crops. *GCB Bioenergy*, 6(4) :425-438. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12065>

Cerasoli S, Maillard P, Scartazza A, Brugnoli E, Chaves MM, Pereira JS (2004). Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. *Annals of Forest Science*, 61 : 721-729.

Chapin FS, Schulze E, Mooney HA (1990) The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21: 423-447. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.002231>

Christian DG, Poulton PR, Riche AB, Yates NE, Todd AD (2006) The recovery over several seasons of ¹⁵N-labelled fertiliser applied to *Miscanthus* × *giganteus* ranging from 1 to 3 years old. *Biomass and Bioenergy*, 30:125-133. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.11.002>

Christian DG, Riche AB, Yates NE (2008) Growth, yield and mineral content of *Miscanthus*×*giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops and Products*, 28(3) : 320-327. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.02.009>

Clifton-Brown JC, Jones MB (1997) The thermal response of leaf extension rate in genotypes of the C4-grass *Miscanthus*: an important factor in determining the potential productivity of different genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 48(313): 1573-1581. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.8.1573>

Clifton-Brown JC, Jones MB (1999) Alteration of transpiration rate, by changing air vapour pressure deficit, influences leaf extension rate transiently in *Miscanthus*. *Journal of Experimental Botany*, 50(337) : 1393-1401. <https://doi.org/10.1093/JXB/50.337.1393>

Clifton-Brown JC, Lewandowski I (2000a) Water Use Efficiency and Biomass Partitioning of Three Different *Miscanthus* Genotypes with Limited and Unlimited Water Supply. *Annals of Botany*, 86(1) : 191-200. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1183>.

Clifton-Brown JC, Lewandowski I (2000b) Overwintering problems of newly established *Miscanthus* plantations can be overcome by identifying genotypes with improved rhizome cold tolerance. *New phytologist*, 148 :287-294. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00764.x>

Clifton-Brown JC, Neilson B, Lewandowski I, Jones MB (2000) The modelled productivity of *Miscanthus* × *giganteus* (GREEF et DEU) in Ireland. *Industrial Crops and Products*, 12 :97-109. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00042-X)

Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Andersson B, Basch G, Christian DG, Kjeldsen JB, Jørgensen U, Mortensen JV, Riche AB, Schwarz K, Tayebi K, Teixeira F (2001) Performance of 15 *Miscanthus* Genotypes at Five Sites in Europe. *Agron. J.*, 93: 1013-1019. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.9351013x>

Clifton-Brown JC, Lewandowski I (2002) Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in Southern Germany. *European Journal of Agronomy*, 16 : 97-110. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(01\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(01)00120-4)

Clifton-Brown JC, Breuer J, Jones MB (2007) Carbon mitigation by the energy crop, *Miscanthus*. *Global Change Biology*, 13: 2296-2307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01438.x>

Clifton-Brown JC, Chiang YC, Hodgkinson TR. (2008) *Miscanthus*: Genetic Resources and Breeding Potential to Enhance Bioenergy Production. In: Vermerris W (ed) *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer, pp 273-294

Clifton-Brown J, Schwarz KU, Hastings A (2015) History of the development of *Miscanthus* as a bioenergy crop : from small beginnings to potential realisation. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115B(1) :1-13. <https://doi.org/10.3318/BIOE.2015.05>

Clifton-Brown J, Harfouche A, Casler MD, Dylan Jones H, Macalpine WJ, Murphy-Bokern D, Smart LB, Adler A, Ashman C, Awty-Carroll D, Bastien C, Bopper S, Botnari V, Brancourt-Hulmel M, Chen Z, Clark LV, Cosentino S, Dalton S, Davey C, Dolstra O, Donnison I, Flavell R, Greef J, Hanley S, Hastings A, Hertzberg M, Hsu TW, Huang LS, Iurato A, Jensen E, Jin X, Jørgensen U, Kiesel A, Kim DS, Liu J, McCalmont JP, McMahon BG, Mos M, Robson P, Sacks EJ, Sandu A, Scalici G, Schwarz K, Scordia D, Shafiei R, Shield I, Slavov G, Stanton BJ, Swaminathan K, Taylor G, Torres AF, Trindade LM, Tschaplinski T, Tuskan GA, Yamada T, Yeon Yu C, Zalesny RS Jr, Zong J, Lewandowski I (2018) Breeding progress and preparedness for mass-scale deployment of perennial lignocellulosic biomass crops switchgrass, miscanthus, willow and poplar. *Glob Change Biol Bioenergy.*, 11(1):118-151. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12566>.

Clifton-Brown J, Schwarz K-U, Awty-Carroll D, Iurato A, Meyer H, Greef J, Gwyn J, Mos M, Ashman C, Hayes C, Huang L, Norris J, Rodgers C, Scordia D, Shafiei R, Squance M, Swaller T, Youell S, Cosentino S, Flavell R, Donnison I, Robson P (2019) Breeding Strategies to Improve *Miscanthus* as a Sustainable Source of Biomass for Bioenergy and Biorenewable Products. *Agronomy*, 9, 673. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110673>

Cosentino SL, Patane C, Sanzone E, Copani V, Salvatore F (2007) Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus 9 giganteus* Greef et Deu. in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products*, 25, 75–88.

Coulette Q, Couty A, Lasue P, Rambaud C, Ameline A (2013) Colonization of the Biomass Energy Crop *Miscanthus* by the Three Aphid Species, *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, and *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Economic Entomology*, 106(2) : 683–689. <https://doi.org/10.1603/EC12147>

Crowley S, Wingler A (2020) Functional strategies and life histories of grasses underlying yield and resilience. *Annual Plant Reviews*, 3 :111-134. <https://doi.org/10.102/9781119312994.apr0726>

D

Danalatos NG, Archontoulis S, Mitsios I (2007) Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus x giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass and Bioenergy*, 31 (2-3), 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.07.004>

Davey CL, Jones LE, Squance M, Purdy SJ, Maddison AL, Cunniff J, Donnison I, Clifton-Brown J (2017) Radiation capture and conversion efficiencies of *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* and their naturally occurring hybrid *M. x giganteus*. *Glob Change Biol Bioenergy*, 9(2): 385-399. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12331>

Demestihis C, Debuissou S, Descotes A (2018) Decomposing the notion of vine vigour with a proxydetection shoot sensor: Physiocap®. *E3S Web of Conferences*, 50, 03003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20185003003>

De Vega JJ, Peel N, Purdy SJ, Hawkins S, Donnison I, Dyer S, Farrar K (2020) Preprint : Differential expression of starch and sucrose metabolic genes linked to varying biomass yield in *Miscanthus* hybrids. Preprint in Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-83015/v1>

Diamantidis ND, Koukios EG (2000) Agricultural crops and residues as feedstocks for non-food products in Western Europe. *Industrial Crops and Products*, 11 :97-106. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00045-X)

Dickson RE (1989) Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann. Sci. For.*, 46 suppl :631-647. hal-00882634f

De Souza AP, Arundale RA, Dohleman FG, Long SP, Buckeridge MS (2013) Will the exceptional productivity of *Miscanthus x giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂? *Agricultural and Forest Meteorology*, 171-172: 82-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.11.006>

Dohleman FG, Long SP (2009) More Productive than Maize in the Midwest : How does *Miscanthus* Do It ? *Plant Physiology*, 150 : 2104-2115.

Donadelli RA, Aldricj CG (2019) The effects on nutrient utilization and stool quality of Beagle dogs fed diets with beet pulp, cellulose, and *Miscanthus* grass. *Journal of Animal Science*, 4134–4139. <https://doi.org/10.1093/jas/skz265>

Dong H, Clark LV, Jin X, Anzoua K, Bagmet L, Chebukin P, Dzyubenko E, Dzyubenko N, Ghimire BK, Heo K, Johnson DA, Nagano H, Sabitov A, Peng J, Yamada T, Yoo JH, Yu CY, Zhao H, Long SP, Sacks EJ (2021) Managing flowering time in *Miscanthus* and sugarcane to

facilitate intra- and intergeneric crosses. PLoS One, 16(1):e0240390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240390>.

E

Eckert B, Weber OB, Kirchhof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A (2001) *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51 : 17–26. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>

El Zein R, Bréda N, Gérant D, Zeller B, Maillard P (2011) Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an in situ ¹⁵N labeling approach. Tree Physiology, 31(12) : 1390–1400. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr118>

F

Farrell A, Clifton-Brown J, Lewandowski I, Jones M (2006) Genotypic variation in cold tolerance influences the yield of *Miscanthus*. Annals of Applied Biology, 149: 337-345. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00099.x>

Feng XP (2013) Identification of the traits of interest to drive the collecting of *Miscanthus* in China. Thèse soutenue à l'Université de Lille 1 le 28 janvier 2013.

Ferchaud F (2015). Étude des bilans d'eau, d'azote et de carbone dans des agrosystèmes dédiés à la production de biomasse en fonction des espèces et des pratiques culturales. Agronomie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Ferchaud F, Vitte G, Bornet F, Strullu L, Mary B (2015) Soil water uptake and root distribution of different perennial and annual bioenergy crops. Plant and Soil, 388 : 307-322. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2335-y>

Ferchaud F, Vitte G, Mary B (2016) Changes in soil carbon stocks under perennial and annual bioenergy crops. Global Change Biology Bioenergy, 2016, 8 (2) :290-306. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12249>

Ferchaud F, Mary B (2016) Drainage and Nitrate Leaching Assessed During 7 Years Under Perennial and Annual Bioenergy Crops. Bioenerg. Res. 9 : 656–670. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9710-2>

Ferchaud, F., Mary, B., Rupngam, T., and Chenu, C. (2020) Changes in soil carbon stocks and distribution under perennial and annual bioenergy crops, EGU General Assembly 2020, Online, 4–8 May 2020, EGU2020-20118, <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu2020-20118>, <https://meetingorganizer.copernicus.org/EGU2020/EGU2020-20118.html>

Fonteyne S, Muylle H, De Swaef Tom, Reheul D, Roldán-Ruiz I, Lootens P (2016) How low can you go ? – Rhizome and shoot frost tolerance in *Miscanthus* germplasm. Industrial Crops and Products, 89: 323-331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.031>

Foyer C.H, Ferrario-Mery S, Noctor G. (1986) Plant nitrogen : Interactions between carbon and nitrogen metabolism. Ed. Springer, 237-254

Franck N, Vaast P, Génard M, Dauzat J (2006) Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology*, 26(4) : 517–525. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.517>

Fujiwara T, Nambara E, Yamagishi K, Goto DB, Naito S (2002) Storage Proteins. *The Arabidopsis Book* 1:e0020. doi:10.1199/tab.0020

Furze ME, Jensen AM, Warren JM, Richardson AD (2018) Seasonal patterns of nonstructural carbohydrate reserves in four woody boreal species. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 145(4) :332-339. <https://doi.org/10.3159/TORREY-D-18-00007.1>

Fusi A, Bacenetti J, Proto A.R, Tedesco D.E.A, Pessina D, Facchinetti D (2021) Pellet Production from *Miscanthus*: Energy and Environmental Assessment. *Energies*,14, 73. <https://dx.doi.org/10.3390/en14010073>

G

Gastal F, Lemaire F (2002) N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*, 53(370): 789–799. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.789>

Gauder M, Graeff-Hönniger S, Lewandowski I, Claupein W (2012), Long-term yield and performance of 15 different *Miscanthus* genotypes in southwest Germany. *Ann Appl Biol*, 160: 126-136. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00526.x>

GIEC (201) Résumé à l'intention des décideurs. In: Rapport spécial du GIEC sur les sources d'énergie renouvelable et l'atténuation des effets des changements climatiques [sous la direction de O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer et C. von Stechow], Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni et New York (État de New York), États-Unis d'Amérique

GIEC (2019) Résumé à l'intention des décideurs, Changement climatique et terres émergées: rapport spécial du GIEC sur le changement climatique, la désertification, la dégradation des sols, la gestion durable des terres, la sécurité alimentaire et les flux de gaz à effet de serre dans les écosystèmes terrestres. [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D. C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley, (dir. publ.)].

Gosse G, Varlet-Grancher C, Bonhomme R, Chartier M, Allirand JM, Lemaire G (1986) Production maximale de matière sèche et rayonnement solaire intercepté par un couvert végétal. *Agronomie*, EDP Sciences, 1986, 6 (1) : 47-56. <https://doi.org/10.1051/agro:19860103>

Greef JM, Deuter M (1993) Syntaxonomy of *Miscanthus* × *giganteus* GREEF et DEU. *Angewandte Botanik*, 67 :87-90.

Greef JM, Deuter M, Jung C, Schondelmaier J (1997) Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44 : 185-195. <https://doi.org/10.1023/A:1008693214629>

Grime JP (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111(982):1169-1194.

Grisham MP, Maroon-Lango CJ, Hale AL (2012) First Report of Sorghum mosaic virus Causing Mosaic in *Miscanthus sinensis*. *Plant Disease*, 96(1):150. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-11-0617>

Guérin T, Ghinet A, Waterlot C (2021) Toward a New Way for the Valorization of Miscanthus Biomass Produced on Metal-Contaminated Soils Part 2: Miscanthus-Based Biosourced Catalyst: Design, Preparation, and Catalytic Efficiency in the Synthesis of Moclobemide. *Sustainability*, 13, 34. <https://dx.doi.org/10.3390/su13010034>

Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C (2010) Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. *Comptes Rendus Biologies*, 333(4): 382-391. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.01.016>.

Gumentyk M, Kharytonov M (2018) Development and assessment of technologies of miscanthus and switchgrass growing in forest-steppe zone of Ukraine. *Agriculture & Forestry*, 64(2): 137-146. <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.64.2.10>

H

Hamilton S K, Hussain M Z, Bhardwaj AK, Basso B, Robertson GP (2015) Comparative water use by maize, perennial crops, restored prairie, and poplar trees in the US Midwest. *Environmental Research letters*, 10, <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/6/064015>.

Harris-Shultz K, Ni X (2021) A Sugarcane Aphid (Hemiptera: Aphididae) “Super-Clone” Remains on U.S. Sorghum and Johnsongrass and Feeds on Giant Miscanthus. *Journal of Entomological Science* 1, 56 (1): 43–52. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-56.1.43>

Hartmann H, Trumbore S (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist*, 211: 386-403. <https://doi.org/10.1111/nph.13955>

Hastings A, Clifton-Brown J, Wattenbach M, Mitchell CP, Smith P (2009) The development of MISCANFOR, a new *Miscanthus* crop growth model: towards more robust yield predictions under different climatic and soil conditions. *GCB Bioenergy*, 1:154-170. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01007.x>

Hatch MD, Slack CR (1966) Photosynthesis by sugar-cane leaves - A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem J.*, 101(1):103-111. <https://doi.org/10.1042/bj1010103>

Hayes D C (1985). Seasonal nitrogen translocation in big bluestem during drought conditions. *Journal of Range Management*, 38(5), 406-410.

Hayes DJM (2013) Mass and compositional changes, relevant to biorefining, in *Miscanthus x giganteus* plants over the harvest window. *Bioresource Technology*, 142: 591-602. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.108>.

Heaton EA, Long SP, Voigt TB, Jones MB, Clifton-Brown J (2004) *Miscanthus* for Renewable Energy Generation: European Union Experience and Projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9 : 433–451. <https://doi.org/10.1023/B:MITI.0000038848.94134.be>

Heaton EA, Dohleman FG, Long SP (2009) Seasonal nitrogen dynamics of *Miscanthus*×*giganteus* and *Panicum virgatum*. *GCB Bioenergy*, 1: 297-307. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01022.x>

Heaton EA, Dohleman FG, Miguez AF, Juvik JA, Lozovaya V, Widholm J, Zabolina OA, McIsaac GF, David MB, Voigt TB, Boersma NN, Long SP (2010) Chapter 3 - *Miscanthus*: A Promising Biomass Crop. Editor(s): Jean-Claude Kader, Michel Delseny. *Advances in Botanical Research*, 56 :75-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381518-7.00003-0>.

Herrera-Ramírez D, Sierra CA, Römermann C, Muhr J, Trumbore S, Silvério D, Brando PM, Hartmann H (2021) Starch and lipid storage strategies in tropical trees relate to growth and mortality. *New Phytol.*, 230(1):139-154. <https://doi.org/10.1111/nph.17239>.

Himken M, Lammel J, Neukirchen D, Czypionka-Krause U, Olfs HW (1997) Cultivation of *Miscanthus* under West European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilisation. *Plant and Soil*, 189:117-126. <https://doi.org/10.1023/A:1004244614537>

Hodkinson TR, Chase MW, Renvoize SA (2002a) Characterization of a Genetic Resource Collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Annals of Botany*, 89 : 627-636. <https://doi.org/10.1093/aobmcf091>

Hodkinson TR, Chase MW, Takahashi C, Leitch I, Bennett MD, Renvoize SA (2002b) The use of dna sequencing (ITS and *trnL-F*), AFLP, and fluorescent in situ hybridization to study allopolyploid *Miscanthus* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 89(2): 279-286. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.2.279>

Hörtensteiner S (2009) Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence. *Trends Plant Sci*, 14(3):155-62. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.01.002>.

Huggett DAJ, Leather SR, Walters KFA (1999) Suitability of the biomass crop *Miscanthus sinensis* as a host for the aphids *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Rhopalosiphum maidis* (F.), and its susceptibility to the plant luteovirus Barley Yellow Dwarf Virus. *Agricultural and Forest Entomology*, 1999, 1(2):143–9. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.1999.00019.x>

Huisman W, Venturi P, Molenaar J (1997) Costs of supply chains of *Miscanthus giganteus*. *Industrial Crops and Products*, 6(3–4): 353-366. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00026-5).

J

Jensen E, Farrar K, Thomas-Jones S, Hastings A, Donnison I, Clifton-Brown J (2011) Characterization of flowering time diversity in *Miscanthus* species. GCB Bioenergy, 3: 387-400. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2011.01097.x>

Jensen E, Robson P, Farrar K, Thomas Jones S, Clifton-Brown J, Payne R, Donnison I (2017) Towards *Miscanthus* combustion quality improvement : the role of flowering and senescence. GCB Bioenergy, 9 : 891-908. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12391>

Joly D, Brossard T, Cardot H, Cavailhes J, Hilal M, Wavresky P (2010) Les types de climats en France, une construction spatiale. Cybergeog : European Journal of Geography 501. <http://cybergeog.revues.org/23155>

K

Kalinina O, Nunn C, Sanderson R, Hastings AFS, van der Weijde T, Özgüven M, Tarakanov I, Schüle H, Trindade LM, Dolstra O, Schwarz K-U, Iqbal Y, Kiesel A, Mos M, Lewandowski I, Clifton-Brown JC (2017) Extending *Miscanthus* Cultivation with Novel Germplasm at Six Contrasting Sites. Front. Plant Sci. 8:563. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00563>

Kanai T, Masuzawa T(1993) Seasonal Changes in reserve substances of herbaceous perennials in the alpine zone of Mt. Fuji. Proc. NIPR Symp. Polar Biol., 6, 126-132

Kar S, Zhang N, Nakashima T, Villanueva-Morales A, Stewart JR, Sacks EJ, Terajima Y, Yamada T (2019) *Saccharum* × *Miscanthus* intergeneric hybrids (miscanes) exhibit greater chilling tolerance of C4 photosynthesis and postchilling recovery than sugarcane (*Saccharum spp.* hybrids). GCB Bioenergy, 11(11):1318–1333. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12632>

Keymer DP, Kent AD (2014) Contribution of nitrogen fixation to first year *Miscanthus* × *giganteus*. GCB Bioenergy, 6:577-586. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12095>

Kiniry JR, Johnson MVV, Bruckerhoff SB, Kaiser JU, Cordsiemon RL, Harmel RD (2012) Clash of the Titans: Comparing Productivity Via Radiation Use Efficiency for Two Grass Giants of the Biofuel Field. Bioenerg. Res., 5, 41–48. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9116-8>

Kobayashi K, Yokoi Y (2003a) Shoot population dynamics of persisting clones of *Miscanthus sinensis* in the warm-temperate region of Japan. Journal of Plant Research. 116:443-453. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0119-1>

Kobayashi K, Yokoi Y (2017) Shoot density of *Miscanthus sinensis* populations in different habitats and their maintenance mechanisms in relation to shoot growth. J Plant Res., 130(1): 143-156. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0875-3>.

Kraska T, Kleinschmidt B, Weinand J, Pude R (2018) Cascading use of *Miscanthus* as growing substrate in soilless cultivation of vegetables (tomatoes, cucumbers) and subsequent direct combustion. Scientia Horticulturae, 235 : 205-213.

Kryzak J, Pogrzeba M, Rusinowski S, Clifton-Brown J, McCalmont J.P, Kiesel A, Mangold A, Mos M (2017) Heavy Metal Uptake by novel *scanthus* seed-based hybrids cultivated in heavy

metal contaminated soil. Civil and Environmental Engineering Reports, 26(3) : 121-132. <https://doi.org/10.1515/ceer-2017-0040>

L

Lal MA (2018b) Photosynthesis. In: Plant Physiology, Development and Metabolism, Bhatla SC, Lal MA. Springer edition, 159-226. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>

Lambers H, Stuart Chapin III F, Pons T.L. (2008) Plant Physiological Ecology, second edition. Springer, 605 p.

Larsen SU, Jorgensen U, Kjeldsen JB, Laerke PE (2014) Long-Term Miscanthus Yields Influenced by Location Genotype, Row Distance, Fertilization and Harvest Season. BioEnergy Research, 7, 620-635. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9389-1>

Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software, 25(1) : 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>

Lebas, G. (2012) Etude du métabolisme carboné de *Miscanthus x giganteus*. Thèse soutenue à l'Université de Picardie Jules Verne le 28 septembre 2012

Lee KY, Zhang L, Lee GJ (2012) Botanical and germinating characteristics of Miscanthus species native to Korea. Hortic. Environ. Biotechnol, 53 : 490–496. <https://doi.org/10.1007/s13580-012-0137-9>

Lesur C, Jeuffroy M-H, Makowski D, Riche AB, Shield I, Yates N, Fritz M, Formowitz B, Grunert M, Jorgensen U, Laerke PE, Loyce C (2013) Modeling long-term yield trends of *Miscanthus x giganteus* using experimental data from across Europe. Field Crops Research, 149 : 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.05.004>.

Lewandowski I, Clifton-Brown JC, Scurlock J, Huisman W (2000) Miscanthus: European experience with a novel energy crop. Biomass Bioenergy, 19(4):209–227. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00032-5)

Lewandowski I, Scurlock J.M.O, Lindvall E, Christou M (2003) The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. Biomass Bioenerg., 25 :335– 361. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(03\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(03)00030-8)

Lewandowski I, Clifton-Brown J, Trindade LM, van der Linden GC, Schwarz KU, Müller-Sämann K, Anisimov A, Chen CL, Dolstra O, Donnison IS, Farrar K, Fonteyne S, Harding G, Hastings A, Huxley LM, Iqbal Y, Khokhlov N, Kiesel A, Lootens P, Meyer H, Mos M, Muylle H, Nunn C, Özgüven M, Roldán-Ruiz I, Schüle H, Tarakanov I, van der Weijde T, Wagner M, Xi Q, Kalinina O (2016) Progress on Optimizing Miscanthus Biomass Production for the European Bioeconomy: Results of the EU FP7 Project OPTIMISC. Frontiers in Plant Science, 7(1620). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01620>

Li W, Yue C, Ciais P, Chang J, Goll D, Zhu D, Peng S, Jornet-Puig A (2018) ORCHIDEE-MICT-BIOENERgY : an attempt to represent the production of lignocellulosic crops for bioenergy in a global vegetation model. Geoscientific Model Development, 11, 2249-2272. <https://doi.org/10.5194/gmd-11-2249-2018>

Linde-Laursen IB (1993) Cytogenetic analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. *Hereditas*, 119 : 297-300

Loughin TM (2006), Improved Experimental Design and Analysis for Long-Term Experiments. *Crop Sci.*, 46: 2492-2502. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.04.0271>

M

Maddison AL, Camargo-Rodriguez A, Scott IM, Jones CM, Elias DMO, Hawkins S, Massey A, Clifton-Brown J, McNamara NP, Donnison IS, Purdy SJ (2017) Predicting future biomass yield in *Miscanthus* using the carbohydrate metabolic profile as a biomarker. *GCB Bioenergy*, 9 :1264-1278. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12418>

Masclaux-Daubresse C, Daniele-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105, 1141-1157

Masclaux-Daubresse C, Purdy S, Lemaitre T, Pourtau N, Taconnat L, Renou JP, Wingler A (2007) Genetic Variation Suggests Interaction between Cold Acclimation and Metabolic Regulation of Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 143 :434-446. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091355>

Masclaux C, Valadier MH, Brugière N, Morot-Gaudry JF, Hirel B (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, 211(4):510-8. <https://doi.org/10.1007/s004250000310>

Maslova S.P, Tabalenkova G.N, Golovko T.K (2010) Respiration and Nitrogen and Carbohydrate Contents in Perennial Rhizome-Forming Plants as Related to Realization of Different Adaptive Strategie. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(5), 631-640

Masuzawa T, Hogetsu K. (1977) Seasonal Changes in the Amount of Carbohydrate and Crude Protein in the Rhizome of *Miscanthus sacchariflorus*. *The Botanical Magazine Tokyo*, 90, 181-191

McCalmont JP, Hastings A, McNamara NP, Richter GM, Robson P, Donnison IS, Clifton-Brown J (2017) Environmental costs and benefits of growing *Miscanthus* for bioenergy in the UK. *Glob Change Biol Bioenergy*, 9(3): 489-507. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12294>

Mekete T, Reynolds K, Lopez-Nicora HD, Gray ME, Niblack TL (2010) Plant-Parasitic Nematodes Are Potential Pathogens of *Miscanthus x giganteus* and *Panicum virgatum* Used for Biofuels. *Plant disease*, 95(4): 413-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0335>.

Mesplede J, Saluzzo C (2004) 100 manipulations de chimie organique et inorganique. Editions Breal, 232.

Millard, P (1996) Ecophysiology of the Internal Cycling of Nitrogen for Tree Growth. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 159, 1-10

Millard P, Grelet G (2010) Nitrogen storage and remobilisation by trees : ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology*, 30 :1083-1095.

Mitros T, Session AM, James BT, Wu GA, Belaffif MB, Clark LV, Shu S, Dong H, Barling A, Holmes JR, Mattick JE, Bredeson JV, Liu S, Farrar K, Głowacka K, Jeżowski S, Barry K, Chae WB, Juvik JA, Gifford J, Oladeinde A, Yamada T, Grimwood J, Putnam NH, De Vega J, Barth S, Klaas M, Hodgkinson T, Li L, Jin X, Peng J, Yu CY, Heo K, Yoo JH, Ghimire BK, Donnison IS, Schmutz J, Hudson ME, Sacks EJ, Moose SP, Swaminathan K, Rokhsar DS (2020) Genome biology of the paleotetraploid perennial biomass crop *Miscanthus*. *Nature communications*, 11, 5442. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18923-6>

Monsi, M., Saeki, T., 1953. Über den lichtfaktor in den Pflanzengesellschaften und seine Bedeutung für die Stoffproduktion. *Japanese Journal of Botany* 14, 22–52.

Muggeo V (2008) Segmented: An R Package to Fit Regression Models With Broken-Line Relationships. *R News*, 8(1) : 20-25.

N

Naidu S, Al Shoabi A, Long SP (2001) Cold-tolerant C4 photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus*. *Science Access*, 3. <https://doi.org/10.1071/SA0403401>

Naidu SL, Long SP (2004) Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus* × *giganteus*: an in vivo analysis. *Planta*, 220: 145–155. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1322-6>

Nassi o Di Nasso N, Roncucci N, Triana F, Tozzini C, Bonari E (2011) Seasonal nutrient dynamics and biomass quality of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deuter) as energy crops. *Italian Journal of Agronomy*, 6(e24) :152-158. <https://doi.org/10.4081/ija.2011.e24>

Neukirchen D, Himken M, Lammel J, Czepionka-Krause U, Olf HW (1999) Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *European Journal of Agronomy*, 11 : 301-309. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(99\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(99)00031-3)

Nsanganwimana F, Waterlot C, Louvel B, Pourrut B, Douay F (2016), Metal, nutrient and biomass accumulation during the growing cycle of *Miscanthus* established on metal-contaminated soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 179: 257-269. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500163>

Nunn C, Hastings AFSJ, Kalinina O, Özgüven M, Schüle H, Tarakanov IG, Van Der Weijde T, Anisimov AA, Iqbal Y, Kiesel A, Khokhlov NF, McCalmont JP, Meyer H, Mos M, Schwarz K-U, Trindade LM, Lewandowski I, Clifton-Brown JC (2017) Environmental Influences on the Growing Season Duration and Ripening of Diverse *Miscanthus* Germplasm Grown in Six Countries. *Front. Plant Sci.* 8:907. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00907>

O

Ouattara MS, Laurent A, Barbu C, Berthou M, Borujerdi E, Butier A, Malvoisin P, Romelot D, Loyce C (2020) Effects of several establishment modes of *Miscanthus* × *giganteus* and *Miscanthus sinensis* on yields and yield trends. *GCB Bioenergy*, 12 :524-538. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12692>

Ourry A, Macduff JH, Volenec JJ, Gaudillere JP (2001) Nitrogen Traffic During Plant Growth and Development. In: Lea PJ, Morot-Gaudry JF (eds) *Plant Nitrogen*, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04064-5_10

P

Parrish AS, Lee MS, Voigt TB, Lee DK (2021) *Miscanthus* × *giganteus* Responses to Nitrogen Fertilization and Harvest Timing in Illinois, USA. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10244-w>

Pierce S, Negreiros D, Cerabolini BEL, Kattge J, Díaz S, Kleyer M, Shipley B, Wright SJ, Soudzilovskaia NA, Onipchenko VG, van Bodegom PM, Frenette-Dussault C, Weiher E, Pinho BX, Cornelissen JHC, Grime JP, Thompson K, Hunt R, Wilson PJ, Buffa G, Nyakunga OC, Reich PB, Caccianiga M, Mangili F, Ceriani RM, Luzzaro A, Brusa G, Siefert A, Barbosa NPU, Chapin FS III, Cornwell WK, Fang J, Fernandes GW, Garnier E, Le Stradic S, Peñuelas J, Melo FPL, Slaviero A, Tabarelli M, Tampucci D (2017) A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes world-wide. *Funct Ecol*, 31: 444-457. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12722>

Poeplau C, Don A (2014) Soil carbon changes under *Miscanthus* driven by C-4 accumulation and C-3 decomposition - toward a default sequestration function. *Global Change Biology Bioenergy* 6: 327-338. doi: 10.1111/gcbb.12043.

Purdy SJ, Cunniff J, Maddison AL, Jones LE, Barraclough T, Castle M, Davey C.L, Jones C.M, Shield I, Gallagher J, Donnison I, Clifton-Brown J (2015a) Seasonal Carbohydrate Dynamics and Climatic Regulation of Senescence in the Perennial Grass, *Miscanthus*. *Bioenergy Research*, 8: 28-41. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9500-2>

Purdy SJ, Maddison AL, Cunniff J, Donnison I, Clifton-Brown J (2015b) Non-structural carbohydrates profiles and ratios between soluble sugars and starch serve as indicators of productivity for a bioenergy grass. *AoB PLANTS*, 7 :1-12. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv032>

Q

Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.*, 5(7):278-82. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01655-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01655-1).

R

Reimley MA (2010) REMOBILISATION OF LEAF NITROGEN IN STOCKPILED TALL FESCUE. Thèse soutenue à l'Université du Missouri – Columbia

RMT Biomasse (2012) Fiche culture : l'implantation du miscanthus. 10 pages, www.rmtbiomasse.org

Robson P, Mos M, Clifton-Brown J, Donnison I (2012) Phenotypic variation in senescence in *Miscanthus* : Towards Optimising Biomass Quality and Quantity. *Bioenergy Research*, 5 : 95-105. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9118-6>

Robson PRH, Farrar K, Gay AP, Jensen EF, Clifton-Brown JC, Donnison IS (2013) Variation in canopy duration in the perennial biofuel crop *Miscanthus* reveals complex associations with yield. *Journal of Experimental Botany*, 64 (8): 2373-2383. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert104>

Roncucci N, Nassi O Di Nasso N, Tozzini C, Bonari E, Ragolini G (2015) *Miscanthus* × *giganteus* nutrient concentrations and uptakes in autumn and winter harvests as influenced by soil texture, irrigation and nitrogen fertilisation in the Mediterranean. *GCB Bioenergy*, 7:1009-1018. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12209>

Rosnitschek-Schimmel I (1982) Biomass and Nitrogen Partitioning in a Perennial and an Annual Nitrophilic Species of *Urtica*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 109(3) :215-225. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(83\)80223-2](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(83)80223-2).

Ruf T, Schmidt A, Delfosse P, Emmerling C (2017) Harvest date of *Miscanthus* × *giganteus* affects nutrient cycling, biomass development and soil quality. *Biomass and Bioenergy*, 100:62-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.03.010>

S

Sacks EJ, Jakob K, Gutterson I (2013) High biomass miscanthus varieties. US patent 2013/011 1619 A1

Sanchez EE, Righetti TL, Sugar D, Lombard PB (1991) Recycling of nitrogen in field-grown 'Cornice' pears. *Journal of Horticultural Science*, 66(4) : 479-486. <https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516177>

Sarath, G., Baird, L.M., Mitchell, R.B. (2014) Senescence, dormancy and tillering in perennial C4 grasses. *Plant science*, 217-218, 140-151

Scagline-Mellor S, Griggs T, Skousen J, Wolfrum E, Holaskova I (2018) Switchgrass and Giant *Miscanthus* Biomass and Theoretical Ethanol Production from Reclaimed Mine Lands. *Bioenerg. Res*, 11 : 562–573. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9915-2>

Scauflaire J, Gourgue M, Foucart G, Renard F, Vandeputte F, Munaut F (2013) *Fusarium miscanthi* and other *Fusarium* species as causal agents of *Miscanthus* × *giganteus* rhizome rot. *European Journal of Plant Pathology*, 137 : 1-3. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0220-9>

Schulze E.D, Beck E, Buchmann N, Clemens S, Müller-Hohenstein K, Scherer-Lorenzen M. (2019) *Plant Ecology*, 2nd edition. Ed. Springer, 428-442

Schwartz C, Amasino R (2013) Nitrogen recycling and flowering time in perennial bioenergy crops. *Frontiers in Plant Science*, 4(76). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00076>

Segura V, Cilas C, Costes E (2008) Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: mixed linear modelling of repeated spatial and temporal measures. *New Phytologist*, 178: 302-314. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02374.x>

Semere T, Slater FM (2007) Invertebrate populations in miscanthus (*Miscanthus x giganteus*) and reed canary-grass (*Phalaris arundinacea*) fields. *Biomass & Bioenergy*, 31 : 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.07.002>

Shoji S, Kurebayashi T, Yamada I (1990) Growth and chemical composition of Japanese pampas grass (*Miscanthus sinensis*) with special reference to the formation of dark-colored andisols in northeastern Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36(1): 105-120. <https://doi.org/10.1080/00380768.1990.10415715>

Smeets EMW, Lewandowski IM, Faaij APC (2009) The economical and environmental performance of miscanthus and switchgrass production and supply chains in a European setting. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6–7) :1230-1245. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.09.006>.

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 30, 1126-1149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01708.x>

Spencer JL, Raghu S (2009) Refuge or reservoir? The potential impacts of the biofuel crop *Miscanthus x giganteus* on a major pest of maize. *PLoS One*, 16;4(12):e8336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008336>.

Stephenson TD, Carvalho HDR, Castillo MS, Crozier CR, Smyth TJ, Heitman JL (2021) Water use and biomass yield of bioenergy crops in the north carolina piedmont. *Agronomy Journal*. <https://doi.org/10.1002.agj2.20646>

Stewart JR, Toma Y, Fernandez FG, Nishiwakis A, Yamada T, Bollero G (2009) The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan : a review. *GCB Bioenergy*, 1 :126-153. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x>

Strullu L (2011) Nitrogen fluxes in a perennial energetic crop, *Miscanthus × giganteus* : experimental study and modelling elements. Thèse soutenue à AgroParisTech le 06 janvier 2011.

Strullu L, Cadoux S, Preudhomme M, Jeuffroy M.H, Beaudoin N (2011) Biomass production and nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus × giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research*, 121 :381-391. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.01.005>

Strullu L, Cadoux S, Beaudoin N, Jeuffroy M.H (2013) Influence of belowground nitrogen stocks on light interception and conversion of *Miscanthus × giganteus*. *European Journal of Agronomy*, 47 :1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2013.01.003>

Strullu L, Beaudoin N, Louarn G, Mary B (2020) The genesis of STICS v10. Conference in XIIth Stics user seminar, Montpellier, 6 au 7 juin 2020

Sun Q, Lin Q, Yi ZL, Yang ZR, Zhou FS (2010) A taxonomic revision of *Miscanthus* s.l. (*Poaceae*) from China. Botanical Journal of the Linnean Society, 164(2): 178–220. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01082.x>

T

Tayot X, Chartier M, Varlet-Grancher C, Lemaire G (1994) Potential above-ground dry matter production of *Miscanthus* in north-centre France compared to sweet *Sorghum*. In : Biomass for energy, environment, agriculture and industry – Proceedings of the 8th European Biomass Conference, Vienna, Austria. Ed. by Chartier P, Beenackers AACM, Grassi G : 556-564.

Tejera M, Boersma N, Vanlooche A, Archontoulis S, Dixon P, Miguez F, Heaton E (2019) Multi-year and Multi-site Establishment of the Perennial Biomass Crop *Miscanthus* × *giganteus* Using a Staggered Start Design to Elucidate N Response. BioEnergy Research, 12:471-483.

Tejera MD, Miguez FE, Heaton EA (2021) The older plant gets the sun: Age-related changes in *Miscanthus* × *giganteus* phenology. GCB Bioenergy, 13 :4-20. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12745>

Thomas HL, Arnoult S, Brancourt-Hulmel M, Carrère H (2019) Methane Production Variability According to *Miscanthus* Genotype and Alkaline Pretreatments at High Solid Content. BioEnergy Research, 12(2):325-337. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9957-5>

Thomas H, Ougham H (2015) Chapter 10 - Senescence and crop performance. In : Crop Physiology (Second Edition). Ed. Sadras VO, Calderini DF. P. 223-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417104-6.00010-8>

Thomas H, Smart CM (1993) Crops that stay green. Ann. Appl. Biol., 123 :193-219. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348>

Thomas H, Stoddart JL (1980) Leaf Senescence. Annual Review of Plant Physiology 1980 31:1, 83-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.31.060180.000503>

Tubeileh A, Rennie TJ, Goss MJ (2016) A review on biomass production from C4 grasses: yield and quality for end-use. Current Opinion in Plant Biology, 31 :172-180. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.05.001>

V

Valbiom (2009) Les utilisations du miscanthus

Van der Werf HMG, Meijer WJM, Mathijssen EWJM, Darwinkel A (1993) Potential dry matter production of *Miscanthus sinensis* in The Netherlands. Industrial Crops and Products, 1 :203-210. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(92\)90020-V](https://doi.org/10.1016/0926-6690(92)90020-V)

VanLoocke A, Twine TE, Zeri M, Bernacchi CJ (2012) A regional comparison of water use efficiency for miscanthus, switchgrass and maize. Agricultural and Forest Meteorology, 164 : 82-95. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2012.05.016>.

Vargas LA, Andersen MN, Jensen CR, Jørgensen U (2002) Estimation of leaf area index, light interception and biomass accumulation of *Miscanthus sinensis* ‘Goliath’ from radiation measurements. *Biomass and Bioenergy*, 22 :1-14. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(01\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(01)00058-7)

Ververis C, Georghiou K, Christodoukalis N, Santas P, Santas R (2004) Fiber dimensions, lignin and cellulose content of various plant materials and their suitability for paper production. *Industrial crops and products*, 19 : 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.10.006>

Von Cossel M, Winkler B, Mangold A, Lask J, Wagner M, Lewandowski I, Elbersen B, van Eupen M, Mantel S, Kiesel A (2020) Bridging the gap between biofuels and biodiversity through monetizing environmental services of *Miscanthus* cultivation. *Earth's Future*, 8, e2020EF001478. <https://doi.org/10.1029/2020EF001478>

W

Wang D, Portis AR, Moose SP, Long S.P (2008) Cool C4 Photosynthesis : Pyruvate Pi Dikinase Expression and Activity Corresponds to the Exceptional Cold Tolerance of Carbon Assimilation in *Miscanthus x giganteus*. *Plant Physiology*, 148, 557-567. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120709>

Wayman S, Bowden R.D., Mitchell RB (2014) Seasonal Changes in Shoot and Root Nitrogen Distribution in Switchgrass (*Panicum virgatum*). *Bioenerg. Res.*, 7 : 243–252. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9365-9>

Weger J, Knápek J, Bubeník J, Vávrová K, Stražil Z (2021) Can *Miscanthus* Fulfill Its Expectations as an Energy Biomass Source in the Current Conditions of the Czech Republic?—Potentials and Barriers. *Agriculture*, 11, 40. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010040>

Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen Rg, Müller T (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1) : 30-48. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010>

Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J Exp Bot.*,57(2):391-9. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri279>.

Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*, 60(4) : 1063–1066. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp067>

Witzel C-P, Finger R (2016) Economic evaluation of *Miscanthus* production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53 :681-696. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.063>

Wyka TP, Oleksyn J (2014) Photosynthetic ecophysiology of evergreen leaves in the woody angiosperms – a review. *Dendrobiology*, 72 :3-27. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.072.001>

X

Xue S, Kalinina O, Lewandowski I (2015) Present and future options for *Miscanthus* propagation and establishment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 49 :1233-1246. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.168>

Xue S, Lewandowski I, Kalinina O (2017) *Miscanthus* establishment and management on permanent grassland in southwest Germany. *Industrial Crops and Products*, 108 :572-582. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.024>.

Y

Yamori W, Hikosaka K, Way DA (2014) Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res*, 119 : 101–117. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6>

Yang J, Worley E, Wang M, Lahner B, Salt DE, Saha M, Udvardi M (2009) Natural Variation for Nutrient Use and Remobilisation Efficiencies in Switchgrass. *Bioenerg. Res.*, 2 : 257–266. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9055-9>

Yu L, Ding G, uai Z, Zhao H (2013) Natural variation of biomass yield and nutrient dynamics in *Miscanthus*. *Field Crops Research*, 151 :1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.07.001>

Z

Zapater M, Catterou M, Mary B, Ollier M, Fingar L, Mignot E, Ferchaud F, Strullu L, Dubois F, Brancourt-Hulmel M (2017) A single and robust critical nitrogen dilution curve for *Miscanthus* × *giganteus* and *Miscanthus sinensis*. *Bioenergy Research*, 10(1):115-128. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9781-8>

Zgorelec Z, Bilandzija N, Knez K, Galic M, Zuzul S (2020) Cadmium and Mercury phytostabilization from soil using *Miscanthus* × *giganteus*. *Sci Rep*, 10, 6685. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63488-5>

Zhao A, Gao L, Chen B, Feng L (2019) Phytoremediation potential of *Miscanthus sinensis* for mercury-polluted sites and its impacts on soil microbial community. *Environ Sci Pollut Res*, 26: 34818–34829. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06563-3>

Zub HW, Brancourt-Hulmel M (2010) Agronomic and physiological performances of different species of *Miscanthus*, a major energy crop. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 201–214. <https://doi.org/10.1051/agro/2009034>

Zub HW, Arnoult S, Younous J, Lejeune-Hénaut I, Brancourt-Hulmel M (2012) The frost tolerance of *Miscanthus* at the juvenile stage: Differences between clones are influenced by leaf-stage and acclimation. *European Journal of Agronomy*, 36(1): 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.08.001>.

Title: Temporal ecophysiological study of carbon and nitrogen reserve management in three miscanthus genotypes

Keywords: *Miscanthus x giganteus*, *Miscanthus sinensis*, recycling, senescence, functional type, lignocellulosic biomass

Abstract:

Lignocellulosic biomass from *Miscanthus x giganteus* ($M \times g$) is an ecological alternative to the use of fossil resources. Thanks to nutrient recycling mechanism, $M \times g$ presents low nitrogen fertilization requirements, which limits its environmental impacts. Nowadays, only one clone of $M \times g$ is mainly cultivated in France. *Miscanthus sinensis* ($Msin$) presents a high intra-specific variability in terms of biomass quality and stress tolerance. This species is interesting to expand varietal offer only if its environmental impacts are as low as $M \times g$. But its functioning and nutrients management have not yet been really investigated. The aim of this thesis is to characterize carbon and nitrogen reserves management of $Msin$ in comparison with $M \times g$, in relation to plant development and biomass production. This thesis constitutes, to our knowledge, the first temporal characterization of the development, biomass production and reserves management of two miscanthus species simultaneously.

Plant development monitoring and whole plant sampling were carried out in field every ten days during the growing season for two years on $Msin$ Goliath, $Msin$ Malepartus and $M \times g$. To our knowledge, such an experimental work, which combines carbon and nitrogen management in 3 genotypes, with such a fine time resolution has never been done before.

Nitrogen functioning was characterized by endogenous and exogenous fluxes. The management of carbon and nitrogen reserves was studied through the analysis of starch, sucrose and nitrogen concentrations in the rhizome, which was separated into functional compartments according to their source or sink relation, and in the stembases. Carbon and nitrogen storage and their remobilization dynamics in the rhizome were studied together, while the storage roles of functional compartments were determined. Finally, multivariate statistical analyses were carried out to highlight functional types.

$M \times g$ remained an ideotype for biomass production due to its high yield ($22 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ in February vs 10 to $14 \text{ t ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$ for $Msin$) combined with an efficient nitrogen recycling, including a high spring remobilization efficiency with 59% of the rhizome nitrogen which were remobilized. It was characterized by a high RUE (2.58 g MJ^{-1} vs 1.21 to 1.60 g MJ^{-1} for $Msin$), a higher non-structural carbohydrates reserve content (99 mg g^{-1} vs 47 to 57 mg g^{-1} for $Msin$), which was mainly composed by starch (70%). $Msin$ Malepartus presented a lower biomass production and an earlier flowering of one to two months, but remained interesting regarding its autumnal nitrogen remobilization efficiency (74 to 75% of the above-ground parts nitrogen were remobilized) but uptook a significant part of exogenous nitrogen (81% of the total nitrogen of the plant came from exogenous nitrogen). Finally, $Msin$ Goliath presented a good production potential but appeared less efficient to limit environmental impacts because its nitrogen recycling seemed less efficient: 57 to 63% of the above-ground parts nitrogen were remobilized in autumn and 10 to 24% of the above-ground parts nitrogen were stored in rhizome during winter. It has a high proportion of sucrose (41 to 54%). Although no direct link could be established, the *stay-green* character of $Msin$ could be at the origin of the differences in reserve management compared to $M \times g$. Variables related to reserve management were proposed to the breeders: high RUE, late panicle emergence date and high spring nitrogen remobilization efficiency were related with high yields. Early active senescence and low shoots number, combined with a high proportion of starch in the carbon reserves would be related to low above-ground parts nitrogen concentration in late winter.

In conclusion, $Msin$ is a promising species to expand varietal offer, with contrasted carbon and nitrogen reserves management as well as contrasted development. However, these results have to be expanded with several genotypes as well as various soil and climatic conditions.

Titre : Etude écophysiological temporelle de la gestion des réserves carbonées et azotées par trois génotypes de miscanthus

Mots-clés : *Miscanthus* × *giganteus*, *Miscanthus sinensis*, recyclage, type de fonctionnement, sénescence, biomasse lignocellulosique

Résumé :

La biomasse lignocellulosique issue de *Miscanthus* × *giganteus* (*M*×*g*) constitue une alternative écologique à l'utilisation des ressources fossiles. Son recyclage des nutriments lui permet de présenter de faibles besoins en fertilisation azotée, limitant les impacts environnementaux. Aujourd'hui, un seul clone de *M*×*g* est majoritairement cultivé en France. *Miscanthus sinensis* (*Msin*) présente une forte variabilité intra-spécifique (qualité de biomasse, tolérance aux stress). Il est intéressant pour élargir l'offre variétale s'il présente aussi peu d'impacts environnementaux que *M*×*g*. Mais son fonctionnement et sa gestion des nutriments ont été peu étudiés. L'objectif de la thèse est de caractériser la gestion des réserves carbonées et azotées de *Msin* par rapport à *M*×*g*, en lien avec le développement de la plante et la production de biomasse. Cette thèse constitue, à notre connaissance, la première caractérisation temporelle aussi fine du développement, de la production de biomasse et de la gestion des réserves de deux espèces de miscanthus en simultané.

Le fonctionnement azoté a été caractérisé par des flux endogènes et exogènes d'azote. L'étude de la gestion des réserves carbonées et azotées a été réalisée grâce à l'analyse des concentrations en amidon, en saccharose et en azote dans le rhizome, séparé en compartiments fonctionnels selon leurs rôles source ou puits, et dans les bas de tiges. Les dynamiques de stockage et de remobilisation du carbone et de l'azote dans le rhizome ont été mises en parallèle, et les rôles de stockage des compartiments fonctionnels ont été déterminés. Finalement, des analyses statistiques multivariées ont permis de définir des types de fonctionnement.

M×*g* reste un idéotype pour la production de biomasse grâce à son rendement important (22 t ha⁻¹ an⁻¹ en février vs 10 à 14 t ha⁻¹ an⁻¹ en pour les *Msin*) couplé à un recyclage de l'azote efficient, notamment une forte efficacité de remobilisation printanière avec 59% de l'azote du rhizome remobilisés. Il présente aussi une RUE importante (2,58 g MJ⁻¹ vs 1,21 à 1,60 g MJ⁻¹ pour les *Msin*), une plus forte teneur en glucides de réserve (99 mg g⁻¹ vs 47 à 57 mg g⁻¹ pour les *Msin*) composés majoritairement d'amidon (70%). *Msin* Malepartus, présente une production de biomasse inférieure et une floraison plus précoce d'un à deux mois, mais reste intéressant grâce à son efficacité de remobilisation automnale de l'azote (74 à 75% de l'azote des parties aériennes sont remobilisés) mais utilise une part importante d'azote exogène (81% de l'azote total de la plante est issu de l'absorption d'azote exogène). Finalement, *Msin* Goliath, présente un bon potentiel de production mais apparaît moins adapté pour limiter les impacts environnementaux car son recyclage de l'azote semble moins efficient : 57 à 63% de l'azote des parties aériennes sont remobilisés à l'automne et 10 à 24% de l'azote des parties aériennes sont stockés dans le rhizome durant l'hiver. Il présente une forte proportion de saccharose dans ses réserves carbonées (41 à 54%). Même si aucun lien direct n'a pu être établi, le caractère *stay-green* des *Msin* pourrait être à l'origine des différences de gestion des réserves par rapport à *M*×*g*. Des variables en lien avec la gestion des réserves sont proposées aux sélectionneurs : une forte RUE, une date de sortie de panicule tardive et une forte efficacité de remobilisation printanière de l'azote indiquent des rendements importants. Une sénescence active précoce et un faible nombre de tiges, associés à une forte proportion d'amidon dans les réserves carbonées seraient liés à une faible teneur en azote dans les parties aériennes à la fin de l'hiver.

En conclusion, *Msin* est une espèce prometteuse pour élargir l'offre variétale, mais les génotypes montrent des différences concernant leur gestion des réserves carbonées et azotées et leur développement. Il est cependant nécessaire de compléter cette étude sur plusieurs génotypes dans des conditions pédoclimatiques variées.