



HAL
open science

Importance des litières de *Miscanthusxgiganteus* (feuilles sénescents, racines et rhizomes): Impact de leur décomposition sur la minéralisation de C et N dans un sol

Norbert N. Amougou

► **To cite this version:**

Norbert N. Amougou. Importance des litières de *Miscanthusxgiganteus* (feuilles sénescents, racines et rhizomes): Impact de leur décomposition sur la minéralisation de C et N dans un sol. Ingénierie des aliments. Université de Reims Champagne Ardenne, 2011. Français. NNT : . tel-02804963

HAL Id: tel-02804963

<https://hal.inrae.fr/tel-02804963>

Submitted on 6 Jun 2020

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.



UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité Agronomie

**Importance des litières de *Miscanthus*×*giganteus*
(feuilles sénescentes, racines et rhizomes) :**
Impact de leur décomposition sur la minéralisation de C et N
dans un sol

par

Norbert AMOUGOU

Soutenue le 18 mars 2011

Jury :

Caroline REMOND , Professeur, Université Reims Champagne-Ardenne	Présidente
Jean-Louis MOREL , Professeur INPL/ENSAIA, Nancy	Rapporteur
Benoît GABRIELLE , Professeur AgroParisTech, PARIS	Rapporteur
Goetz RICHTER , Directeur de Recherche BBSRC, Rothamsted (UK)	Examineur
Sylvie RECOUS , Directrice de Recherche INRA, Reims	Directrice de thèse
Isabelle BERTRAND , Chargée de Recherche INRA, Reims	Co-directrice de thèse

Laboratoire d'accueil : UMR 614 INRA-URCA Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims



UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité Agronomie

**Importance des litières de *Miscanthus* × *giganteus*
(feuilles sénescentes, racines et rhizomes) :**
Impact de leur décomposition sur la minéralisation de C et N
dans un sol

par

Norbert AMOUGOU

Soutenue le 18 mars 2011

Jury :

Caroline REMOND , Professeur, Université Reims Champagne-Ardenne	Présidente
Jean-Louis MOREL , Professeur INPL/ENSAIA, Nancy	Rapporteur
Benoît GABRIELLE , Professeur AgroParisTech, PARIS	Rapporteur
Goetz RICHTER , Directeur de Recherche BBSRC, Rothamsted (UK)	Examineur
Sylvie RECOUS , Directrice de Recherche INRA, Reims	Directrice de thèse
Isabelle BERTRAND , Chargée de Recherche INRA, Reims	Co-directrice de thèse

Laboratoire d'accueil : UMR 614 INRA-URCA Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims

A Mathilde, Marie

A Michel.

Remerciements

Je dois au département Environnement et Agronomie de l'INRA et à la Région Champagne Ardenne d'avoir eu une excellente bourse de thèse qui m'a permis de réaliser ce travail.

Je souhaite également remercier les membres du jury : Benoît Gabrielle et Jean-Louis Morel qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Enfin, Goetz Richter et Caroline Rémond, qui dans leurs domaines de compétences respectifs, ont porté un regard extérieur sur ce travail.

De Sylvie Recous, ma directrice de thèse, j'ai appris ce qu'est la bienveillance, l'inébranlable constance dans le travail et la passion de la science. Tu m'as donné le spectacle éclatant d'un maître qui regarde comme la moindre de ses qualités de savoir transmettre la science à autrui, avec une rare expérience et tout en courant. J'exprime ici pour toi un grand merci pour m'avoir fait confiance et encadré sur ce projet au cours de ces trois années.

De Isabelle Bertrand, ma co-encadrante, j'ai appris le dynamisme, l'application perpétuelle à la rigueur scientifique, à faire beaucoup par moi-même. C'est toi encore qui m'as appris l'art de savoir se réformer, sans en être diminué, et sans y paraître insensible. Pour tout cela je te suis très reconnaissant.

Je remercie chaleureusement toutes les petites mains de l'équipe qui ont permis de mener à bien les plans d'expériences originaux de cette thèse à la fois sur le terrain et en laboratoire : Francis Millon mon double, Gonzague Alavoine, Sylvie Millon, Olivier Delfosse et Pascal Thiébeau. Encore un grand merci.

A Agnès Guzzi, Delphine Le Pierres, Frederic Dorémus merci pour votre amitié et toute l'aide apportée au cours de ces trois années sur le plan administratif.

Je remercie toutes les personnes extérieures au laboratoire ayant été impliquées dans ce travail. Tout d'abord, les membres de mon comité de pilotage : Alain Brauman, Delphine Derrien et Jean-Marie Machet, j'ai appris de vous à prendre du recul face à mon travail, j'ai aussi eu beaucoup de plaisir dans les discussions. Enfin, la collaboration avec l'équipe Agro Impact (PEL, MISCAZOTE, MISQUAL) : Matthieu Prudhomme, Stéphane Cadoux et Loïc Strullu, je vous remercie chaleureusement pour l'obtention du matériel végétal.

Je pense également à mon unique stagiaire Gaël Jaumotte, merci pour tes travaux effectués dans le cadre de ma thèse. Je tiens aussi à remercier particulièrement les autres thésards Bilal Amin et Akhtar Iqbal pour leur amitié indéfectible, et surtout pour tous ces moments inoubliables passés ensemble (je sors mon mouchoir). Darryl Moorhead, merci pour ton soutien, tes conseils, tes encouragements et surtout ton champagne pendant la dernière ligne droite de ma thèse.

Enfin, je dois à Mathilde ma femme, le soutien sans faille, son amour inépuisable sans lesquels, il m'aurait été impossible de mener à bien ce travail. Je dédie aussi cette thèse à Marie ma mère, pour la vie qu'elle m'a donné, ces "questions quotidiennes" et ses encouragements sur mon travail. Je dédie enfin ce travail à Michel Lahalle le parrain des parrains, merci pour tes discussions philosophiques.

« Je n'ai pas joué mes cinq actes ! je n'en ai joué que trois. - Tu les as bien joués ; et dans la vie, parfois, la pièce est complète avec trois actes seulement » Marc Aurèle

Sommaire

Chapitre 1

Introduction générale.....	
Contexte : enjeux liés à l'utilisation des bioénergies	1

Etude bibliographique

1. Rôle de la matière organique dans les sols.....	4
1.1. Minéralisation et assimilation du C organique.....	6
1.2. Minéralisation et organisation de l'azote organique	7
1.3. Stabilisation du C et N organique sous forme humique.....	9
2. Gestion des résidus végétaux : conséquences agronomiques et environnementale	11
2.1. Restitution au sol des résidus de culture	13
2.2. Exportation des résidus de culture	15
3. Conséquences de la culture des plantes pérennes pour la production de bioénergies sur la qualité des sols	16
3.1. Miscanthus plante à rhizomes	17
3.2. Usage pour la production d'énergie	20
3.3. Impacts environnementaux associés à la culture de Miscanthus.....	23
4. Problématique et questions scientifiques de la thèse	25
4.1. Objectifs scientifiques	26
4.2. Hypothèses de recherche	27
4.3. Démarche d'étude	28
5. Plan de la thèse	29

Chapitre 2

Influence de la date de récolte et de la fertilisation azotée sur la qualité et la décomposition dans le sol des rhizomes, racines et feuilles sénescents de *Miscanthus giganteus*.

Abstract	31
Introduction	32
Materials and methods	35
Results	41
Discussion	50
Conclusion.....	55

Chapitre 3

Chute et décomposition des feuilles de *Miscanthus giganteus* et leur accumulation au sol : conséquences sur les dynamiques du C et N

Introduction	57
Matériels et méthodes.....	59
Résultats	70
Discussion	80
Conclusion.....	86

Chapitre 4

Impact de la richesse en azote sur la dynamique microbienne hétérotrophe au cours de la décomposition de feuilles de miscanthus dans un sol

Introduction	88
Matériels et méthodes.....	91
Résultats	98
Discussion	113

Chapitre 5

Discussion générale.....	121
5.1. Intérêts et limites de la démarche adoptée	122
5.2. Résultats asquis	129
5.2. Perspectives	137
5.2. Conclusion.....	141
Bibliographie.....	143
Annexes	174

CHAPITRE 1

Introduction générale

Etude bibliographique

Contexte : enjeux liés à l'utilisation des bioénergies

Actuellement, la consommation mondiale annuelle en énergie primaire (charbon, pétrole brut, gaz naturel, uranium, etc.) avoisine les 500×10^{18} j, et 86 % de cette énergie est d'origine fossile, ce qui se traduit par une émission nette annuelle de 8.5×10^9 t carbone (C) sous forme de CO₂ dans l'atmosphère (Marland et al. 2009). L'élévation de la température moyenne du globe de 1°C observée depuis 1850 (GIEC, 2007) est très probablement due à la hausse de concentration dans l'atmosphère des gaz à effet de serre (GES) d'origine anthropique, dont fait partie le CO₂. La nécessité de maîtriser les émissions de ces GES et la raréfaction et la hausse du prix des carburants fossiles suscitent actuellement un intérêt croissant pour les énergies issues des ressources végétales ou bioénergies, comme alternative aux énergies fossiles.

A ce propos, la dernière décennie a connu une augmentation spectaculaire de la production de bioénergies, en particulier des biocarburants de première génération ou carburants liquides issus de la transformation des graines ou réserves de plantes comme le maïs, la canne à sucre, etc. (Gregg et Smith, 2010). La commission Européenne s'est par exemple fixé un objectif de remplacement des carburants pétroliers par ces biocarburants à hauteur de 10 % en 2010. Fernandes et al. (2007) montrent que la production mondiale en biocarburants a augmenté de 70 % entre 1950 et 2000, alors que Gregg et Smith (2010) montrent qu'entre 1997 et 2007 la production de biocarburant à base de maïs a augmenté d'un facteur 5 aux USA et d'un facteur 10 en Europe.

Cette croissance rapide des carburants dits de première génération suscite aujourd'hui des interrogations, en raison des conséquences négatives possibles de leur production. La faible disponibilité des terres et des ressources végétales à l'échelle mondiale peut en effet créer une

pression économique capable de perturber l'équilibre entre les différentes utilisations possibles des ressources végétales, telles que l'alimentation humaine et animale, l'industrie de la fibre, la production de biocarburants, etc. (Walter et al. 2008). Raneses et al. (1998) ont par exemple montré que les prix des ressources alimentaires humaine et animale à l'échelle mondiale ont augmenté de 2 à 12% du fait de la demande en biocarburants de première génération. En outre, la contribution de ces carburants à la réduction nette des gaz à effet de serre est actuellement remise en question. En effet, des fortes émissions de GES ont été observées suite à la déforestation et à la conversion des zones naturelles telles les tourbes, les prairies, etc. dans l'objectif de produire ces biocarburants de première génération (Dornburg et al. 2010). Enfin, l'expansion des cultures à vocation énergétique sur les terres agricoles peut entraîner des modifications de pratiques culturales (sur fertilisation, non pratiques de jachères, etc.) conduisant à un appauvrissement des sols, à l'augmentation des pollutions atmosphérique et celles des nappes d'eau phréatiques (Berndes et al. 2002 ; Hill et al. 2006). Face à ces interrogations, comment l'agriculture peut-elle alors contribuer à la fourniture du C et ce de manière durable, pour couvrir les besoins en énergies sans perturber les équilibres naturels ni empiéter sur les autres utilisations des ressources végétales (alimentation, fibres, etc.)?

Promouvoir l'utilisation des résidus agricoles ou forestiers et le développement des cultures non alimentaires à caractère pérenne ou plantes 'dédiées' semble être une alternative pour diminuer la pression sur les surfaces agricoles et les ressources végétales (Hoogwijk et al. 2003). Les résidus végétaux des grandes cultures (pailles, tiges, etc.) et les plantes pérennes contiennent majoritairement de la ligno-cellulose, assemblage complexe de lignine, de cellulose et d'hémicellulose que l'on peut valoriser en carburants liquides ou gazeux dits biocarburants de seconde génération. L'avantage des résidus végétaux réside dans le fait qu'ils sont conjointement produits avec la ressource alimentaire ou fibreuse sur une même

unité de surface de terre ; le caractère pérenne des plantes dédiées, leur forte production de biomasse sèche et leur capacité à être cultivées sur des terres non agricoles dites marginales (terres polluées, anciennes friches industrielles, etc.) font d'elles des candidates idéales pour maximiser la production de biomasse ligno-cellulosique.

Cette alternative met la biomasse ligno-cellulosique au cœur des questions actuelles de recherche et de développements technologiques et soulève d'autres questions :

- Quel sera l'impact de l'exportation des résidus végétaux sur la qualité et la productivité des sols ? Lorsqu'ils ne sont pas exportés, ces résidus retournent en effet au sol où ils contribuent au maintien de la fertilité et de la structure des sols. Les conséquences environnementales notamment à long terme de leur exportation doivent donc être renseignées.
- Quelles stratégies adopter (choix d'espèces de plantes, pratiques culturales,...) pour maximiser la production de biomasse ligno-cellulosique par unité de sol tout en minimisant les impacts environnementaux associés et tout en prenant en compte les contraintes technologiques associées à la transformation de cette biomasse ?

L'étude bibliographique qui suit apporte des éclairages pour tenter de répondre à ces 2 questions.

1. Rôle de la matière organique dans les sols

La matière organique est majoritairement constituée d'oxygène, d'hydrogène, de carbone d'azote, de phosphore et de soufre. La matière organique des sols est issue des organismes vivants comme les plantes, les animaux et les microorganismes. On distingue dans le sol, la matière organique dite « endogène » de la matière organique dite « exogène ».

La matière organique « endogène » du sol est constituée d'une fraction non vivante encore appelée « humus » qui est considérée comme stable soit parce qu'elle forme avec les éléments minéraux des associations qui la protègent de la dégradation microbienne, soit parce qu'elle est, par nature, récalcitrante à la dégradation par les micro-organismes; l'autre fraction, vivante, est constituée des organismes vivants du sol, et notamment de la biomasse microbienne qui représente 2 à 3 % du carbone total du sol.

La matière organique entrant dans les sols dite « fraîche » ou « exogène » résulte soit des cycles naturels des plantes (résidus sénescents qui tombent à la surface du sol et parties souterraines issues des cultures récoltées), soit des pratiques agricoles (résidus de récolte laissés au champ), soit d'une gestion anthropique des déchets (épandage des effluents et des boues, de composts, fumiers, etc.). Les résidus des grandes cultures (blé, maïs, coton, riz, etc.) estimés mondialement à $1549 \times 10^9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ constituent cependant l'essentiel des apports exogènes de matière organique (Kim et Dale 2004).

Ces apports exogènes de matière organique subissent sous l'action des organismes du sol des transformations physiques (fragmentation) et biochimiques (minéralisation et humification) dont l'aboutissement est la libération de molécules simples assimilables par la flore

microbienne du sol et par les plantes : c'est le processus de recyclage ou décomposition (Lal, 2008).

Le **recyclage** de la matière organique endogène ou exogène est contrôlé par de multiples facteurs, dépendant de la nature des matières organiques (facteurs intrinsèques) et des conditions de l'environnement (facteurs extrinsèques) qui agissent sur l'activité des organismes décomposeurs. Les principaux facteurs extrinsèques déterminant le recyclage des matières organiques dans les sols sont l'humidité, la température, le pH du sol, les conditions d'aération, la disponibilité en nutriments (Parr et Papendick, 1978 ; Swift et al. 1979).

Les caractéristiques intrinsèques de la matière organique exogène sont un des principaux facteurs qui influencent largement leur décomposition dans les sols (Heal et al. 1997). Ces caractéristiques propres ont été désignées sous le terme de « qualité » par Swift et al. (1979), terme qui est utilisé depuis dans les travaux relatifs à cette problématique (Cadish et Giller, 1997). Les plantes sont constituées de différents organes (feuilles, tiges, racines, rhizomes). Chacun de ces organes est formé d'un ensemble de tissus qui lui est propre. Chaque tissu est composé de cellules ayant une composition chimique spécifique (Wilson et Hatfield, 1997). Les cellules végétales possèdent une fraction soluble (acides organiques et composés peptidiques) et une fraction insoluble correspondant essentiellement à la paroi cellulaire et constituée majoritairement de polysaccharides et de lignine. La proportion relative entre ces deux fractions varie en fonction du type cellulaire et de sa maturité.

Il a aussi été montré que la disponibilité en azote (azote organique des résidus, azote organique et minéral du sol) pouvait modifier significativement la cinétique de décomposition des matières organiques, l'accélérer ou au contraire la ralentir selon le pas de temps considéré, et notamment modifier le taux d'humification (Hadas et al. 2004 ; Keeler et al, 2009). Quand la disponibilité en azote est faible par rapport aux besoins potentiels en N des microorganismes, ce qui est le cas dans la majorité des données publiées, la teneur en azote

des résidus est alors souvent le principal facteur de prédiction des cinétiques de décomposition (Tian et al. 1992 ; 1995). Dans ces conditions, l'influence de la qualité chimique des résidus sur la minéralisation du carbone ne peut pas être distinguée de celle de la disponibilité en azote au cours de la décomposition (Henriksen and Breland, 1999 ; Recous et al. 1995).

La dynamique du recyclage de la matière organique entrant dans les sols détermine à court terme les flux de carbone et de nutriments dans le sol (disponibilité de l'azote par exemple) et dans l'atmosphère (émissions de CO₂ et de N₂O par exemple). A plus long terme, ce processus détermine la nature et la quantité de matière organique dans les sols et les impacts environnementaux associés : stockage de carbone, fertilité physique et chimique des sols.

1.1. Minéralisation et assimilation du C organique

La dégradation par voie microbienne (enzymatique) fait intervenir plusieurs processus dans les sols en conditions aérobies (figure 1) : les bactéries, les actinomycètes et les champignons grâce à leurs enzymes extracellulaires transforment les hydrates de C (cellulose et hémicellulose) en sucres simples facilement utilisables comme source de C et d'énergie par l'ensemble de la microflore. Une fois dans la cellule microbienne, le carbone du substrat peut alors être :

- oxydé en CO₂ dans les chaînes métaboliques (glycolyse, voies des pentoses phosphate, cycle de Krebs) avec formation de molécules énergétiques comme l'ATP : c'est la **minéralisation** ou,
- utilisé pour la croissance des microorganismes et la biosynthèse de leurs organites cellulaires comme les membranes, les mitochondries, etc. : c'est l'**assimilation**.

Le rendement d'assimilation exprime la partition entre la minéralisation et l'assimilation du carbone pour une population microbienne. Des calculs thermodynamiques de l'énergie nécessaire à la cellule (provenant de la minéralisation du carbone) pour réaliser les biosynthèses (assimilation) montrent que le rendement d'assimilation ne peut pas dépasser 62 % (Payne, 1970). Cependant, les études sur ce sujet ne sont pas nombreuses en raison de la difficulté à mesurer le rendement d'assimilation. La valeur de 62 % est donc admise par la communauté scientifique mais n'est pas forcément exact.

1.2. Minéralisation et organisation de l'azote organique

Les biotransformations de l'azote organique du sol sont liées à celles du carbone organique au cours de la biodégradation, ces 2 éléments sont assimilés en même temps par les microorganismes afin d'assurer leurs besoins de maintenance (renouvellement des structures cellulaires) et de croissance des microorganismes.

Quatre processus majeurs interviennent au cours des biotransformations de l'azote organique dans le sol:

- La minéralisation de l'azote correspond à la transformation par la microflore hétérotrophe de la matière organique endogène du sol ou exogène (résidus de récolte, amendements organiques...) ; l'étape ultime conduit à la formation d'ammonium (NH_4^+). C'est le processus d'**ammonification**. Il est appelé aussi minéralisation « brute ».
- L'**organisation** (ou organisation brute) est le processus inverse au cours duquel l'azote minéral, ammoniacal ou nitrique, est assimilé par les microorganismes et transformé en azote organique. A la mort des microorganismes, l'azote organique 'microbien' est soit minéralisé sous forme ammoniacale (**re-minéralisation**) soit

incorporé dans des formes d'azote organique plus difficilement dégradables (**humification**).

- La minéralisation nette de l'azote résulte de l'intensité des deux processus de minéralisation brute et d'organisation brute. En présence de résidus végétaux dans le sol, la quantité d'azote contenue dans les résidus organiques (souvent traduit par leur rapport C/N) influence fortement ce bilan : la décomposition des résidus à faible C/N (riche en azote) induit une minéralisation nette d'azote alors que la décomposition des résidus à C/N élevé (pauvre en azote) nécessite de prélever l'azote nécessaire au fonctionnement microbien, dans le compartiment minéral du sol, et provoque donc généralement une organisation nette d'azote.
- La nitrification est l'oxydation biologique de l'azote ammoniacal (NH_4^+) en azote nitrique (NO_3^-). Elle s'effectue en deux étapes successives : la nitritation ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$) puis la nitratisation ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) dues à l'activité de bactéries autotrophes du genre *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'ammonium et des nitrites tout en utilisant le CO_2 comme source de carbone.
- La dénitrification correspond à la conversion de l'azote nitrique en azote gazeux (N_2 , N_2O). Elle n'est possible qu'en présence d'une source de pouvoir réducteur (matière organique par exemple) et en anaérobiose, car le nitrate est alors utilisé à la place de l'oxygène pour la respiration des bactéries. L'intensité de la dénitrification dépend dès lors du degré d'anaérobiose, lié au régime hydrique du sol, à la disponibilité des matières organiques assimilables, de la concentration en nitrate et de la température qui régulent l'intensité des réactions de la dénitrification (Cellier et al, 1997).

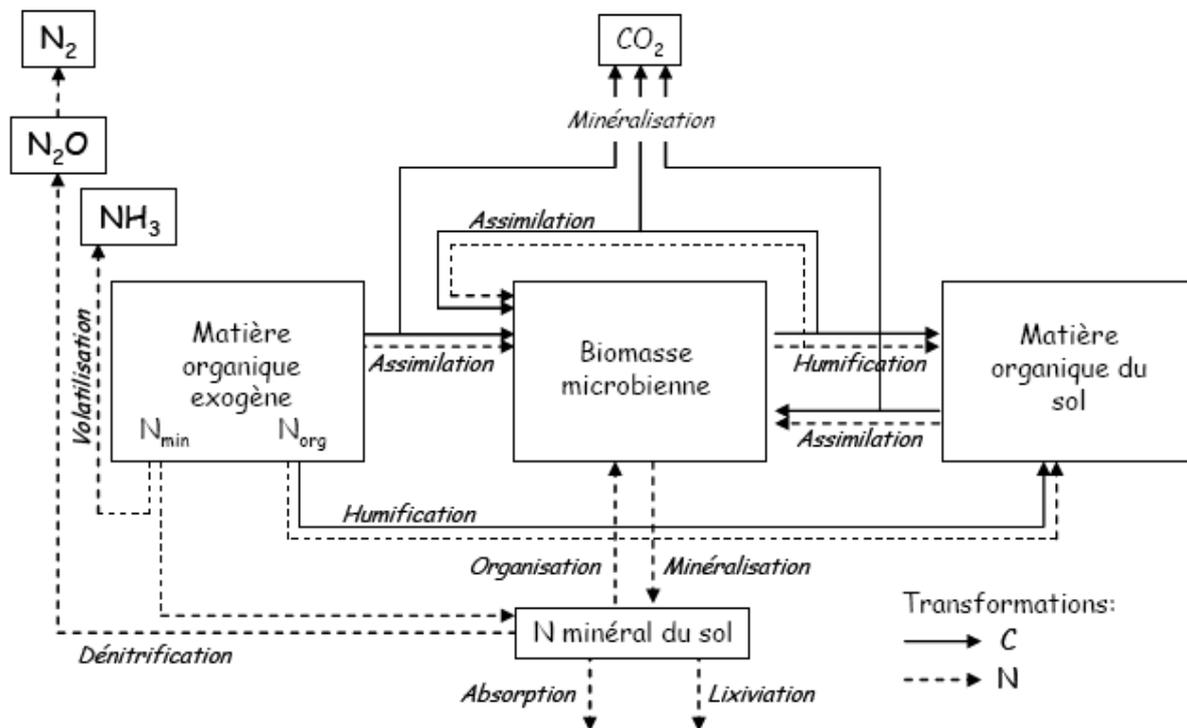


Figure 1: Représentation schématique des cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles en conditions aérobies. (source: G Machinet)

1.3. Stabilisation du C et N organique sous forme humique

L'évolution des résidus végétaux dans le sol est fonction de leur composition chimique (teneurs en C soluble, hémicellulose, cellulose et lignine). Les fractions solubles (acides organiques et composés peptidiques) et polysaccharidiques facilement métabolisables (Abiven et al. 2007 ; Trinsoutrot et al. 2000) contribuent très peu au C stabilisé du sol. On retrouve environ 20 % de ces fractions dans les corps microbiens qui à leur mort s'associent à des ions métalliques ou à des supports minéraux (argile, calcium) et acquièrent une stabilité dans le sol (Bonneau et al. 1994). Cependant, certaines études montrent de façon paradoxale que ces fractions facilement biodégradables représentent encore une proportion non négligeable (10 à 30%) de la matière organique des sols (Dungait et al. 2009 ; Gleixner et al. 1999). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce fait : une protection

physique de l'action des décomposeurs par agrégation avec des particules de sol (Christensen, 2001 ; Matos et al. 2010 ; Sculze et al. 2009) ou par adsorption sur des surfaces minérales (Atanassova et Teoharov, 2010 ; Gosh et al. 2009), une condensation chimique au sein des molécules humiques difficilement biodégradables (Gillespie et al. 2009 ; Jokic et al. 2004) ou un recyclage actif des matières organiques anciennes par les communautés microbiennes des sols (Epron et al. 2009 ; Poirier et al. 2002).

Des études anciennes de minéralisation de lignine marquée au ^{14}C ont par exemple montré qu'au bout de 2 ans de décomposition, le C issu de la lignine n'était pas incorporé dans la biomasse microbienne (Kassim et al. 1981) et ces auteurs concluent que la lignine contribue majoritairement à la fraction stable de MO du sol. Cependant, des travaux récents ont montré que des macromolécules complexes telles que les lignines avaient un taux de renouvellement supérieur à celui de la matière organique totale du sol, et que les lignines n'étaient que partiellement stabilisées dans le sol (Dignac et al. 2005). D'autres études ont montré que la stabilisation à long terme de la matière organique du sol était principalement contrôlée par l'existence de mécanismes de protection exercée par la matrice et des minéraux du sol, et non par la structure chimique de cette matière organique (Schöning et Kögel-Knabner, 2006). De plus, Fontaine et al. (2007) ont montré que les associations organo-minérales des couches profondes du sol (60-80 cm) n'expliquent pas à elles seules les différences de temps de résidence moyen du C organique entre les couches superficielles (0-20 cm) et profondes du sol. Cette étude suggère que l'absence de matière organique fraîche est la raison de la stabilisation de la matière organique dans les couches profondes du sol. Cette hypothèse a été expliquée par le phénomène du 'priming effect' où l'apport de matière organique fraîche provoque une accélération de la minéralisation de la matière organique stable du sol (Kuzyakov et al. 2000 ; 2010). Cependant, le phénomène du 'priming effect' est souvent négligeable et selon Fontaine et al (2003), la stimulation de la biodégradation par l'apport de

matière organique, dépendrait de la compétition pour l'acquisition de ressources entre les microorganismes qui décomposent la matière organique humifiée et les microorganismes qui décomposent la matière organique fraîche.

2. Gestion des résidus végétaux : Conséquences agronomiques et environnementales

Les résidus végétaux peuvent être d'origine agricole ou forestière. Les résidus agricoles proviennent des grandes cultures (blé, maïs, coton, riz, etc.) ou alors sont des coproduits des transformations de ces cultures (comme par exemple la bagasse de la canne à sucre). Kim et Dale (2004) évaluent à 1549×10^9 kg MS an⁻¹ les résidus agricoles mondiaux, et estiment que cette quantité représente un potentiel de 442×10^9 l an⁻¹ de bioéthanol. L'Asie, par sa fourniture en résidus de riz, reste le premier fournisseur en quantité de ressource disponible (tableau 1).

a	Afrique	Asie	Europe	Amérique			Océanie	Total
				Nord	Centrale	Sud		
Biomasse (10^9 kg ha ⁻¹ an ⁻¹) lignocellulosique								
Canne de maïs	0	34	29	134	0	7	0	204
Paille d'orge	0	2	44	10	0	0	2	58
Paille d'avoine	0	0	7	3	0	0	0	11
Paille de riz	21	668	4	11	3	24	2	731
Paille de blé	5	145	133	50	3	10	9	354
Paille de sorgho	0	0	0	7	1	2	0	10
Bagasse	12	75	0	5	19	64	6	181
Total	38	924	217	219	26	106	20	1549

Tableau 1 : Stocks mondiaux de résidus agricoles.

Les résidus végétaux provenant d'éclaircies de forêt et des scieries de bois sont aussi considérés comme matière première pour la production de bioéthanol puisqu'ils sont majoritairement composés de ligno-cellulose. En effet, les hémicelluloses sont constituées

d'une chaîne principale constituée d'unités β -D-xylopyranose ou xylose et liées en β (1 \rightarrow 4). La chaîne principale est substituée par un certain nombre de chaînes latérales constituées par les unités arabinose, galactose, acide glucuronique, rhamnose et des groupements acétylés (appeldoorn et al. 2010). Le processus de saccharification consiste à transformer par voie chimique ou biologique (enzymatique) les hémicelluloses en monomères fermentescibles utilisés pour la production de bioéthanol. Taherzadeh (1999) a estimé le rendement théorique de transformation de ces résidus forestiers en éthanol à 0.32 g d'éthanol g⁻¹ de bois en considérant que toute l'hémicellulose était transformée en sucre (tableau 2).

Sur la base de ces estimations Prasad et al (2007) ont calculé que la production potentielle de bioéthanol à partir de ces résidus végétaux peut remplacer 32 % des carburants fossiles. Cependant, les conséquences de la gestion (restitution ou exportation) de ces résidus végétaux sur la qualité des sols doivent être renseignées (Cowie et Gardner, 2007).

(g / 100 g MS)	Xyl	Ara	Man	Gal	Rham	A.uronique	C.acétylés	Total	Références
Forêts									
Pin	8.0	3.0	10.0	3.0	0.0	4.5	2.0	30.5	3
Bouleau	22.0	0.4	2.0	1.0	0.6	5.0	4.0	35.0	11
Eucalyptus	16.5	1.0	1.5	1.5	0.6	2.0	3.5	26.6	6;9
Peuplier	19.5	1.2	3.5	1.1	0.0	4.9	2.0	32.2	13
Saule	14.5	2.1	2.5	2.0	0.0	0.0	0.0	21.1	10;11
Agricoles									
Paille d'orge	15.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.0	8
Canne de maïs	20.0	3.0	0.3	1.5	0.0	0.0	2.0	26.8	7;12;14
Paille de riz	19.0	3.5	1.8	0.4	0.0	0.0	0.0	24.7	2;7
Bagasse	23.0	3.3	0.6	1.6	0.0	0.0	0.0	28.5	1;4
Paille de blé	20.0	3.0	0.4	2.0	0.0	0.0	0.0	25.4	5;7

1.Aguilar et al. 2002 ; 2.Allen et al. 2001 ; 3.Ballesteros et al. 2000 ; 4.Dekker et Wallis 1983 ; 5.Grohmann et al. 1985 ; 6.Kabbel et al. 2002 ; 7.Lee 1997 ; 8.Magee et Kosaric 1985 ; 9.Pereira 1990 ; 10.Sassner et al. 2004 ; 11.Taherzadeh et al. 1997 ; 12.Toget et al. 1990 ; 13.Torget et Hsu 1994 ; 14. Torget et al. 2000

Tableau 2 : Composition en monomères de sucres (en g / 100 g MS) des principaux résidus végétaux d'origine forestière et agricole (xylose, arabinose, mannose, galactose, rhamnose, acide uronique et groupements acétylés)

2.1. Restitution au sol des résidus de culture

La mise en œuvre de pratiques favorisant la restitution des résidus de cultures a des conséquences positives dans les agro-écosystèmes. En effet, les pratiques culturales favorisant la couverture permanente du sol par les résidus végétaux s'accompagnent aussi d'une augmentation du C organique de ces sols, ce qui améliore les propriétés physique et chimique des sols nécessaire au maintien de la fertilité des sols (Prechtel et al. 2009 ; Zinn et al. 2005).

Les restitutions de résidus végétaux améliorent la résistance des sols vis-à-vis de l'érosion de deux manières en augmentant la stabilité des agrégats et en protégeant la surface du sol, dans le cas de la restitution sous forme de mulch à la surface du sol. En effet, l'énergie des gouttes de pluie tombant sur un sol nu entraîne la destruction des agrégats du sol (Hobbs et al. 2008).

Les résidus de culture à la surface du sol intercepte donc cette énergie et protège la surface du sol contre toute destruction d'agrégats, ce qui réduit la perte du sol par érosion (Madari et al. 2005 ; Wilson et al. 2008). Des exemples concrets de cette protection ont été mis en évidence au Paraguay sur des parcelles cultivées situées en pente où des pertes de 47 t ha⁻¹ de sol de surface ont été enregistrées après une forte pluie pour des sols nus contre 0.1 t ha⁻¹ pour des sols couverts avec les résidus végétaux (Derpsch et Moriya, 1999).

Les résidus de culture laissés à la surface du sol protègent aussi le sol contre l'érosion par le vent (Chen et al. 2010 ; Maurer et al. 2009). Une couverture du sol par les résidus de culture limite aussi la perte en eau causée par évapotranspiration et évite des changements brusques des températures des couches superficielles du sol. Ces conditions stimulent l'activité biologique du sol et favorisent ainsi la minéralisation de l'azote par exemple au niveau des couches superficielles du sol au moment de la phase de germination des cultures (Stone et al. 2010 ; Verkler et al. 2008).

La restitution des résidus de culture à la surface du sol contribuent aussi à l'accumulation de la matière organique au niveau des horizons de surface (Blanco-Canqui et Lal, 2009 ; Rabary et al. 2008 ; Qin et al. 2010). Considérant que le C organique du sol est un indicateur de la fertilité du sol, Lal (2005) a calculé qu'une augmentation de $1 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ peut augmenter de 32 millions t an^{-1} les rendements des cultures céréalières dans les pays développés. Sur la même hypothèse Adiku et al. (2009) concluent dans leurs travaux que l'établissement des cultures favorisant une couverture permanente du sol permet des augmentations de C du sol comprises entre 0.1 et $5.3 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$. A contrario, Carter et al. (1993) ont montré des pertes respectives de C et N de l'ordre de 14 et 10 % au bout de 10 ans d'une pratique favorisant l'exportation systématique des résidus de culture.

Les êtres vivants du sol assurent un certain nombre de fonctions bénéfiques (création d'une porosité de l'écoulement de l'eau par les vers de terre, fixation d'azote par les bactéries rhizobia, etc.). Les organismes vivant du sol étant hétérotrophes pour la plupart, dépendent des résidus de cultures restitués comme source d'énergie. L'augmentation de la biodiversité des organismes du sol est un critère de qualité qui garanti la stabilité des écosystèmes suite aux perturbations (Altieri, 1999). La taille des populations vivantes, y compris la biomasse microbienne augmente avec la teneur en C organique des sols (Bhogal et al. 2009 ; Haynes, 2008). Les pratiques qui permettent une augmentation des teneurs en C s'accompagnent souvent d'une augmentation des populations de vers de terre (Pelosi et al. 2009 ; Smukler et al. 2010) et de la microfaune (protozoaires, nématodes, acariens, insectes) (Postma-Blaauw et al. 2010). En ce qui concerne les microorganismes, la diversité phénotypique est plus grande dans les sols riches en matières organiques (Alvear et al. 2005 ; Rutigliano et al. 2009 ; Wallis et al. 2010) ; la diversité génotypique également (Pastorelli et al. 2009).

Balota et al. (2004) ont montré au Brésil qu'après 20 années de restitution de résidus au sol, la biomasse microbienne avait augmenté de 83% sur une épaisseur de 0-50 cm comparé au

scénario de non restitution. Rodan et al. (2003) montrent qu'après 5 ans de couverture au sol, les quantités d'enzymes ont augmenté et concluent que la restitution des résidus au sol est une pratique durable.

2.2 Exportation des résidus de culture

Pour toutes les raisons concernant les effets bénéfiques de la restitution des résidus de culture au sol évoquées précédemment, Lal (2009) conseille de ne pas utiliser les résidus de culture à des fins énergétiques même si des études montrent qu'une quantité de résidus peut être exportée sans compromettre la qualité des sols concernés (Perlack et al. 2005 ; ONIG, 2007). Il est cependant difficile d'évaluer la quantité de résidus exportable parce que cette quantité dépend des rendements de cultures (Nelson, 2002) qui eux même dépendent du type de sol (Hhadi et Mary, 2007), du climat, de la situation géographique des parcelles (en pente ou non) et enfin des pratiques culturales utilisées (fertilisation, rotation des cultures, etc.) (Gabrielle et Gagnaire, 2008 ; Kim et Dale, 2004).

La plupart des travaux examinant la contribution des résidus de culture à la fourniture énergétique assument qu'une exportation moyenne de 25 % de résidus de culture n'est pas préjudiciable à la qualité des sols (Ericsson et Nilsson, 2006 ; Hoogwijk et al. 2003). Cependant, certaines études réalisées en France ont montré que l'on pouvait exporter davantage de résidus de cultures. L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et ARVALIS ont en effet montré que l'exportation de 33 % de résidus de cultures diminuait seulement de 2.5 % la teneur en C initial des sols après 50 années de cette pratique (Protin, 2007). En outre, Saffih-Hdadi et Mary (2008) ont simulé après 50 années d'exportation de paille de blé, une diminution du C initial du sol comprise entre 2.5 et 10.9 %, elle-même dépendante du site d'étude (sol, climat, cultures) et des pools de C initiaux des sols concernés.

Sur la base de ces résultats, les prédictions d'exportation des résidus dans les 6 grandes zones de productions céréalières en France ont été chiffrées à 38.8 % (Gagnaire et al. 2006). Même si les pertes en C du sol sont minimales, l'exportation des quantités considérables de résidus de culture s'accompagne aussi des pratiques comme la surfertilisation azotée qui augmente les émissions de N₂O et/ou la contamination des nappes d'eau par le nitrate.

Afin d'exercer une pression moins forte sur la fertilité physique et chimique des sols à travers l'exportation des résidus de culture, d'autres sources de matières premières peuvent être utilisées en complément d'une exportation partielle des résidus de culture pour la production de biocarburants de deuxième génération : ce sont les plantes pérennes. Il convient pour ces cultures d'estimer aussi les conséquences sur le plan environnemental (fertilité du sol, émissions de GES, etc.) de la production de ces cultures pour différents usages technologiques.

3. Conséquences de la culture de plantes pérennes pour la production de bioénergies sur la qualité des sols

Comparées aux cultures annuelles qui sont fortement dépendantes des apports azotés, les plantes pérennes produisent rapidement des quantités considérables de biomasse lignocellulosique avec environ 20 à 50 % d'intrants azotés en moins (Karp et Shield, 2008). En outre, ces plantes sont non alimentaires, leur développement évite donc des compétitions avec les autres débouchés de l'agriculture (alimentation, fibre, etc.) surtout quand ils sont cultivés sur des terres marginales. Enfin, l'absence de labour des sols concernés permet de favoriser le stockage du C dans les sols, les cultures étant installées pour plusieurs années (Lal et al. 2009).

Plusieurs plantes pérennes sont actuellement étudiées en Europe et aux USA pour leur production de biomasse ligno-cellulosique, et l'espèce *Miscanthus* en fait partie.

3.1 *Miscanthus*, plante à rhizomes

Il existe différentes espèces de *Miscanthus* mais le genre le plus étudié est *Miscanthus*×*giganteus* (Heaton et al. 2008). Originnaire de l'Est de l'Asie et introduite en Europe en 1935, *Miscanthus giganteus* (appelé par la suite *Miscanthus*) appartient à la famille des Poacées (graminées). C'est un hybride interspécifique stérile triploïde ($n = 57$) issu du croisement naturel entre le genre *sinensis* diploïde ($n = 36$) et le genre *sacchariflorus* tétraploïde ($n = 76$) (Greff et Deuter, 1993).

Concernant l'implantation de *Miscanthus*, elle est réalisée à partir des rhizomes sous tous types de sol, avec une préférence pour les sols profonds riches en humus et dotés d'une bonne réserve en eau (Lewandowski et al. 2003). Le labour du sol est recommandé avant de planter les rhizomes avec une densité (entre 15000 et 20000 rhizomes ha^{-1}) pour obtenir des rendements élevés (Danalatos et al. 2005) et limiter la concurrence avec les adventices ou mauvaises herbes. Cependant, le contrôle des mauvaises herbes la première année par l'utilisation d'herbicides est nécessaire pour assurer un bon établissement de la plante (Heaton et al. 2004). Le *Miscanthus* est une culture pérenne récoltée annuellement sur 15 à 20 ans. Sous climats tempérés, son cycle végétatif démarre au printemps (mars-avril) et atteint son maximum de végétation aérienne en sortie d'été avec des hauteurs de 2 à 3 mètres. A partir de cette période (automne), les feuilles en bas de tiges commencent à se dessécher et tombent au sol jusqu'en hiver (figure 2).

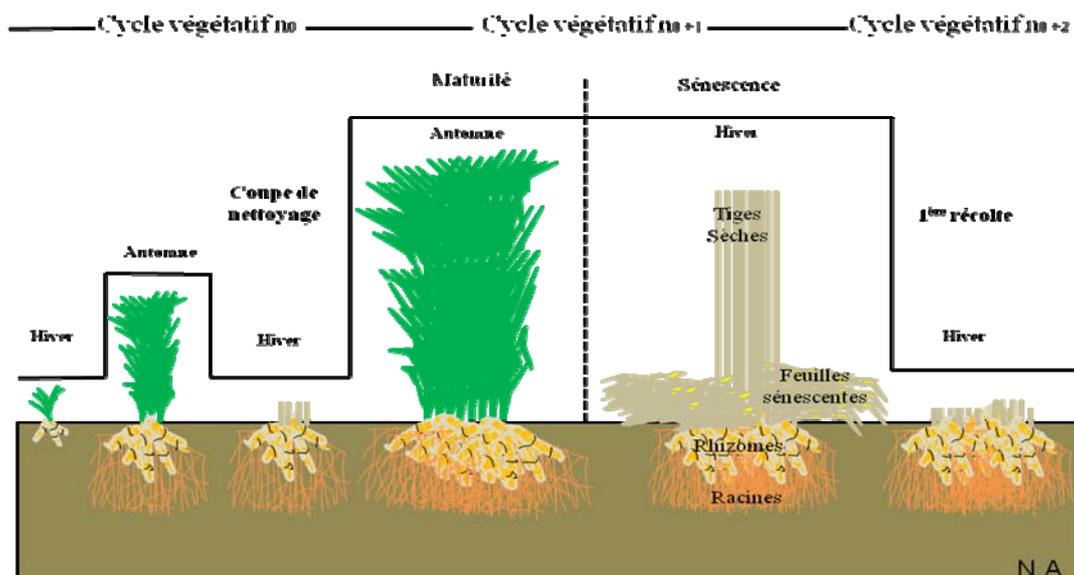


Figure 2 : Cycle de production de *Miscanthus x giganteus*. (Source : N Amougou)

Avant la sénescence et la chute des feuilles, les photo-assimilats sont remobilisés vers les rhizomes. L'intérêt principal de *Miscanthus* est sa forte production de biomasse végétale aérienne comparé autres graminées pérennes (Tableau 3).

		Métabolisme photosynthétique	Rdts t ha ⁻¹ an ⁻¹	Références
Meadow				
Foxtail	<i>Alopercurus pratensis L.</i>	C3	6-13	Mediavilla et al. 1997
Cocksfoot				
grass	<i>Dactylis glomerata L.</i>	C3	8-10	Scholz et al. 1998
Tall Fescue	<i>Festuca arundinacea S.</i>	C3	8-14	Wellie-Stephan, 1998
Raygras	<i>Lolium ssp.</i>	C3	9-12	Wellie-Stephan, 1998
Reed canary				
grass	<i>Phalaris arundinacea L.</i>	C3	7-13	Sankari et Mela, 1998 Lewandowski et al.
Miscanthus	<i>Miscanthus giganteus</i>	C4	20-44	2000
Switchgrass	<i>Panicum virgatum L.</i>	C4	5-23	Elbersen et al. 2001
Napier grass	<i>Pennisetum purpureum S.</i>	C4	27	Merlo et al. 1998
Energy cane	<i>Saccharum officinarum L.</i>	C4	27	Merlo et al. 1998
Salt Reedgrass	<i>Spartina cynosuroides L.</i>	C4	5-20	Poter et al. 1995 McLaughlin et al. 1997

Tableau 3 : Rendements (Matière sèche aérienne) des graminées pérennes actuellement étudiées en Europe et aux USA

Dans la littérature, le potentiel fort de production de biomasse de *Miscanthus* est attribué i) à son métabolisme de type C4 qui lui confère une grande capacité de fixation du CO₂ comparé aux graminées pérennes de types C3, et ii) à son système souterrain constitué majoritairement de rhizomes qui servent d'organe de stockage et de remobilisation des nutriments vers les autres organes durant tout son cycle de développement. En outre, des souches bactériennes fixatrices d'azote ont été isolées dans les rhizomes de *Miscanthus* (Davis et al. 2010). Ces auteurs concluent dans leurs travaux que l'association symbiotique entre rhizomes et bactéries fixatrices d'azote explique mieux le potentiel fort de production de biomasse et les faibles besoins en azote de *Miscanthus* comparé aux autres graminées pérennes de type C4. L'étude du fonctionnement du rhizome (physiologie, turn over, etc.) apparaît donc primordiale pour une meilleure gestion de la nutrition azotée de *Miscanthus*. Dans la littérature, il n'existe qu'une seule étude sur la physiologie des rhizomes (Christian et al. 2008) de *Miscanthus*, et pas de travaux associés au renouvellement ni au turnover de ces organes au cours du temps, il en est de même pour les autres plantes à rhizomes.

Le mot **rhizome** signifie étymologiquement 'touffe de racines' mais d'un point de vue anatomique, le rhizome est une tige souterraine qui porte des racines, des feuilles réduites à des écailles et des bourgeons qui produisent des nouveaux rhizomes et tiges aériennes (figure 3). Cet organe est décomposé en unités 'rhizomateuses' correspondant aux différentes années de croissance du rhizome. Il en résulte donc qu'un rhizome de *Miscanthus* est constitué d'éléments d'âge très variable (Christian et al. 2008). Trois états physiologiques des rhizomes de *Miscanthus* (plus de 5 ans) ont été mis en évidence au cours de son cycle de développement (Walsh et Jones, 2001). En début de printemps, période correspondant au développement des parties aériennes (tiges + feuilles) de *Miscanthus*, le rhizome alloue ses réserves pour la mise en place des parties aériennes. Après la mise en place des parties aériennes les nouveaux bourgeons apparaissent sur le rhizome et cette croissance dure

jusqu'au stade de floraison. Enfin, avant la sénescence de la plante, les assimilats d'origine aérienne sont remobilisés vers le rhizome.

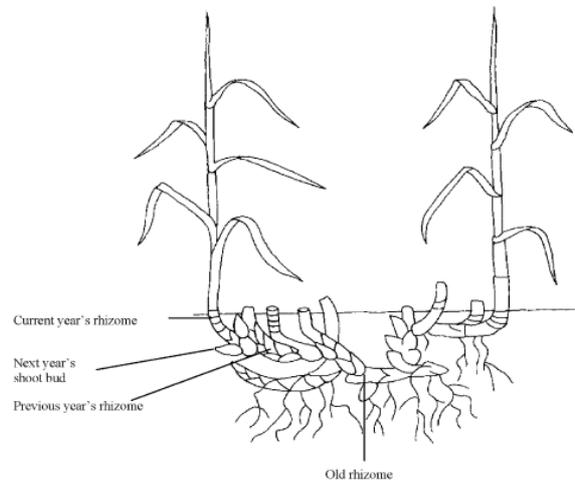


Figure 3. Anatomie d'un rhizome de Miscanthus (d'après Christian et al. 2008)

3.2. Usage pour la production d'énergie

La valorisation de la biomasse de Miscanthus intéresse principalement 3 grands secteurs : les biocombustibles, les biocarburants de seconde génération et les biomatériaux ou agromatériaux. Le stade végétatif de Miscanthus est le principal facteur affectant la quantité et la composition chimique (soluble / paroi) de sa biomasse et donc son utilisation. A ce propos 2 dates de récolte de la biomasse végétale de Miscanthus sont possibles en relation avec l'usage technologique souhaité :

- La récolte en vert (précoce) effectuée en début d'automne au stade de floraison de la plante permet la valorisation de la plante entière (figure 4) : à ce stade la biomasse végétale contient des tiges et des feuilles vertes, ce qui peut être un avantage pour la production des biocarburants, et un inconvénient pour le maintien de la fertilité des sols. En effet, en automne, la biomasse végétale de Miscanthus est non sénescente et donc contient une fraction soluble conséquente, cela peut augmenter les rendements de

saccharification de la biomasse pour la production de bioéthanol. Cependant, la récolte de la biomasse en automne entraîne aussi l'exportation des feuilles (C, N et autres éléments minéraux) et une partie de l'azote qui n'a pas encore été remobilisée vers les rhizomes, ce qui peut entraîner sur le long terme une baisse de la fertilité des sols concernés.



Figure 4 : Biomasse de Miscanthus au stade de floraison et à la sénescence. Source : N Amougou

- La récolte en sec (tardif) réalisée en hiver lors de la sénescence de la plante permet la valorisation des seules tiges, les feuilles étant déjà tombées au sol. Des travaux antérieurs ont montré que la biomasse végétale récoltée à la sénescence est un bon combustible (Burvall, 1997). En effet, à cette période, les teneurs en eau et en éléments minéraux contenues dans les tiges sont faibles, la translocation des nutriments vers les rhizomes ayant déjà eu lieu (Christian et al. 2006) (tableau 4).

Site d'étude	Période récolte	Cendres	N	Cl	K
		% masse sèche			
Suède	Octobre	3.87	0.50	0.44	0.95
	Février	1.94	0.39	0.12	0.29
Danemark	Octobre	3.61	0.64	0.51	0.11
	Février	1.66	0.46	0.09	0.28
Angleterre	Novembre	4.27	0.38	0.46	0.72
	Janvier	3.05	0.31	0.24	0.49
Allemagne	Novembre	3.4	0.44	0.15	0.95
	Février	2.3	0.36	0.07	0.61
Portugal	Octobre	4.87	0.57	0.48	0.80
	Janvier	3.52	0.36	0.19	0.34

Tableau 4 : Composition en cendres et minéraux de la biomasse aérienne de *Miscanthus* à la floraison et à la sénescence (Lewandowski et al. 2003).

Des études visant à produire du bioéthanol ou du biogaz à partir de la biomasse végétale de *Miscanthus* récoltée en hiver, ont montré des rendements de saccharification faibles comparés aux rendements à partir de plante entière prélevée en automne (El Bassam et al. 2002). Plus récemment, il a, par exemple été montré qu'on obtenait 35 % de rendement supplémentaire de saccharification à partir d'une biomasse récoltée en automne, après prétraitement de celle-ci à l'ammoniac, la saccharification des échantillons non prétraités restant faible et identique pour les 2 dates de récolte (Huyen et al. 2010a). En effet, à la sénescence, les tiges de *Miscanthus* sont majoritairement constituées de ligno-cellulose assemblage complexe de polysaccharides et de lignine qui rend difficile la conversion biologique (enzymatique) des polysaccharides en sucres fermentescibles. Cependant, cette nécessité du prétraitement est en contradiction avec les objectifs poursuivis en matière de bilan énergétique qui doit être positif avec les cultures énergétiques en comparaison avec l'énergie fossile (Tilman, 2006).

	Récolte	
	Précoce	Tardive
Sucres (% masse sèche)		
Arabinose	3.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Glucose	49.9 ± 1.2	54.8 ± 0.5
Xylose	21.9 ± 1.1	23.8 ± 0.1
Lignine de type Klason	17.6 ± 0.1	22.4 ± 0.1
Saccharification (% ms)		
cellulose	63.6 ± 3.8	41.3 ± 0.7
Arabinoxylane	69.9 ± 11.4	28.2 ± 0.3

Tableau 5 : Fractionnement enzymatique après prétraitement à l'ammoniaque de la biomasse aérienne de *Miscanthus* récoltée à l'automne (précoce) et à l'hiver (tardif) (Tran et al. 2010).

Même si les taux de saccharification sont faibles, les co-produits de la saccharification de *Miscanthus* peuvent potentiellement être valorisés dans les agro-matériaux, ce qui peut représenter un atout pour le développement de cette culture (Huyen et al. 2010b en cours).

3.3. Impacts environnementaux associés à la culture de *Miscanthus*

Le développement et l'utilisation des plantes à vocation énergétique comme *Miscanthus* pour la production d'énergie devraient conduire à un faible impact environnemental comparé à l'utilisation des énergies fossiles. Ce constat repose sur la faible émission des gaz à effet de serre et sur les augmentations des stocks de C organiques dans les sols associées à l'introduction de ces cultures pour la production des bioénergies (Heaton et al. 2008 ; Hillier et al. 2009 ; Lewandowski et Heinz, 2003 ; Woli et al. 2010).

Concernant l'impact de la fertilisation azotée de *Miscanthus* sur les GES, des études montrent des émissions faibles de N₂O dans les parcelles notamment en raison des besoins faibles en N de cette culture (Heaton et al. 2004 ; Davis et al. 2010), comparées à celles des grandes cultures annuelles comme le maïs (Styles et Jones 2007 ; St-Clair et al. 2008). D'autres

travaux (Christian et Riche, 1998 ; Johansson et Hoffman 1996) montrent que le lessivage de l'azote du sol vers les nappes d'eau et vers l'atmosphère est réduit en moyenne de 10 kg N ha⁻¹ an⁻¹ lorsque *Miscanthus* remplace une plante annuelle à vocation énergétique comme le maïs.

Concernant l'impact de *Miscanthus* sur les stocks de carbone, et leur importance sur la fertilité des sols, les résultats sont divergents dans la littérature. Les travaux de Dondini et al. (2009) en Irlande montrent qu'après 14 ans de présence de la culture du *Miscanthus* sur un sol, le C organique augmente de 25% par rapport au C d'une parcelle témoin resté sans *Miscanthus*. D'autres travaux réalisés au Danemark trouvent les mêmes résultats après 16 années d'installation du *Miscanthus* (Hansen et al. 2004). Cependant, Schneckenberger et Kuzyakov (2007) au Danemark, et Clifton-Brown et al. (2007) en Irlande, ne trouvent pas d'effet de la présence du *Miscanthus* sur les stocks de C du sol après respectivement 12 et 9 ans d'installation de la culture. Cette divergence de résultats montre surtout que les mécanismes conduisant au stockage du C sous culture de *Miscanthus* ne sont pas connus. En effet, les modalités de renouvellement et de turnover des parties souterraines de *Miscanthus* (rhizomes et racines) ne sont pas connues et c'est d'ailleurs le cas pour toutes les autres plantes à rhizomes. Il est pourtant crucial de pouvoir prédire le devenir du C organique des rhizomes et racines notamment lors de la destruction de la culture pour un changement d'usage des terres.

Les aspects liés à l'acceptation de *Miscanthus* dans la société sont actuellement considérés et étudiés. En effet, la pérennité du *Miscanthus*, son changement d'aspect lié à son cycle végétatif (stade de plantule, stade de floraison et sénescence) modifie considérablement le paysage et induit des modifications sur la biodiversité du territoire concerné (Karp et Shield, 2008). A ce propos, les résultats obtenus dans la littérature, montrent une opinion favorable à l'installation du *Miscanthus* et tiennent compte du type de terre utilisée pour conduire la

culture, de la taille des parcelles et des pratiques culturales utilisées (Abrahamson et al. 1998 ; Volk et al. 2004 ; Rowe et al. 2007).

4. Problématique et questions scientifiques de la thèse

Nous avons démontré par cette étude bibliographique que la biomasse ligno-cellulosique en raison de son caractère renouvelable, se présente comme une alternative au C fossile. *Miscanthus* × *giganteus*, plante pérenne à rhizome est actuellement étudiée en France pour la production des carburants de seconde génération, en raison de son potentiel de production forte de biomasse végétale. D'un point de vue industriel les recherches portent sur les verrous technologiques qui limitent la transformation biologique par voie enzymatique de la plante entière, pour la production de monomères fermentescibles (relation entre qualité chimique et organisationnelle de la biomasse en relation avec la nature des enzymes mises en œuvre), et la valorisation des co-produits (par exemple dans des matrices cimentaires). D'un point de vue environnemental, la conduite de la culture de *Miscanthus* est menée sous contrainte environnementale forte (exportation systématique et complète de biomasse végétale, réduction de la fertilisation azotée) pour obtenir un bilan énergétique favorable. En outre, les choix réalisés pour des usages technologiques (modalités d'exportation : récolte précoce, récolte tardive) posent la question du maintien de la fertilité chimique et physique des sols, et celle du maintien de pérennité de la culture. Afin d'évaluer les conséquences possibles de ces nouvelles pratiques culturales liées à l'introduction des plantes énergétiques dans les agrosystèmes, il est fondamental de pouvoir quantifier le recyclage des litières végétales telles les feuilles, racines et rhizomes pour *Miscanthus*. En outre, l'étude de la décomposition de ces litières dans les sols et leurs conséquences sur les cycles biogéochimiques des éléments C et

N permettront de comprendre le stockage de la MO des sols à long terme, nécessaire au maintien de la fertilité des sols.

4.1. Objectifs scientifiques

Les objectifs scientifiques de ce travail de recherche ont été les suivants :

- i) Quantifier, caractériser chimiquement et déterminer la biodégradabilité des litières aériennes (feuilles sénescents) et souterraines (rhizomes et racines) de *Miscanthus*. Dans la littérature, les données sont quasi-inexistantes sur ces litières, et elles sont nécessaires pour pouvoir estimer leur contribution aux bilans C et N des cultures de *Miscanthus*, notamment à la modélisation des cycles C et N.
- ii) Etudier spécifiquement la contribution des feuilles sénescents, au stockage du carbone dans les cultures de *Miscanthus*. Il s'agissait notamment d'étudier les processus conduisant à leur accumulation à la surface du sol, sous forme de mulch en conditions de plein champ. Contrairement aux racines et rhizomes (qui sont naturellement dans le sol), la chute des feuilles et leur devenir est liée aux stratégies d'exportation de la biomasse, notamment la date de récolte.
- iii) Comprendre le rôle de la disponibilité en azote sur les dynamiques microbiennes hétérotrophes et leur impact sur les cinétiques de minéralisation du C et de l'azote au cours de la décomposition. Dans le cas du *Miscanthus*, la décomposition des litières est généralement en condition de faible disponibilité en azote, parce que le *Miscanthus* n'a pas vocation à être cultivé avec une fertilisation azotée, ni sur des sols très fertiles, et parce que pour le cas particulier des feuilles, elles sont décomposées à la surface du sol. Nous avons choisi la feuille de *Miscanthus* comme modèle de litière pour cet objectif.

4.2. Hypothèses de recherche

Dans l'état de l'art nous avons vu que le stade végétatif de *Miscanthus* est le principal facteur qui définit l'usage technologique de sa biomasse végétale à travers sa quantité et sa composition chimique. La première hypothèse de ce travail de recherche est que les modalités d'exportation (récolte précoce (automne) *versus* récolte tardive (hiver)) modifient les quantités de biomasse retournant au sol, leur qualité chimique et en conséquence leurs cinétiques de minéralisation du C et N (émissions de GES, lessivage) et donc leur rétention dans le sol (stockage de C).

La deuxième hypothèse est que, les effets combinés d'une entrée annuelle considérable de feuilles (lorsque le *Miscanthus* réalise son cycle complet) et la faible dégradabilité de ces feuilles (observée dans le début de ce travail) entraînent une accumulation des feuilles à la surface du sol au champ (stockage de C).

Enfin, la troisième hypothèse, basée sur la bibliographie, est que la disponibilité en azote peut modifier significativement la cinétique de décomposition des matières organiques, l'accélérer ou au contraire la ralentir selon le pas de temps considéré, et notamment modifier le taux d'humification. Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier les effets de la disponibilité en azote sur la décomposition des feuilles dans le sol, en faisant l'hypothèse que la biomasse fongique et ses activités enzymatiques associées sont augmentées en conditions de faible disponibilité en azote.

4.3. Démarche d'étude

Le travail de recherche s'est appuyé sur le programme REGIX et le dispositif « Biomasse & Bioénergie » du site expérimental INRA d'Estrées-Mons¹, qui examine le critère de productivité de l'espèce *Miscanthus×giganteus* cultivée selon deux doses d'azote (0 et 120 kg ha⁻¹) et deux modalités de prélèvement de la biomasse végétale : avant remobilisation pour valorisation de la plante entière (Octobre), après remobilisation pour valorisation des seules tiges (Février).

Concernant la quantification des masses sèches, les parties aériennes et souterraines de la plante ont été prélevées sur deux années consécutives (2007-2008 et 2008-2009) à deux dates : une récolte précoce (octobre) et une récolte tardive (février). Cependant, en raison d'une forte variabilité spatiale de la production de biomasse de cette culture au champ, nous reconnaissons que le nombre de prélèvement destructif par date et par traitement n'était pas suffisant pour quantifier précisément la biomasse souterraine. Cependant une étude antérieure a adopté la même méthode pour quantifier la biomasse souterraine de *Miscanthus* (Beuch et al. 2000).

L'un des objectifs principal de notre travail était de décrire les caractéristiques chimiques des parties de la plante susceptibles d'être décomposées au champ : les feuilles sénescents pour les parties aériennes, et les rhizomes et racines pour les parties souterraines de *Miscanthus*. Le but étant d'évaluer l'impact de leurs caractéristiques chimiques sur la décomposition ultérieure de ces résidus dans le sol. Des méthodes connues de caractérisation chimique : teneurs en C et N total, analyse proximale de type « Van soest », lignine Klason et sucres neutres ont été utilisées. Nous avons obtenu ainsi un échantillonnage d'organes avec différentes teneurs en N et des caractéristiques biochimiques proches.

¹ « Picardie Plantes Ligno-cellulosiques »

Afin d'obtenir des cinétiques de minéralisation du C et N pour des fins ultérieures de modélisation, l'étude de la biodégradabilité de ces litières végétales (rhizome, racine, rhizome nécrosé et feuille sénescence) dans le sol a été engagée, par des expérimentations en conditions contrôlées (humidité -80 kPa, température 15°C) qui ont permis de quantifier à court terme (≤ 1 an) la minéralisation du C et N.

La décomposition au champ des feuilles a été suivie par la technique des « litterbags ». En parallèle les caractéristiques (quantité et composition) des feuilles s'accumulant au sol sous forme de mulch ont été déterminées au cours d'un cycle cultural de *Miscanthus*, afin de suivre les variations d'accumulation au cours du temps.

Enfin, la stratégie choisie pour faire varier la disponibilité relative de N et de C à décomposer pour les microorganismes, lors de l'étude de la décomposition potentielle des feuilles de *Miscanthus* au laboratoire, est originale. Elle a consisté à faire varier soit la quantité de N minéral par un ajout d'azote minéral dans le sol pour une quantité donnée de C apporté, soit la quantité de C apportée par les résidus dans le sol pour un niveau d'azote donné dans le sol.

5. Plan de la thèse

Ce manuscrit est organisé en cinq chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique. Les travaux expérimentaux sont présentés en trois chapitres sous la forme d'article scientifique ou projets d'article. L'un est déjà publié dans une revue internationale à comité de lecture (*Plant and Soil*), les deux autres sont en préparation. Les principaux résultats sont regroupés et commentés dans le chapitre 5 sous forme d'une discussion générale, incluant les perspectives possibles de ce travail. Enfin, l'ensemble des références bibliographiques utilisées dans les quatre chapitres et les annexes sont regroupés à la fin du manuscrit.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Chapitre 2 : Influence de la date de récolte et de la fertilisation azotée sur la qualité et la décomposition dans le sol des rhizomes, racines et feuilles sénescents de *Miscanthus giganteus*.

Chapitre 3 : Chute et décomposition des feuilles de *Miscanthus giganteus* et leur accumulation au sol : conséquences sur les dynamiques du C et N.

Chapitre 4 : Impact de la richesse en azote sur la dynamique microbienne hétérotrophe au cours de la décomposition de feuilles de *Miscanthus* dans un sol

Chapitre 5 : Discussion générale, perspectives et conclusion

Bibliographie

Annexes

CHAPITRE 2

Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization.

Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization.

Abstract

To predict the environmental benefits of energy crop production and use, the nature and fate of biomass residues in the soil needs to be quantified. Our objective was to quantify *Miscanthus x giganteus* biomass recycling to soil and to assess how harvesting time and N fertilization affect their characteristics and subsequent biodegradability. The quantification of aerial and belowground biomass and their sampling were performed on 2- and 3-year-old *Miscanthus* stands, either fertilized with 120 kg N ha⁻¹year⁻¹ or not fertilized, in autumn (maximal biomass production) and winter (maturity). Plant biomass was chemically characterized (total sugars, Klason lignin, C/N) and incubated in optimum decomposition conditions (15°C, -80 kPa) for 263 days, for C and N mineralization. Accumulation of carbon in rhizomes and roots was 7.5 to 10 t C ha⁻¹ and represented about 50% of total plant biomass C. Senescent leaves represented about 1.5 t C ha⁻¹ year⁻¹. All residues, especially the roots, had high lignin contents, while the rhizomes also had a high soluble content due to their nutrient storage function. The C mineralization rates were closely related to the chemical characteristics of the residue, higher sugar and lower lignin contents leading to faster decomposition, as observed for rhizomes.

Keywords: Carbon; Energy crop; Litter quality; *Miscanthus*; Mineralization; Nitrogen

Introduction

Increased concern for the negative impact of fossil fuels on the environment, particularly greenhouse gas emissions, has put pressure to find energy alternatives such as the use of plant biomass. To replace fossil carbon with biomass carbon, the most suitable plant species and the most appropriate agricultural management systems must be selected to meet both industrial and environmental constraints. However, removing crop residues or plant litter from fields for industrial uses is controversial, and studies have demonstrated the negative impact of litter and residue removal on soil carbon stocks and fertility (Lal 2005, 2009; Saffih-Hdadi and Mary 2008).

Among other possible bio-energy crops, the use of *Miscanthus x giganteus* (hereafter referred to as Miscanthus), a C4 perennial rhizomatous grass, seems promising due to its high productivity and longevity even under temperate and cold conditions, and its low N fertilization requirements compared to other crops (Heaton et al. 2004). Therefore, performance and potential distribution of this crop in Europe and the US has received much attention since the early 1990s (e.g. Beale and Long 1997; Bullard et al. 1997; Christian et al. 1997; Clifton-Brown et al. 2001; Heaton et al. 2008; Lewandowski et al. 2000; Schwarz et al. 1994; Tuck et al. 2006).

The cropping period of Miscanthus can be divided into an establishment phase that lasts between 3 and 5 years and a phase of main use (up to 20 years). The first phase is characterized by an increasing biomass production while during the second phase the annual production of Miscanthus is fairly constant and reach 20-30 ton (t) dry matter (DM) ha⁻¹ year⁻¹ in temperate regions and, with irrigation, up to 40 t DM ha⁻¹ year⁻¹ (Kahle et al. 2001; Lewandowski and Heinz 2003). For energy production by combustion, a Miscanthus crop is generally harvested each year at maturity (end of winter) when the crop has its highest dry

matter content (Himken et al. 1997; Lewandowski and Heinz 2003). However, the main reason for this winter harvest is that it provides the highest net energy production, as less energy is needed to dry the mature plant material prior to combustion than with younger plants (Lewandowski and Heinz 2003).

An alternative energy use for *Miscanthus* is bioethanol production which, for best efficiency, requires that the plant lignocellulose be readily accessible to hydrolysis by enzymes. The accessibility of the sugars contained in the lignocelluloses varies among plant species and their degree of lignification which is related to their maturity. Therefore harvesting younger plants, having a higher ratio soluble:cell wall, weaker cell wall interactions and/or less lignified cell walls could be an option to increase sugars accessibility (Dhugga 2007). In the case of *Miscanthus*, the implications would be to harvest earlier in autumn, when the above ground parts are still green. Harvesting earlier, in autumn, also significantly increases the amount of biomass collected by preventing so-called “pre-harvest losses” mainly due to the loss of senescent leaves (Himken et al. 1997; Miguez et al. 2009). By suppressing senescent leaf fall and nutrient re-mobilization to underground rhizomes, early *Miscanthus* harvesting directly impacts the amount and quality of the plant biomass recycled to the soil.

Further, while there is a general consensus that N fertilization has no significant impact on *Miscanthus* biomass production when harvested at maturity (Christian et al. 2008; Danalatos et al. 2007), the level of N availability may have a greater impact on plants harvested earlier in autumn because the rhizome has accumulated less N reserves and carbohydrates at that stage. During winter, *Miscanthus*' belowground rhizome system is a reservoir which is needed to form new shoots at the start of the next growing season (Beale and Long 1997). Management practices may thus affect the N concentration in plant litter, which in turn affects the rate of decomposition and the associated C and N cycling in the soil.

In the past decade a considerable amount of work has been published showing the biomass production potential of the *Miscanthus* plant grown as an energy crop under different climates (e.g. Christian et al. 2008; Miguez et al. 2008). However, to our knowledge, none of these studies have considered *Miscanthus* for bioethanol production rather than for combustion and they did not evaluate the impact of contrasted date of harvest (autumn versus winter) on the quantity and quality of aerial and underground litter of *Miscanthus*. The literature provides few data on the characteristics of *Miscanthus* leaves, rhizomes and roots (Magid et al. 2004; Burner et al. 2009) and their ability to decompose in the soil (Beuch et al. 2000; Ernst et al. 2009; Foereid et al. 2004). Generally speaking, there is a little knowledge on characteristics and decomposition of litter from rhizomatous plants, except in aquatic ecosystems, particularly with *Phragmites x australis* (Ágoston-Szabó et al. 2006; Asaeda and Nam 2002; Dinka et al. 2004).

As part of a larger experimental program studying the environmental impacts of *Miscanthus*, the objective of our present work was to assess the influence of two different harvesting strategies on the amount and intrinsic chemical characteristics of plant litters and their ability to decompose in soil. We studied the impacts of two harvest dates (an early harvest in autumn and a late one in winter) and two N fertilization rates (no N fertilization and 120 kg N ha⁻¹ year⁻¹) on the quantity and quality of *Miscanthus* senescent leaves and underground parts (rhizome and coarse roots). The ability of these residues to decompose was then assessed in a laboratory incubation experiment and the relationships between potential mineralization and chemical quality established.

Materials and methods

Site characteristics

A field experiment was conducted under the long term “Biomass & Environment” experiment set up in 2006 in Northern France, (Estrées-Mons, Picardie region, 49°80’N, 3°60’E). The objectives were to compare both the productivity of energy crops and their environmental impacts according to the agricultural practices used. This experiment compared seven crops: triticale, fibre sorghum, fescue, alfalfa, switchgrass, Miscanthus and poplar coppice, but only Miscanthus is studied in this paper. The soil is a silt loam (Orthic Luvisol) with 19.9% clay, 72.0% silt, 7.8% sand, 0.3% CaCO₃ and pH_(H2O) of 7.8 (Mary et al. 1999). Before 2006, when the Miscanthus was planted, the field had a history of intensive annual cropping (sugarbeet, winter wheat, grain maize and rapeseed). The climate is oceanic temperate with annual precipitation and temperature means of about 713 ± 49 mm and 11 ± 1°C respectively since the establishment of the Miscanthus crop (spring 2006).

Field experiment design

The field experiment consisted of a randomized block design having received two N rates (0N and 120N) in which were performed an early harvest in autumn and a late harvest in winter. This gave four treatments: AUTUMN/0N, AUTUMN/120N, WINTER/0N and WINTER/120N. Each treatment had 3 replicates. The size of a plot for one elementary treatment was 30 m * 12 m. The Miscanthus rhizomes (obtained from ADAS UK) were planted in April 2006 in a soil tilled to a depth of 20 cm, at a density of 1.5 rhizomes m⁻²,

namely a population of 15,625 plants ha⁻¹. Fertilizer N (120 kg N ha⁻¹) was added as urea ammonium nitrate solution applied each year at the beginning of growth (April).

Sampling of aboveground and belowground biomass

The study concerned the 2007 and 2008 growing seasons, i.e. the plantation's second and third years. A micro-plot area of 3.84 m² including six plants was designed within each plot for sampling over time. At each harvest date (autumn 2007 and 2008, winter 2008 and 2009), 3 whole *Miscanthus* plants (one plant per replicate) were destructively sampled from each 0N and 120N treatment. To reduce plant biomass variability which was high in field, the sampled plant was selected among the six plants of each micro-plot, as the plant having the number of stems closest to the average number of stems per plant in the micro-plot. Stems with leaves were cut manually approximately 10 cm above the ground surface. Stems and leaves were weighed to obtain fresh weight and were then separated, sub-sampled and dried at 80°C for 48 hours for dry matter determination. The weight of the stem bases, which were collected with the rhizomes, was added to that of stems and leaves to determine total aerial dry matter.

The below-ground biomass was determined to a depth of 30 cm by removing the entire, intact rhizomes and their associated roots. The rhizomes and associated roots were cleaned of soil by manual washing on a sieve to avoid dry matter loss. The roots were then separated from the rhizomes by hand. The roots from deeper layers were not recovered. The rhizomes were manually cut into small pieces (5-10 cm), distinguishing the live parts from the necrotic parts using colour criteria only (Kahle et al. 2001). The dry matter weight of roots and rhizomes was obtained by sub-sampling the fresh biomass and drying at 80 °C for 24 hours. Senescent leaf fall was monitored through the autumn-winter 2007-2008 and autumn-winter 2008-2009 periods. A nylon net (mesh size 1 cm × 1 cm) was placed on the soil surface on a micro-plot

area of 3.84 m² including 6 plants, in the 0N and 120N treatments. The fallen leaves were collected twice a month and dried at 80°C for dry matter determination. The leaves of the different sampling times were pooled together, as preliminary analysis showed no significant differences in % N content between the various samplings over time.

The yields of the different plant parts were then expressed in tonnes dry matter per hectare (t DM ha⁻¹) on the basis of 15,625 plants ha⁻¹. Sub-samples of roots, rhizomes and leaves were dried at 35°C for a week in order to not alter chemical features during drying and kept for an incubation experiment and biochemical analysis.

Chemical analysis

The total C and N concentrations of the plant parts were determined using an elemental analyzer (EURO EA, EUROVECTOR, Milano, Italia). Chemical characteristics were determined on leaf, rhizome and root samples from the first year of sampling only (2007-2008).

The neutral sugar content of the plant samples was determined using the method described by Blakeney et al (1983). Ten mg of each plant sample were swollen in 125 µl 12 M H₂SO₄ for 2 h at 20°C followed by acid hydrolysis with 1M H₂SO₄ for 2 h at 100°C. Monosaccharides released by the acid were separated by high performance anion exchange chromatography (HPAEC) on a carboPac PA-1 column (4 × 250 mm, Dionex). Monosaccharide composition was analyzed and quantified using 2-deoxy-D-ribose as internal standard and a standard solution of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-rhamnose, D-mannose and L-fucose).

The NDS-soluble fraction was determined using the method described by Goering and Van Soest (1970). One gram of residue, ground to 4 mm (RETSCH SK-1, Germany) was treated

with deionized hot water (100°C) for 30 min, followed by extraction with neutral detergent solution (NDS) at 100°C for 60 min to remove cytoplasmic components and obtain the NDF fraction. This NDF fraction, designated as cell walls, was then dried for one week at 30°C and ground to 80 µm prior to Klason lignin determination. Klason lignin (KL) was determined as the acid-insoluble residue remaining after sulphuric acid hydrolysis of cell wall polysaccharides (Monties 1984). Briefly, 200 mg of cell wall (NDF fraction) were suspended in 2 ml 12 M H₂SO₄ for 2 h at room temperature. Suspensions were then diluted to 1M with deionised water, heated at 100°C for 3 h and filtered. The remaining fractions were dried at 105°C before weighing and ash measurements performed at 550°C for 4 h. The difference between the sample's mass before and after ash measurement gives the Klason lignin value. The C, N, the NDS-soluble fraction and total sugars of the plant residues were expressed in relation to the initial residue dry matter. Klason lignin content was corrected for the extraction yield of the cell wall preparation step, i.e. the amount of material lost during NDF extraction, and was expressed as percent residue dry matter.

Incubation study

The soil from the field experiment site was sampled from the top 10cm layer of one plot. However, the first centimeters of soil were discarded due to the presence of large amounts of recent plant debris that could impact the laboratory decomposition study of added residues. Before to do so, soil characteristics of the 5-10 cm layer were determined and compared to that of the top 0-30 cm to insure that selected soil for incubation was representative of the 0-30cm depth in which senescent leaves, rhizomes or roots possibly decompose under field conditions. The soil was air-dried for two days to moisture content of about 120 mg g⁻¹ dry soil, and then sieved to 2 mm. All visible organic residues were removed by hand after

sieving. The soil was stored at the incubation temperature (15°C) for a week prior to incubation.

To assess effects of the composition of plant residues on the C mineralization, it was important to avoid possible bias resulting from interaction with N availability (Trinsoutrot et al. 2000). The availability of N not only depends on residue organic N but also on soil mineral N content, which can be highly variable for a given soil, according to fertilization, to inherent field spatial variability and to sampling time. Therefore soil N mineral content was set up two days before the start of incubation at 32.5 mg N g⁻¹ added C (i.e. 65 mg N kg⁻¹ dry soil), concentration above the threshold at which soil N does not impact the rate of decomposition of crop residues (Henriksen and Breland 1999; Recous et al. 1995). The concentration of the N solution added as KNO₃, was calculated such that the soil moisture reached a potential of -80 kPa, corresponding to a final water content of 185 g kg⁻¹ dry soil after N solution application.

The rhizomes, roots, necrotic rhizomes and senescent leaves were hand cut into pieces 4-5 mm long and 5 mm wide prior to incubation. They were added at a rate equivalent to 2 g C kg⁻¹ dry soil, mixed into the moist soil (at -80 kPa) and incubated at 15°C for 263 days for C mineralization and 114 days for N mineralization. Soil moisture was maintained throughout the incubation period by weighing at weekly intervals and adding deionized water when necessary. A control treatment was performed in the same way but without the addition of residue.

C mineralization was measured from soil samples equivalent to 100 g dry soil, incubated in 500 ml glass jars in the presence of a CO₂ trap (10 ml 1 M NaOH), with four replicates per treatment. Mineral N was determined on separate soil samples equivalent to 30 g dry soil placed in 2-litre glass jars, with three replicates per treatment. These jars also contained a CO₂ trap (30 ml of 1 M NaOH) to ensure the same atmospheric conditions as for C mineralization

measurements but the concentration of CO₂ trapped in the NaOH solution was not determined on. Mineral N was extracted at days 0, 14, 56, 85, and 114 by KCl extraction with 1 M KCl solution (soil: solution ratio of 1:4).

NO₃⁻ and NO₂⁻ were determined by continuous flow colorimetry using an adaptation of the method proposed by Kamphake et al. (1967), and NH₄⁺ was determined following the method described by Krom (1980). The concentration of CO₂ trapped in the NaOH solution was measured by continuous flow colorimetry (Chaussod et al. 1986) using an auto analyzer (TRAACS 2000, Bran and Luebbe). Residue C mineralization was calculated as the difference between each residue-amended treatment and the control treatment. It was assumed that mineralization of native soil organic C was not modified by the addition of residue (no priming effect) or that the priming effect was of the same order of magnitude for each of the different residues.

Data treatment and analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the effects of N fertilization and date of harvest on the quantity and chemical characteristics of the Miscanthus residue, while one-way ANOVA was used to analyze effect of year on treatments. Where the F values were significant, *post hoc* comparisons were made using the least significant difference test (*LSD*) at the 0.05-probability level. Pearson correlation was used to examine the relationship between initial chemical characteristics of residue and their cumulative C mineralized. Statistical analyses were performed with R 2.9.2 software.

Results

Dry matter and N accumulation

The total aboveground biomass measured at autumn harvest was 20.1 to 21.5 t DM ha⁻¹ for year 1 and 23.5 to 26.1 t DM ha⁻¹ for year 2, declining to 14.3-15.3 and 18.5-19.5 t DM ha⁻¹ at winter harvest, for year 1 and 2, respectively (Table 1). Within the same N treatment and year, the aboveground biomass decrease between autumn and winter, but nevertheless the differences were significant ($P \leq 0.05$) only for year 2 (Table 1). The increase in aboveground biomass observed in year 2 was not significant and N treatment had also no significant effect (Table 1). The amount of senescent leaves collected over the winter was about 3 t DM ha⁻¹ and did not significantly vary between year 1 and year 2 or between N treatments (Table 1).

Table 1. Dry matter and N accumulation in *Miscanthus × giganteus* aboveground biomass and senescent leaves. Aboveground biomass was harvested in year 1 (autumn and winter 2007-2008) and year 2 (autumn and winter 2008-2009). Senescent leaves were collected between autumn and winter of year 1 and 2. Plots received no fertilization (0N) or 120 kg N ha⁻¹ (120N). Treatments with the same letter (*small letter*) for a given year are indifferenced ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Year with the same letter (*capital letter*) for a given treatment are undifferenced ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Data are mean values ($n=3$).

	Nitrogen treatment	Harvest time	Dry matter (t ha ⁻¹)			Nitrogen (kg ha ⁻¹)		
			year		<i>LSD</i>	year		<i>LSD</i>
			1	2		1	2	
Aboveground part	0N	Autumn	20.1aA	23.5abA	11.3	90.1aA	93.2bA	26.1
		Winter	14.3aA	18.5cA	7.6	22.2bB	34.2cA	10.9
	120N	Autumn	21.5aA	26.1aA	10.4	100.2aA	118.2aA	29.7
		Winter	15.3aA	19.5bcA	6.6	31.1bB	41.1cA	6.9
		<i>LSD</i>	9.6	4.9		20.4	13.4	
Senescent leaf	0N	Autumn	2.8aA	3.1aA	2.3	12.8aA	17.7aA	13.5
		Winter						
	120N	Autumn	2.6aA	2.9aA	1.8	13.6aA	17.8aA	10.7
		Winter						
		<i>LSD</i>	2.6	1.3		13.5	10.7	

Belowground biomass amounted to between 10.9 and 19.5 t DM ha⁻¹ (Table 2) depending on the treatment and was not significantly affected by harvest date or N treatment. It tended to increase in the second year, though the difference was not significant. Whatever the treatment considered, rhizomes amounted to between 86 and 90% of total belowground dry matter. The rhizome parts identified as necrotic represented about 1.1-2.9% of total rhizome dry matter (Table 2).

Table 2. Dry matter and N accumulation in *Miscanthus×giganteus* belowground biomass harvested in year 1 (autumn and winter 2007-2008) and year 2 (autumn and winter 2008-2009). Plots received no fertilization (0N) or 120 kg N ha⁻¹ (120N). Treatments with the same letter (*small letter*) for a given year are indifferenced ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Year with the same letter (*capital letter*) for a given treatment are undifferenced ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Data are mean values ($n=3$).

	Nitrogen treatment	Harvest time	Dry matter (t ha ⁻¹)			Nitrogen (kg ha ⁻¹)		
			year		<i>LSD</i>	year		<i>LSD</i>
			1	2		1	2	
Rhizome	0N	Autumn	12.9aA	15.5aA	8.6	96.1aA	93.8bA	119.3
		Winter	12.8aA	15.4aA	9.3	142.2aA	141.0bA	111.0
	120N	Autumn	9.8aA	10.0aA	5.3	107.1aA	117.6bA	94.5
		Winter	10.2aA	17.3aA	11.0	160.4aA	273.3aA	175.2
		<i>LSD</i>	5.4	8.8		93.1	119.0	
Necrotic rhizome	0N	Autumn	0.15bA	0.25aA	0.3	0.6bA	1.0aA	1.3
		Winter	0.38aA	0.24aA	0.2	3.3aA	0.9aB	2.1
	120N	Autumn	0.18bA	0.17aA	0.3	1.1bA	1.7aA	3.4
		Winter	0.19bA	0.27aA	0.1	1.8bA	2.4aA	1.0
		<i>LSD</i>	0.16	0.27		1.4	2.1	
Root	0N	Autumn	1.4aA	1.8aA	1.4	9.5aA	10.6aA	10.0
		Winter	1.7aA	1.8aA	1.6	16.6aA	18.6aA	19.2
	120N	Autumn	0.9aA	1.3aA	0.7	8.2aA	10.7aA	9.9
		Winter	1.3aA	1.9aA	1.4	16.3aA	20.2aA	17.0
		<i>LSD</i>	0.8	1.3		9.6	14.2	
Total belowground	0N	Autumn	14.5aA	17.6aA	10.2	106.3aA	105.5bA	129.1
		Winter	14.9aA	17.5aA	10.9	162.2aA	160.6bA	130.0
	120N	Autumn	10.9aA	11.4aA	6.1	116.5aA	130.0bA	105.3
		Winter	11.8aA	19.5aA	12.3	178.5aA	296.0aA	189.6
		<i>LSD</i>	6.1	10.2		101.4	132.4	

Aboveground biomass sampled in winter had significantly ($P \leq 0.05$) much smaller amounts of N (22.2 to 41.1 kg N ha⁻¹) than the autumn sampled ones (90.1 to 118.2 kg N ha⁻¹), indicating that N lost from aboveground parts during winter amounted on average to 68 ± 7

kg N ha⁻¹. Application of fertilizer N had no effect on the N content of aboveground parts, except for autumn sampling in year 2, where the N content was significantly higher for the 120N treatment than for 0N (Table 1). Senescent leaves represented on average 15.5 ± 3.5 kg N ha⁻¹ for years 1 and 2, and did not vary with N application (Table 1). Total belowground parts sampled in winter accumulated higher amounts of N than those sampled in autumn, but the differences were not significant except for the winter/120N treatment in year 2, which exhibited higher N content than the winter/0N treatment (Table 2).

Chemical characteristics of senescent leaf, rhizome and root residues

Rhizome presented higher N (0.7-1.5%) and NDS-soluble fraction (24.5-35.5%) than the other plant parts (0.4-1.3% N and 16.1-23.2% NDS-soluble), for all treatments (Table 3). There was a significant increase in the % N and the NDS-soluble fraction of winter sampled rhizomes (0N and 120N) representing 1.0-1.5% N and 29.6-35.5% NDS-soluble, compared to autumn sampled ones (0.7-1.1% N and 24.5-28.5% NDS-soluble) ($P \leq 0.01$). Such variations were not found for the total sugars and Klason lignin fractions, except a significant decrease in Klason lignin in winter/0N rhizome (Table 3). As expected, for each residue the content of total sugars (which corresponds to the cellulose + hemicellulose fractions) representing 51.3-68.0% DM yielded more dry matter than any other chemical fraction (Table 3).

Necrotic rhizome presented lower % N, lower NDS-soluble fraction and lower total sugars than live rhizome but a similar or higher lignin content. Winter harvested root and necrotic rhizome showed significantly ($P \leq 0.01$) higher NDS-soluble fraction and % N concentration than autumn harvested ones, and the difference was greater for the 120N treatment than for 0N. The chemical characteristics of senescent leaf were not modified by N treatment.

Table 3. Nitrogen concentration, NDS soluble, Total sugars and Klason lignin contents in *Miscanthus giganteus* rhizome, necrotic rhizome, root and senescent leaf harvested in year 1 (autumn and winter 2007-2008). Plots received no fertilization (0N) or 120 kg N ha⁻¹ (120N). Treatments with the same letter (*small letter*) are indifferiated ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Data are mean values ($n=2$).

	Nitrogen treatment	Harvest time	Nitrogen (%DM)	NDS soluble	Total sugars	Klason lignin
Rhizome	0N	Autumn	0.7c	24.5c	65.0a	15.9a
		Winter	1.0b	29.6b	61.4a	11.9c
	120N	Autumn	1.1b	28.5b	60.3a	15.4ab
		Winter	1.5a	35.5a	68.0a	13.8b
		<i>LSD</i>	<i>0.3</i>	<i>2.6</i>	<i>16.7</i>	<i>1.6</i>
Necrotic rhizome	0N	Autumn	0.4b	17.3c	59.2a	16.4a
		Winter	0.8a	21.1b	54.7ab	17.0a
	120N	Autumn	0.5b	18.4c	56.1ab	15.9a
		Winter	0.9a	23.2a	52.7b	16.9a
		<i>LSD</i>	<i>0.2</i>	<i>1.1</i>	<i>5.2</i>	<i>1.7</i>
Root	0N	Autumn	0.6c	16.1c	67.9a	20.4a
		Winter	0.9b	17.8bc	65.8a	20.3a
	120N	Autumn	0.9b	19.9b	68.1a	19.0a
		Winter	1.3a	22.8a	64.8a	18.9a
		<i>LSD</i>	<i>0.1</i>	<i>2.1</i>	<i>9.6</i>	<i>2.5</i>
Senescent leaf	0N	Autumn	0.4a	21.7a	51.3a	14.5a
		Winter				
	120N	Autumn	0.5a	20.6b	54.3a	14.5a
		Winter				
	<i>LSD</i>	<i>0.1</i>	<i>0.4</i>	<i>7.6</i>	<i>1.3</i>	

Kinetics of C mineralization

As expected, the cumulative CO₂ produced in the residue-amended soils was greater than in the control soil and ranked as follows: rhizome > necrotic rhizome = senescent leaf > root > control as shown for the winter/0N treatment in Figure 1a. At the end of incubation (263 days), the net mineralization of residue-C was significantly higher for rhizome (59.4% of added C) than for necrotic rhizome (50.7% of added C), leaf (52.6% of added C) and root (30.0% of added C) ($P \leq 0.05$) (Table 4). The observed differences at day 263 resulted mainly from differences in C mineralization during the first 30 days (Figures 1a and 1b). From day 3 to day 30, senescent leaf mineralized more slowly than the other residues; then its C mineralization rate increased to exceed the rate of mineralization of root residue. Over the

242-263 day interval, the rates of C mineralization were not significantly different ($P \leq 0.05$) between senescent leaf ($1.6 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$), rhizome ($1.4 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and necrotic rhizome ($1.2 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$), but they were significantly higher than for root ($0.8 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and control ($0.4 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) (Data not shown).

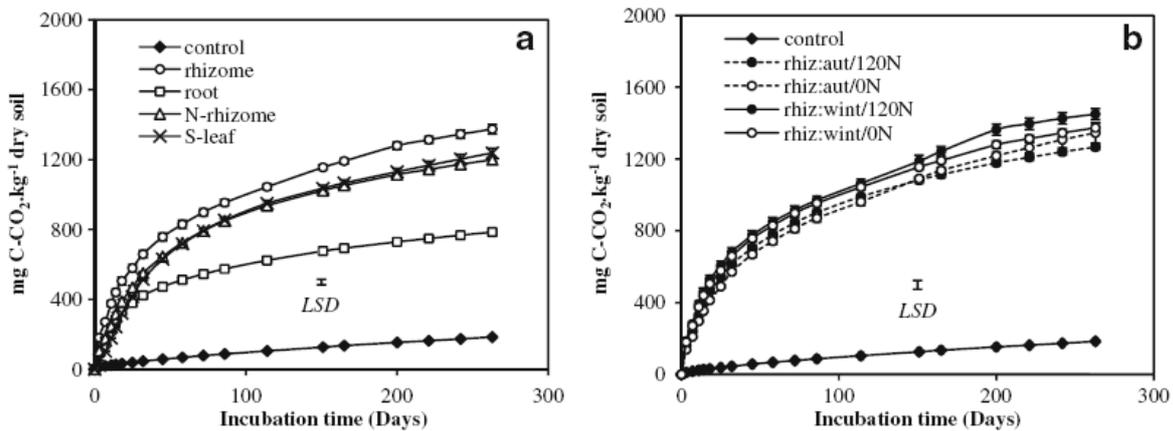


Figure 1. Kinetics of C mineralization in soils without residue (control soil) and (a) after addition of rhizome, necrotic rhizome, root and senescent leaf, harvested in winter in the 0N plots and (b) after addition of rhizome from autumn/0N, autumn/120N, winter/0N and winter/120N. Treatments are undifferentiated ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Data are mean values ($n = 4$).

Figure 1b compares the mineralization kinetics of rhizomes collected from the four treatments (harvest date x N fertilization rate). The pattern of C mineralization showed very little difference between the four types of rhizome (Figure 1b). At day 263 however, total mineralized C was significantly higher for winter/120N and lower for autumn/120N rhizomes than for the other treatments (Table 4) ($P \leq 0.05$).

The pattern of C mineralization for necrotic rhizome showed very little difference between the four treatments (Table 4) and at day 263 only the winter/120N treatment necrotic rhizome were significantly different from the others. The pattern of C mineralization of root differs significantly between treatments (Table 4) while, the cumulative mineralization of senescent leaf did not vary between the 0N and 120N treatments, representing 52.6-54.2% of added C at day 263 (Table 4).

Table 4. Cumulative %C mineralization, from rhizome, necrotic rhizome, root or senescent leaf incubated over 0-263 days in soil at 15°C and -80 kPa. Data are expressed as % of added residue-C. Data are mean values ($n=4$). Treatments with the same letter are undifferentiated ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*).

	Nitrogen treatment	Harvest time	% of CO ₂ added C
Rhizome	0N	Autumn	58.0b
		Winter	59.4b
	120N	Autumn	54.1c
		Winter	63.3a
		<i>LSD</i>	2.7
	Necrotic rhizome	0N	Autumn
Winter			50.7a
120N		Autumn	53.1a
		Winter	46.1b
		<i>LSD</i>	3.1
Root		0N	Autumn
	Winter		30.0d
	120N	Autumn	35.0b
		Winter	42.0a
		<i>LSD</i>	2.1
	Senescent leaf	0N	Autumn
Winter			
120N		Autumn	54.2a
		Winter	
		<i>LSD</i>	2.0

Soil N mineralization

Net N mineralization in the soil, expressing the net effect of residue decomposition on soil N dynamics, showed wide differences between rhizome, necrotic rhizome, root and senescent leaf, as shown in Figure 2a for the winter/0N treatment. Negative mineralization, i.e. net immobilization of N, was observed for all residues except root, which showed a slight net positive mineralization (+4 mg N kg⁻¹ obtained at day 14). Senescent leaf showed much greater net N immobilization than the other residues, with a maximum value obtained at day 90 (-35 mg N kg⁻¹ dry soil) (Figure 2a). Necrotic rhizome and live rhizome showed an

intermediate pattern (Figure 2a). At day 114, which was the last sampling time for N determination, net N mineralization showed wide differences between residues, with $-1.5 \text{ mg N kg}^{-1}$ dry soil for root, -11 mg N kg^{-1} dry soil for both types of rhizome and -35 mg N kg^{-1} dry soil for senescent leaf ($P \leq 0.05$) (Figure 2a). The shapes of the curves indicate that net re-mineralization of N did not start significantly before day 114.

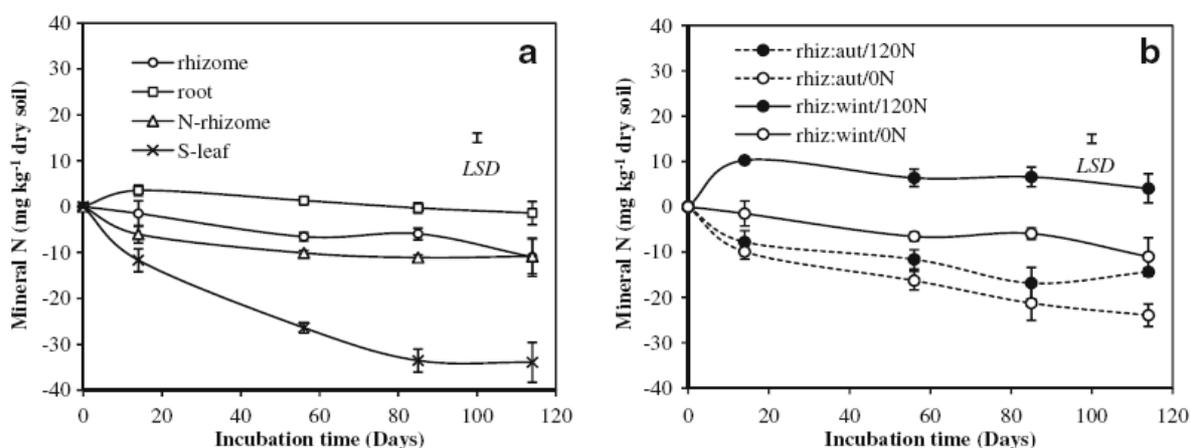


Figure 2. Net changes in soil mineral N contents during 114 days of decomposition for: (a) rhizome, necrotic rhizome, root and senescent leaf harvested in winter in the 0N plots and (b) rhizome from autumn/0N, autumn/120N, winter/0N and winter/120N. Treatments are undifferentiated ($P \leq 0.05$) by least significant difference (*LSD*). Data are mean values ($n = 3$).

When comparing the four rhizome treatments (Figure 2b) we also observed wide differences in net N mineralization in the soil, with a significant effect of N treatment and harvest time ($P \leq 0.05$). However, only winter/120N rhizome showed positive mineralization during incubation with a maximum ($+ 10 \text{ mg N kg}^{-1}$ dry soil) at day 14 and a minimum ($+ 4 \text{ mg N kg}^{-1}$ dry soil) at day 114 (Figure 2b). The net mineralization of the four rhizome treatments calculated at day 114 was positively correlated with the N concentration and negatively correlated with the C/N ratio ($R^2 = 0.94$, $P \leq 0.001$) (Data not shown).

For roots, only the winter/120N treatment showed a positive mineralization during N determination, while for necrotic rhizome a negative mineralization occurred for all four treatments during the same period. As found for rhizomes, net mineralization calculated at

day 114 was positively correlated with initial N concentration and negatively correlated with the C/N ratios of all four root treatments ($R^2 = 0.85$, $P \leq 0.05$) and all four necrotic rhizome treatments ($R^2 = 0.98$, $P \leq 0.001$) (data not shown).

Relationships between C mineralization and chemical characteristics of residues

Simple linear regressions were performed to establish relationships between the cumulative amounts of mineralized C over time and the initial chemical characteristics of the *Miscanthus* residues. To do this, firstly rhizome, root, necrotic rhizome and senescent leaf from all treatments ($n = 14$) were considered together (Table 5). In the very short term (3 to 7 days), C-CO₂ is positively correlated with N concentration ($P \leq 0.01$) and with the NDS-soluble fraction. The correlation between NDS fraction and C-CO₂ remains highly significant up to day 32, then begins to decrease but remains significant until day 263 ($P \leq 0.01$). There is no correlation between mineralized C and the total sugars fraction except at day 32 ($P \leq 0.05$). Mineralized C is strongly negatively correlated with Klason lignin from day 32 to day 263 ($P \leq 0.001$).

Correlation coefficient (R^2) between initial chemical characteristics of rhizome, necrotic rhizome, root, senescent leaf from all treatments ($n=14$) and cumulative C mineralized

Days	3	7	14	32	58	86	114	200	263
% Nitrogen	0.62 ^c	0.66 ^c	0.60 ^b	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NDS soluble	0.67 ^c	0.64 ^c	0.69 ^c	0.69 ^c	0.50 ^b	0.42 ^b	0.38 ^b	0.49 ^b	0.46 ^b
Total sugars (TS)	ns	ns	ns	0.32 ^a	ns	ns	ns	ns	ns
Klason lignin (KL)	ns	ns	ns	0.69 ^c	0.85 ^c	0.86 ^c	0.86 ^c	0.85 ^c	0.85 ^c
(KL/TS) ratio	ns	ns	ns	0.79 ^c	0.86 ^c	0.88 ^c	0.88 ^c	0.85 ^c	0.85 ^c

^{a, b, c} Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels respectively; “ns” means not significant

To understand these results, the correlations between mineralized C at day 263 and (a) Klason lignin and (b) the Klason lignin to sugars ratio were then investigated separately for rhizomes, necrotic rhizomes and roots. Klason lignin proves to be better correlated with mineralized C at day 263 for root ($R^2 = 0.70$) than for necrotic rhizome ($R^2 = 0.44$) or rhizome ($R^2 = 0.25$) (Figure 3a). By contrast, the Klason lignin to total sugars ratio is better correlated with mineralized C for rhizome ($R^2 = 0.65$) and necrotic rhizome ($R^2 = 0.63$) than for root ($R^2 = 0.03$) (Figure 3b). Total sugars are positively and more clearly correlated with mineralized C at day 263 for rhizome ($R^2 = 0.66$) and necrotic rhizome ($R^2 = 0.79$) than for root ($R^2 = 0.33$), for which a negative correlation is obtained (data not shown).

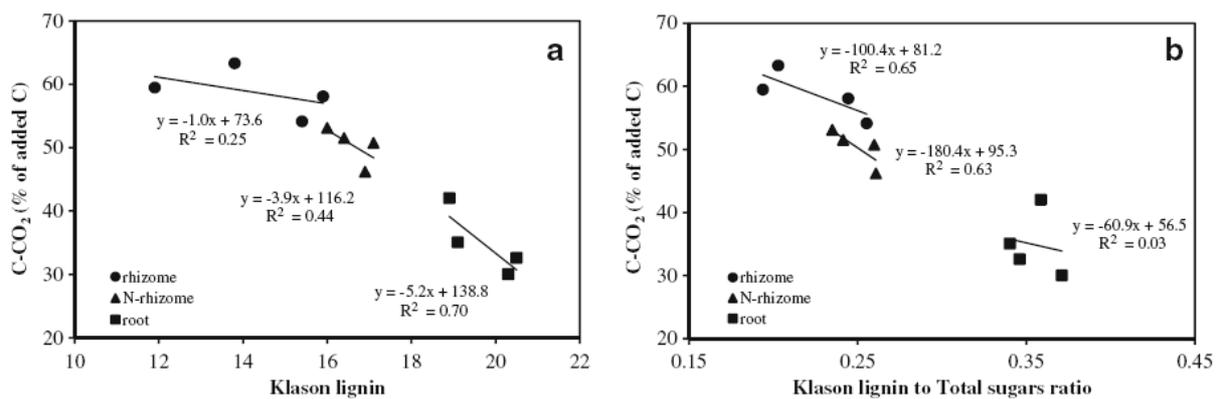


Figure 3. Relationship between mineralized C at day 263 and initial Klason lignin content (a) and ratio of Klason lignin to total sugars (b) for rhizome, necrotic rhizome and root treatments at day 263. Data are mean values ($n = 4$).

Discussion

Effect of harvesting date on biomass production and litter characteristics

The main purpose of our work was to describe the chemical features and decomposition potential of *Miscanthus* litter and assess the impact of harvesting schedule and N fertilization strategies on litter recycling to the soil. The experiment, particularly the number of destructive samplings per date and per treatment, was not designed to accurately quantify plant biomass, owing to the high spatial variability of *Miscanthus* growth. However, our data on the biomass production (14-26 t DM ha⁻¹ and 11-20 t DM ha⁻¹ for above and belowground plant parts, respectively) agree well with data from Himken et al. (1997) and Kahle et al. (2001) who found 14-34 t DM ha⁻¹ and 15-25 t DM ha⁻¹ for the same plant parts of a *Miscanthus* crop of about the same age under similar climatic conditions. Total aerial plant matter represented 30-40 t DM ha⁻¹ with about 50% of the matter produced being below ground, mainly as rhizomes. Except for N accumulation during the second year observed at winter harvesting, *Miscanthus* crop productivity did not respond to N fertilization, which confirms earlier findings from Christian et al. (2008) and Danalatos et al. (2007) who tested the biomass productivity of *Miscanthus* under different rates of N (0, 50, 60, 100 and 120 kg N ha⁻¹). This lack of response to N confirms the fact that *Miscanthus* has quite low N requirements evaluated at 50 to 70 kg ha⁻¹ yr⁻¹ by Himken et al. (1997), which in our conditions were supplied by soil mineralization. However, the extra availability of N in the 120N treatment induced higher N content in some of the plant components in year 2, particularly rhizomes and roots.

The plant biomasses that can contribute to cycling of carbon and nutrients in soil are derived from leaves, rhizomes and roots. These three plant pools are very different in terms of quantity, chemical characteristics, timing and conditions of decomposition.

Firstly, quite a large quantity of matter was lost between the autumn and winter harvesting dates, on average 6 t ha^{-1} as calculated from the difference in total aerial dry matter, or 3 t ha^{-1} as measured by weighing the leaves that fell during the winter. The amount of biomass loss agrees with other works (e.g. Burner et al. 2009; Miguez et al. 2008). In our experiment the collected leaves weighed less (3 t ha^{-1}) than reported by Beuch et al. (2000) and Kahle et al. (2001) (3 to $7 \text{ t DM ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$), but in their case the *Miscanthus* stand was 4 to 6 years old, i.e. older than in the experiment reported here. The discrepancy between the two methods of estimation was also observed by Kahle et al. (2001) and was mainly attributed to the difficulty in collecting all the fallen leaves, but also to the loss of matter from aerial parts during winter that has not been recovered as litter. The composition of the senescent leaves did not vary with N treatments. The soluble fraction (20-21% of total DM) was in proportion to what was observed for leaves from other species, e.g. brachiaria (22%), sorghum (20%), rice (22%) , wheat (25%), but the amount of lignin was higher for *Miscanthus* than for the other species mentioned (Abiven et al. 2005; Bertrand et al. 2006).

The importance of belowground plant biomass for storing organic C in soils has recently been recognized (Hansen et al. 2004; Lal et al. 2004; Liebig et al. 2008). This is particularly true for *Miscanthus*, which allocates a considerable amount of C below ground: in our study 7 - 9 t C ha^{-1} for rhizomes and 0.5 - 1 t C ha^{-1} for the roots attached to rhizomes. This accumulation of carbon in rhizomes agrees with data from Beuch et al. (2000) who also found 6 - 9 t C ha^{-1} accumulated as rhizomes for a 3-year-old *Miscanthus*. For roots the values obtained are below those published in the literature (1 - 4 t C ha^{-1}) (Beuch et al. 2000; Himken et al. 1997; Kahle et al. 2001). Our sampling procedure allowed us to collect the entire rhizome mass intact, but

our estimate of roots only concerned roots close to the rhizomes, so the root biomass was underestimated. Monti et al. (2009) considered that almost 90% of total *Miscanthus* roots were in the top 35 cm of soil while Neukirchen et al. (1999) described roots up to 250cm depth and considered that the top 30cm accounted for only 28% of root biomass. This means that the storage of C in roots was probably much higher than what we quantified directly and could be as much as 3 to 5 t ha⁻¹. The root system, or part of it, is assumed to die and regrow annually with the dynamics of rhizome growth but it remains very difficult to quantify roots and their recycling in the soil, as with any other plant species (Christian et al. 2009; Neukirchen et al. 1999). Roots showed higher lignin content (18.9-20.4 %) than other types of residue, which is in agreement with previous studies on plant roots where Beuch et al. (2000) found a lignin-like fraction of 29.7 % DM for *Miscanthus* roots and Abiven et al. (2005) measured a lignin fraction of 17 to 26 % DM for brachiaria, sorghum, rice and wheat roots. This high content in lignin partly explained the high contribution of roots to C storage in soils (Balesdent and Balabane 1996; Puget and Drinkwater 2001).

There are few data on the biochemical characteristics of rhizome and how this biochemical quality evolves during the life of the *Miscanthus* plant (Christian et al. 2009). For the 3-year-old *Miscanthus*, we found that 1.1 to 2.9% of rhizomes were necrotic, which agrees with Kahle et al. (2001) who assessed that 1 to 4% of the rhizomes were 'mortal' after 4 to 6 years of cropping. The high levels of soluble compounds we measured in the rhizomes were also observed by Beuch et al. (2000) representing 24.7 % DM in spring harvested rhizomes and are explained by the storage function of this organ. The increases observed in soluble fraction and N content between autumn (24.5-28.5% soluble and 0.7-1.1% N) and winter (29.6-35.5% soluble and 1.0-1.5% N) are due to remobilization from aerial parts to rhizomes, the plant's protein and starch reserves being transferred to the rhizome during winter, and then used for new stem growth the following spring (Beale and Long 1997; Himken et al. 1997;

Lewandowski et al. 2000). However, as we performed a chemical analysis only on the litter collected in the first sampling year (2007-2008), the long-term effect of harvest date on the characteristics of the litter (particularly rhizomes) cannot be assessed.

Biomass decomposition in soil and relationship with chemical quality

Few data are available on the ability of *Miscanthus* biomass to decompose in soil (Beuch et al. 2000; Foereid et al. 2004; Ernst et al. 2009). However, as shown at field scale, the biomass recycled to soil represents a considerable amount of organic matter that would be partly mineralized and partly stabilized at different time scales, depending on chemical characteristics and environmental conditions. It has been shown indirectly, either by looking at soil C stocks over the long term (Kahle et al. 2001) or by using natural ^{13}C tracing (Hansen et al. 2004), that a considerable amount of *Miscanthus*-derived C was accumulating in the soil, suggesting both high input and stabilization, from fallen leaves, senescent rhizomes and recycling of roots, and/or considerable rhizodeposition by the plant. In this work we investigated the ability of *Miscanthus* leaf, rhizome and root to decompose in optimal conditions (ground residues mixed into soil, non-limiting N availability conditions), not to mimic decomposition conditions in the field but to obtain parameters for future modeling purposes.

All rhizomes (whether from the autumn or winter samplings) decomposed rapidly, showing a C mineralization (both kinetics shape and rate of mineralization) usually observed for annual crop residues: high rates of decomposition early when the residue soluble fraction is consumed, slowing down rapidly when more recalcitrant compounds (cellulose and hemicelluloses) are being decomposed (e.g. Trinsoutrot et al. 2000; Jensen et al. 2005). The pattern of root decomposition was also close to that previously observed for other plant roots (e.g. Abiven et al. 2005; Bertrand et al. 2006), showing a slow rate of decomposition and low

cumulative mineralization of C, suggesting that a high proportion of root C is unable to decompose due to intrinsic chemical recalcitrance and a complex tissue architecture (Machinet et al. 2009; Rasse et al. 2005). Leaf decomposition (52.6-54.2% of added C) showed a pattern intermediate between rhizome (54.1-63.3% of added C) and root (30.0-42.0% of added C). Beuch et al. (2000) described similar ranking for decomposition for these three types of *Miscanthus* biomass. Across the relatively wide range of residue quality we investigated (rhizome, root, necrotic rhizome and senescent leaf) we confirmed the negative impact of lignin content, as determined by the Klason method, on residue mineralization (Johnston et al. 2007). When we looked at changes in quality and decomposition for a given type of residue in more detail, we found that the ratio of Klason lignin to total sugars, that reflects part of the interconnection between lignin and polysaccharides within the cell wall network (Machinet et al. 2009), was better than lignin alone for predicting the mineralized C in the case of rhizomes, but not for roots, for which this was the reverse. This is not really surprising because most of the polysaccharides would be in the cyto-soluble component in the rhizome while in root, they would be in the structural component (cell wall). Therefore, for the same level of decomposition, sugars would contribute more to C mineralization in the case of rhizomes than in the case of roots. Moreover in Gramineae, hydroxycinnamic acids (ferulic and p-coumaric acids) are the main interconnecting agents between cell wall polymers (Kato and Nevis 1985). A more detailed analysis of hydroxycinnamic acids as well as separate assessment of the soluble and structural polysaccharides in underground parts of *Miscanthus* would help us to better understand the structure of their cell wall and consequences on decomposition in soil (Bertrand et al. 2009).

We also investigated the effect of litter decomposition on N dynamics in soil, because the subsequent recycling of N will be important in *Miscanthus* crops receiving little or no fertilizer. Most of the residues induced immobilization of N during decomposition as the N

provided by the added residue was not sufficient to meet microbial N requirements during decomposition. The net N effect (i.e. the net mineralization either positive or negative) was well predicted by the initial organic N content of residues: the more N was added by the residue, the less N was immobilized in soil as shown also, for example, by Trinsoutrot et al. (2000) for a large data set of crop residues from temperate annual agrosystems. We also make the assumption that for roots, which decomposed very slowly and induced little microbial N immobilization, the low instantaneous microbial demand for N was met by the soil mineralization and microbial N recycling fluxes.

Conclusion

We saw that a Miscanthus crop is characterized by the production of a large amount of plant biomass that is potentially recycled in the soil, and that the amount, quality and decomposition of these biomasses depend on harvesting strategy and to a lesser extent on N availability (induced by N fertilization). From an environmental point of view, harvesting the Miscanthus aerial biomass early (before plant maturity) in order to harvest biomass for bioethanol production, would deprive the soil of the annual input of organic matter from leaves that fall during the winter, and the rhizomes from several months' accumulation of nutrients that are necessary for plant growth cycles. More generally speaking, the strategy of harvesting the "whole biomass" from energy crops or of exporting cereal straw as sources for bioethanol feedstock, raises question of the sustainability of the crop production and of the soils quality, on the longer term (Lal 2005; Saffih-Hdadi and Mary 2008).

The leaves and roots of Miscanthus and to lesser extent the rhizomes are characterized by a lignin content higher than residues from other crops from arable agrosystems, inducing potentially low rate of mineralization, i.e. a higher rate of organic C storage in soils. This

impact on C storage in soil and soil fertility might be an important criterion for this crop when assessing the environmental impacts of bio-energy crops. However, too few data are still available on quality and decomposition of Miscanthus residues in spite of the increasing interest for this crop, particularly on the amount and extent of recycling of roots in the soil and on rhizome decay over the life of the Miscanthus plant. This lack of knowledge also applies to almost all rhizomatous plant in terrestrial ecosystems, where most of the studies concern harvested plant parts. It also seems crucial to be able to predict the fate of the organic C stored in belowground parts, in the perspective of change in land use, i.e. when the Miscanthus stands is to be replaced in field by another crop.

Acknowledgements

This work was funded by INRA and the Region Champagne Ardenne who provided the doctoral grant to N. Amougou, and the Region Picardie (MISQUAL project AAP07-52). The authors thank S. Cadoux and M. Preudhomme (INRA Agro-Impact) for field experiment management and for providing the plant material and F. Millon, S. Millon and G. Alavoine for their technical assistance.

CHAPITRE 3

Chute et décomposition des feuilles de *Miscanthus giganteus* et leur accumulation au sol : conséquences sur les dynamiques du C et N.

Introduction

La conduite durable des cultures pérennes à vocation énergétique dans les agrosystèmes implique la diminution de l'apport de fertilisants minéraux pour obtenir un bilan énergétique favorable (Peyraud et al. 2009 ; Bauen et al. 2010 ; Sanderson et Adler, 2008). Parce qu'à long terme l'exportation de la biomasse végétale de ces cultures pérennes s'accompagne aussi d'un appauvrissement en éléments minéraux du sol (Mourad et al. 2007 ; Vymazal et al. 2010), le retour au sol des feuilles sénescentes et leur décomposition constituent une alternative pour maintenir la fertilité du sol (Neto et al. 2009).

Le rôle de cette matière organique lorsqu'elle s'accumule à la surface du sol, et son importance dans le recyclage des éléments nutritifs, ont été étudiés dans les écosystèmes forestiers (Berg et McLaugherty 2002 ; Gartner et Cardon 2004 ; Zhang et al. 2008) et agricoles (Ferraro, 2009 ; Ordonez-Fernandez et al. 2007 ; Yadvinder-Singh et al. 2010). Plusieurs fonctions sont ainsi attribuées aux litières de feuilles dans différents écosystèmes. D'un point de vue physique, en s'accumulant à la surface du sol sous forme de mulch, les feuilles protègent le sol des changements rapides d'humidité et de température ; elles protègent le sol contre l'érosion, et améliorent la capacité d'infiltration d'eau dans le sol (Ehrenfeld et al. 2003). D'un point de vue biologique, les litières de feuilles procurent l'énergie et les nutriments aux microorganismes hétérotrophes du sol (Conn and Dighton, 2000). Enfin, dans plusieurs écosystèmes, la productivité des plantes dépend en grande majorité de l'entrée et de la décomposition de ces litières de feuilles au regard des quantités considérables d'éléments minéraux qu'elles contiennent (Duchesne et al. 2010 ; Joergensen et al. 2009 ; Semwal et al. 2003). La décomposition est donc un processus clé qui va déterminer à court terme les flux de Carbone (C) et d'Azote (N), et la disponibilité d'autres éléments (P, K, S...) dans les sols (Fioretto et al. 2003 ; Olson 1963 ; Onyekwelu et al. 2006 ; Pandey et al.

2007 ; Rodriguez-Lizana et al. 2010 ; Singh et al. 1999). A plus long terme, la décomposition influence le stockage de C et par conséquent la fertilité des sols (Sparrow et al. 2006).

L'influence climatique, la nature chimique des litières des feuilles et celle des communautés microbiennes sur la décomposition sont bien documentées dans la littérature (Aerts, 1997 ; Cadish et al. 1997). Les taux de décomposition et de recyclage d'éléments nutritifs sont corrélés avec les moyennes annuelles de température, de précipitation (Trofymow et al. 2002) et d'humidité du sol (Hobbie, 1996). La composition chimique des feuilles, en particulier leur teneurs en azote et en lignine, explique aussi la décomposition (Chadwick, 1998 ; Preston et al. 2000). Les fractions soluble et holocellulose sont principalement et positivement reliées à la vitesse de décomposition à court et moyen termes alors que la fraction lignine influence négativement celle-ci (Berg, 2000). Dans les écosystèmes pérennes et notamment les forêts, les feuilles se décomposent à la surface du sol, le travail du sol étant inexistant dans ces écosystèmes. Concernant la décomposition à la surface du sol, les travaux de Conn et Dighton (2000) ont montré qu'il n'y avait pas de différences de décomposition entre les 'feuilles en contact avec le sol' et celles en contact avec d'autres feuilles pour les litières d'une même espèce de plante.

L'accumulation des feuilles à la surface d'un sol résulte d'un déséquilibre entre une forte chute de feuilles au sol et leur faible vitesse de décomposition (Martius et al. 2004). Dans le cas des cultures pérennes à vocation énergétique, des quantités considérables de feuilles sénescents tombent annuellement à la surface du sol (David et Ragauskas, 2010). Fisher et al. (2005) estiment pourtant que ces plantes pérennes, en raison de leur forte productivité, occuperont environ 40 % des surfaces agricoles d'Europe et d'Asie d'ici 2050. Pour l'espèce *Miscanthus × giganteus*, la littérature (Beale et Long 1997; Clifton-Brown et al. 2001; Heaton et al. 2008; Tuck et al. 2006) et nos travaux (Chapitre 2) ont montré d'une part que des quantités considérables de feuilles sénescents de *Miscanthus* retournent annuellement au sol

et que d'autre part la vitesse de décomposition de ces feuilles est lente, en conditions de laboratoire (chapitre 2).

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre était d'étudier la dynamique de chute des feuilles de *Miscanthus × giganteus*, leur rôle dans recyclage de l'azote (minéralisation) et les processus qui conduisent à leur accumulation à la surface du sol en conditions de plein champ. Notre hypothèse de travail est que ce compartiment organique peut contribuer significativement à la stabilisation de matière organique sous culture de *Miscanthus*.

Matériels et méthodes

Dispositif expérimental

L'expérience sur le terrain a été réalisée sur le dispositif 'biomasse énergie' mis en place en 2006 au Nord de la France (Estrées-Mons, Région Picardie, 49°80'N, 3°60'E). Ce dispositif expérimental étudie la productivité des cultures à vocation énergétique et les impacts environnementaux associés, en relation avec les pratiques culturales. Le sol est limoneux argileux avec la composition suivante : 19.9 % d'argile, 72.0 % de limon, 7.8 % de sable, 0.3 % de CaCO₃ et 7.8 de pH (H₂O) (Mary et al. 1999). Avant l'implantation du *Miscanthus*, les cultures annuelles (betteraves, blé d'hiver, maïs grain, colza) étaient cultivées sur ce sol. Le climat est tempéré océanique avec une température annuelle de 11±1°C et des précipitations annuelles de 713±49 mm depuis l'implantation de la culture de *Miscanthus* en avril 2006.

Les rhizomes de *Miscanthus × giganteus* ont été plantés en Avril 2006 dans un sol labouré à 20 cm de profondeur sur des parcelles de taille 30 m × 12 m. La densité au champ des rhizomes est de 1.5 rhizomes m⁻², ce qui représente une population théorique de 15625 plantes ha⁻¹. Depuis l'année d'installation, à chaque début de croissance en avril, les parcelles de

Miscanthus reçoivent 0 (0N) ou 120 kg N ha⁻¹ (120N) sous la forme d'une solution ammonium nitrate urée.

Cinétique de chute des feuilles sénescentes

La chute des feuilles sénescentes a été suivie durant les périodes automne-hiver 2007 - 2008 et 2008 - 2009 quand les plantes avaient respectivement 2 et 3 ans. Trois placettes par traitement (0N et 120N) de 3.84 m² de surface ont été utilisées pour étudier la cinétique de chute de feuilles au champ, sachant qu'une placette contient 6 plantes. Afin d'éviter le contact entre les feuilles et le sol un filet nylon de maille 1 cm × 1 cm de 3.84 m² a été posé à la surface du sol, tandis qu'un grillage de 40 cm de hauteur a été installé autour de la placette pour minimiser la perte de feuille due au vent (Photos 1a et 1b). Les feuilles tombées ont été ramassées 2 fois par mois et séchées à 35°C pendant une semaine pour la détermination de la masse sèche et à 80°C pour la détermination des teneurs en C et N.



Photos 1: Dispositif de récupération des feuilles tombées sur une placette de 3.84 m² contenant 6 plantes de Miscanthus. (a) Grillage minimisant la perte des feuilles due au vent et (b) filet nylon évitant le contact des feuilles au sol.

Mesure de l'accumulation des feuilles sénescentes au sol

Pour chacune des dates suivantes, octobre 2009, mars 2010 et octobre 2010 soit 3 et 4 ans après l'implantation du Miscanthus, 3 placettes par traitement (0N et 120N) ont été choisies pour quantifier l'accumulation des feuilles au sol (Photo 2a, 2b). L'épaisseur de la couche formée par les feuilles (appelée par la suite mulch) a été mesurée en insérant une tige métallique graduée jusqu'à atteindre le niveau du sol. Ces mesures ont été répétées 10 fois et de façon aléatoire au sein de chaque placette de 3.84 m².



Photos 2: (a) Feuilles de Miscanthus formant une couche de mulch à la surface du sol au sein d'une placette d'étude de 3.84 m². (b) Prélèvement du mulch à l'aide des cadres métalliques 20 cm × 20 cm au sein d'une placette.

A chaque date d'étude, des surfaces de 20 cm × 20 cm de mulch de feuilles ont été prélevées au hasard 4 fois au sein de chaque placette pour déterminer les masses sèches et teneurs en C et N. Toutes les feuilles au sein de la placette ont aussi été prélevées pour estimer précisément leur masse, puis remises en place afin d'éviter la perturbation d'une grande surface. Les débris de végétaux ou fraction particulaire se trouvant sous le mulch au contact du sol

(appelés par la suite MOP pour matière organique particulaire) ont été prélevés sans le sol à l'aide d'un mini-râteau sur une surface de 0.64 m² soit la surface occupée par un pied de Miscanthus pour déterminer leurs masses sèches et teneurs en C et N.

Etude de la cinétique de décomposition des feuilles in situ

Des feuilles sénescentes entières ont été collectées en mars et octobre 2009 dans les placettes 0N et puis séchées à l'étuve à 35°C pendant 1 semaine. Ces feuilles ramassées en mars puis en Octobre serviront respectivement à réaliser une première puis une seconde cinétique de décomposition (voir ci-dessous). Après séchage, 15 g de feuilles ont été disposés dans des litterbags de taille 20 cm × 60 cm formés de polyéthylène de maille 1 cm × 1 cm. Les litterbags ainsi confectionnés ont été fermés par des agrafes. La quantité de feuilles disposée sur cette surface représentait la densité de feuilles occupant naturellement une surface similaire au champ (Photo 3). Vingt sept litterbags (9 dates × 3 répétitions) ont ainsi été confectionnés.



Photo 3 : Feuilles sénescentes dans des litterbags de dimension 20 cm × 60 cm posés à la surface du sol. Les litterbags sont fermés par des agrafes et maintenus au sol par des épingles métalliques.

Les litterbags maintenus à la surface du sol à l'aide d'épingles métalliques ont été disposés entre les rangs de Miscanthus. Trois litterbags (répétitions) choisis au hasard ont été retirés du sol pour chacune des 9 dates suivantes : 0, 30, 60, 90, 120, 200, 280, 330 et 375 jours. La première cinétique a débuté le 8 avril 2009 et a pris fin le 20 avril 2010. Une deuxième cinétique a été réalisée du 15 octobre 2009 au 25 octobre 2010.

A chaque date de prélèvement, les litterbags ont été prélevés puis ramenés au laboratoire, où les feuilles ont été retirées des litterbags et mises à l'étuve à 35°C pendant une semaine. Après séchage, le sol collé aux feuilles a été délicatement enlevé à l'aide d'un pinceau en prenant le soin de récupérer tous les débris végétaux. La perte en masse des feuilles des litterbags, ainsi que leurs teneurs en C et N sont ainsi déterminées à chaque date de prélèvement. Les fractions soluble, hémicellulose, cellulose et lignine des feuilles des litterbags ont été déterminées pour les dates initiale (t_0) et finale (t_{375}).

La perte en masse sèche (% de la masse initiale) à chaque date de prélèvement est calculée en faisant le rapport de la masse sèche obtenue sur la masse sèche initiale.

Afin de tenir compte du caractère variable de la température au champ et permettre la comparaison entre les cinétiques des 2 années, les jours ont été convertis en 'jours normalisés' c'est-à-dire exprimés à une température de référence (15°C), en utilisant l'équation du facteur de température $f(T)$ proposé par Andren et Paustian (1987). Ce facteur est calculé sur la base d'une relation exponentielle de type Q10 entre vitesse de biotransformation et augmentation de la température et s'écrit comme suit :

$$f(T) = e^{k(T-Tr)} \text{ avec}$$

k = facteur thermique, ici $k = 0.115$ (Recous et al. 1995)

T = température moyenne journalière enregistrée au jour x

Tr = température de référence, choisie ici 15°C

Si $T > Tr$ alors $f(T) > 1$

Si $T \leq 0$, $f(T) = 0$, ce qui suppose qu'il n'y a pas d'activité biologique en dessous de cette température.

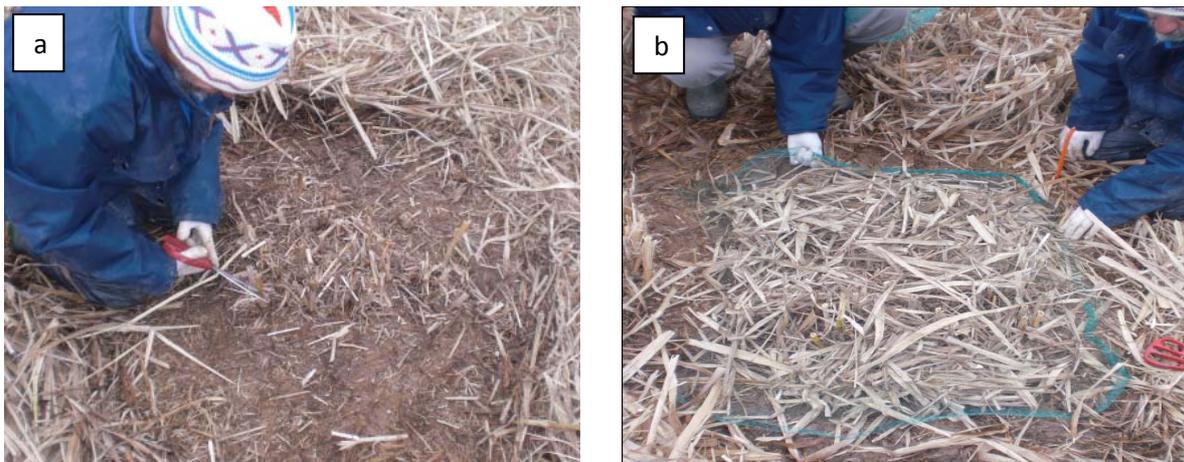
Nous avons réalisé uniquement la correction sur la température, ne disposant pas de l'humidité des mulchs au cours du temps. C'est donc une correction incomplète des facteurs d'environnement comparé à la version initiale proposée par Andren et Paustian (1987).

Devenir de l'azote des feuilles sénescentes

La démarche dans cette étude a consisté à placer des feuilles de Miscanthus, enrichies en ^{15}N (obtenues sur un autre dispositif expérimental d'Estrées-Mons par ajout d'engrais marqué ^{15}N ; collaboration Machet JM, Unité Agro-Impact) et de quantifier le devenir de l'azote ^{15}N dans les plantes et le sol. Les feuilles sénescentes enrichies en ^{15}N ont été collectées dans les parcelles du dispositif ayant reçu 120 kg N ha^{-1} sous la forme d'une solution d'azote (50 % urée et 50 % nitrate d'ammonium) ayant un excès isotopique ^{15}N de 0.42 %. Une fois collectées, les feuilles ont été séchées à 35°C pendant une semaine, une partie a été sous échantillonnée pour détermination des teneurs en N total et en ^{15}N . Ces feuilles avaient un excès isotopique initial ^{15}N de 0.14 % et une teneur en N de $7.2 \text{ g N kg}^{-1} \text{ MS}$. Les feuilles ^{15}N ont été disposées le 8 avril 2009 au début de la période de croissance du Miscanthus aux pieds des plantes de Miscanthus. Les prélèvements sur les plantes de Miscanthus et le sol ont été réalisés le 18 Août, au maximum de production du Miscanthus et avant le début de sénescence et de remobilisation vers les rhizomes.

Pour réduire la grande variabilité inhérente à la culture de Miscanthus au champ et aussi limiter la perturbation du dispositif, 3 plantes de Miscanthus ont été sélectionnées dans 3 placettes différentes 0N afin de recevoir les feuilles enrichies au ^{15}N . Nous avons choisi la plante ayant un nombre de tiges le plus proche possible du nombre moyen de tiges par plante

au sein de chaque placette (40 tiges). Les feuilles ^{15}N ont été placées à la surface du sol, à raison de 185 g de feuilles soit la quantité de feuilles correspondant à une surface de 0.64 m^2 , surface correspondant à la surface occupée par une plante. Le contact entre les feuilles ^{15}N et la plante sans tiges a été maintenu grâce à un filet polyéthylène fin à grosses mailles ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) permettant cependant une bonne levée de la plante lors de la croissance (Photos 4a, 4b).



Photos 4 : (a) Préparation d'un pied de Miscanthus occupant une surface de $80 \text{ cm} \times 80 \text{ cm}$ avant la pose des feuilles marquées ^{15}N . (b) Pose du filet maintenant les feuilles ^{15}N sur un pied de Miscanthus.

Au bout de 20 semaines de croissance (18 Août 2009), les tiges avec feuilles de chacune des 3 plantes ont été coupées à la main et séparées en feuilles vertes, feuilles sénescents et tiges. Les feuilles ^{15}N restantes au bas du pied des 3 plantes ont été récupérées à la main après le retrait du filet. Les débris de végétaux mélangés au sol ont aussi été prélevés en grattant à l'aide d'un mini-râteau la surface du sol sur l'aire concernée (0.64 m^2) par le filet. Chacune de ces fractions a été mise à sécher à 80°C pour détermination de la matière sèche et des teneurs en C total et N total. Le bloc souterrain (rhizomes+racines+sol) a été sorti intact du sol à la main à l'aide d'une pelle bêche. La profondeur du trou a été mesurée et la masse fraîche de l'ensemble déterminée par pesée. Des aliquotes de sol ont été prélevées à l'aide d'une tarière au niveau des couches 0-5 cm, 5-12 cm et 12-27 cm pour des analyses ^{15}N . La quantité de sol

total a été déterminée en tenant compte du sol adhérent au rhizome et racines, et calculée par différence de poids des rhizomes avant et après leur lavage. Pour tous les compartiments étudiés, la quantité de ^{15}N présente est : $Q_{15\text{N}} = N \times (E - E_t)$, avec :

$Q_{15\text{N}}$ = quantité de ^{15}N contenu dans un compartiment (mg / m^2)

N = N contenu dans le compartiment (g / m^2)

E = excès isotopique ^{15}N du compartiment (%)

E_t = excès isotopique ^{15}N (%) du même compartiment, mesuré sur une parcelle témoin n'ayant jamais reçu de ^{15}N .

La proportion de ^{15}N retrouvé dans un compartiment, provenant des feuilles sénescentes initiales a été calculée selon la formule : $Q_{15\text{N}} = N \times (E - E_0) / E_0$ (mg / m^2), avec :

E_0 = excès isotopique initial des feuilles sénescentes apportées (%).

Simulation de l'accumulation des feuilles à la surface du sol au cours du temps

Afin de prédire la décomposition des feuilles à la surface du sol et leur accumulation au cours du temps, un modèle a été construit, paramétré et testé en utilisant le langage de programmation du logiciel STELLA[®] (Constanza et al. 1987).

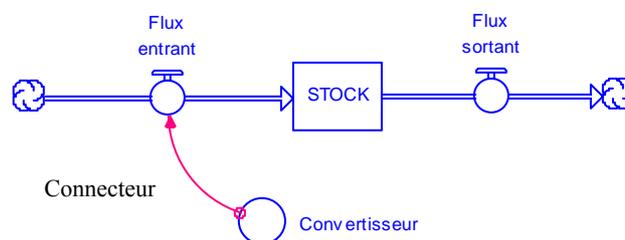


Figure 1 : Principaux éléments du modèle STELLA, les flux entrant et sortant, le stock de matière qui s'accumule, le convertisseur et le connecteur.

STELLA[®] permet de visualiser et d'analyser les équations créées après la définition des variables d'étude représentées par des icônes. Quatre éléments structurent le modèle (figure 1) : i) les flux entrant (feuilles) ou sortant (décomposition) influencent ; ii) le stock de matière qui s'accumule (feuilles non décomposées) ; iii) les convertisseurs ou variables définies (chute des feuilles annuelle, constante de décomposition) régulent les flux à chaque intervalle de la simulation ; enfin iv) les connecteurs transmettent l'information entre les variables.

Le modèle a été paramétré de la manière suivante : le flux entrant (Entrée) est alimenté par la chute des feuilles (Chute feuilles) survenant annuellement. Ces feuilles forment le stock 0 à l'année 0. Une partie de ce stock 0 se décompose selon une constante de décomposition (k), c'est le flux sortant (Décomposé) alors que la partie non décomposée (Restant) alimente un nouveau stock (stock 1) après 1 année de décomposition. Ce nouveau stock se décompose aussi au bout d'une année à une constante de décomposition ($k_1 = k$), la partie non décomposée alimentant le stock suivant et ainsi de suite (figure 2).

La quantité de feuilles (3 t MS ha^{-1}) alimentant le stock 0 a été calculée sur la base des résultats des deux cinétiques de chute de feuilles obtenues. La constante de décomposition annuelle (k) a été calculée à partir des 2 cinétiques de décomposition au champ. L'équation (1) $\ln(X_0/X_t) = k \times t$ permet de calculer la constante k , X_0 étant la masse initiale des feuilles mises à décomposer et X_t la masse restante des feuilles au bout d'un temps t (Olson, 1963).

L'évolution des stocks se calcule de la manière suivante :

$$(2) [MS]_t = [MS] (t - dt) + (Entrée - Restant - Décomposé) \times dt, \text{ avec :}$$

Entrée = chute feuilles = 3 t MS ha^{-1} , 1 fois par an dans notre étude,

Stock = Entrée,

Décomposé = $k \times \text{Stock}$ et

Restant = $k \times \text{Stock}$.

Nous faisons l'hypothèse que k est constant au cours des années : $k = k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = 0.00189$.

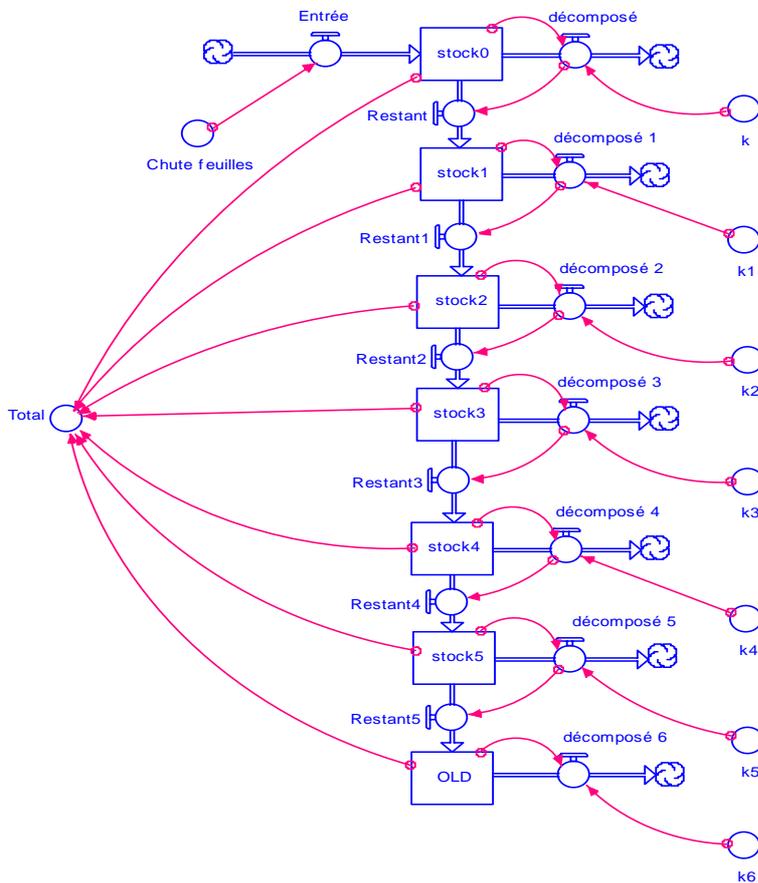


Figure 2 : Modèle de simulation de l'évolution des feuilles initiales (Stock 0) au cours du temps. L'entrée annuelle de matière 3 t ha^{-1} (chute des feuilles) et la constante de décomposition (k) ont été calculées respectivement à partir de 2 années chute des feuilles et de 2 années de décomposition au champ. Les feuilles non décomposées contribuent au stock des années suivantes.

Analyses chimiques

Les teneurs en C et N ainsi que les excès isotopiques ^{15}N des différents compartiments (plante et sol), ont été déterminées à l'aide de l'analyseur élémentaire (EURO, EA, EUROVECTOR, Milano, Italia) couplé à un spectromètre de masse (DELTA AVANTAGE, THERMO-ELECTRON, Bremen, Deutschland). La détermination des proportions en soluble, hémicellulose, cellulose et lignine des feuilles sénescents a été effectuée par la méthode

décrite par Van Soest (1963) et modifiée par Goering et Van Soest (1970). La fraction soluble a été obtenue en traitant 1 g de feuilles à l'eau chaude (100°C) pendant 30 min suivi d'un traitement au détergent neutre (NDS) à 100°C pendant 60 min pour obtenir la fraction fibreuse (NDF) qui correspond aux parois. L'extraction des hémicelluloses a été réalisée à l'aide du détergent acide (ADS) à 100°C pendant 60 min pour obtenir la fraction ADF qui correspond au mélange cellulose + lignine. Cette dernière fraction a été traitée avec une solution H₂SO₄ 72 % pendant 3 heures pour la détermination de la fraction cellulose, on obtient ainsi la fraction ADL qui correspond la lignine. La fraction lignine est déduite de la masse ADL par rapport à la masse du creuset vide. Les teneurs en cendres ont été déterminées par passage au four à 550°C pendant 4 heures, mais celles-ci étaient faibles (< 3 %) et elles n'ont pas été prises en compte dans les calculs.

Analyses statistiques

L'effet de l'année d'étude pour l'étude des cinétiques de chute des feuilles ainsi que l'effet de la période de prélèvement du mulch sur les différentes variables sont examinés à travers l'analyse de variance (ANOVA 1 facteur) suivi du test LSD de Fischer au seuil $P < 0.05$ quand la valeur de F est significative. Le logiciel libre R 2.9.2 est utilisé pour traiter les données.

Résultats

Cinétique de chute des feuilles sénescentes

Les parcelles issues des deux traitements azotés (0N et 120N) ne présentent pas de différences significatives dans les cinétiques de chute des feuilles que ce soit sur l'évolution des matières sèches ou des quantités d'azote dans les feuilles (résultats non montrés). En conséquence, seuls les résultats de la parcelle 0N sont présentés ici. Les feuilles commencent à tomber dès octobre et cette chute s'intensifie dans la période de novembre à janvier. En février, presque toutes les feuilles sont tombées (Figure 1a). La cinétique de chute des feuilles est différente entre les 2 années, avec une chute importante en décembre pour l'année d'étude 2007 - 2008 alors qu'on observe pour 2008 - 2009 deux périodes de forte chute dont une en décembre et l'autre en janvier (Figure 1a).

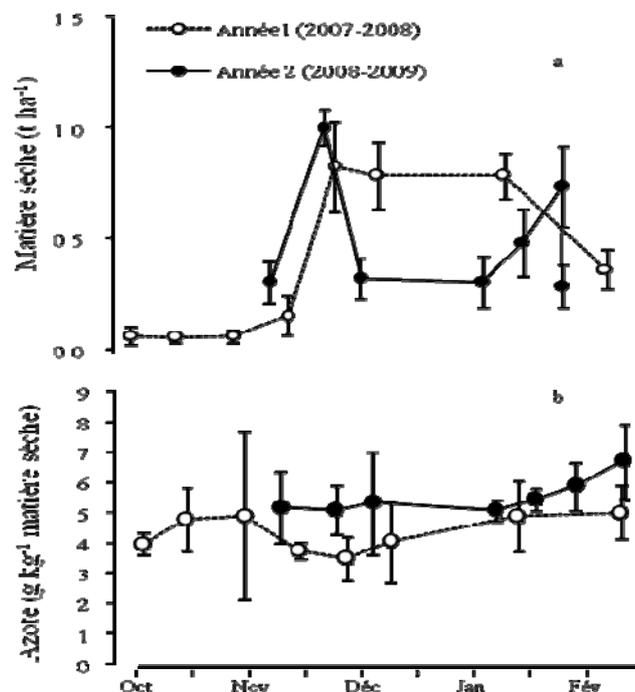


Figure 1 : (a) Quantité de feuilles de *Miscanthus × giganteus* récoltées au sol ($t\ ha^{-1}$) et (b) teneur en azote total ($g\ kg^{-1}\ MS$) des feuilles sénescentes récoltées. Les feuilles ont été ramassées d'octobre 2007 à février 2008 et d'octobre 2008 à février 2009 dans les parcelles 0N. Chaque point est la moyenne de 3 répétitions (\pm écart-type).

L'analyse des teneurs en azote des feuilles au cours du temps (figure 1b) montre que les feuilles qui tombent ont des teneurs en azote comprises entre 4 et 5 g kg⁻¹MS pour l'année 1, et des teneurs comprises entre 5 et 7 g kg⁻¹MS pour l'année 2. Les différences entre dates de collectes ne sont pas significatives pour une année donnée, mais les moyennes de teneur en azote sont significativement différentes entre les 2 années ($P \leq 0.001$, $LSD = 0.59$) : 4.6 ± 1 g kg⁻¹ MS pour l'hiver 2007 - 2008 et 5.6 ± 0.8 g kg⁻¹ MS pour l'hiver 2008 - 2009.

Au total la masse des feuilles sénescentes récoltées est quasi-équivalente pour les deux années et représente 2.8 et 3.1 t ha⁻¹ pour l'année 1 et l'année 2, respectivement (Tableau 1). Ces masses de feuilles représentent 13 et 18 kg N ha⁻¹, mais ces différences ne sont pas significatives (Tableau 1).

Tableau 1 : Masses sèches et quantités de C et N de l'ensemble des feuilles de *Miscanthus × giganteus* tombées entre octobre 2007 et février 2008 (année 1) et octobre 2008 et février 2009 (année 2). Les années affectées d'une même lettre pour un paramètre étudié ne sont pas significativement différentes (test LSD , $P \leq 0.05$). Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions représentant 3 parcelles différentes.

	Période récolte	Masse sèche t ha ⁻¹			C kg ha ⁻¹			N kg ha ⁻¹		
		année		LSD	année		LSD	année		LSD
		1	2		1	2		1	2	
Feuilles sénescentes	Automne	2.8a	3.1a	2.3	1223b	1398a	48.5	12.8a	17.7a	13.5

Cinétique de décomposition des feuilles sénescentes

La décomposition estimée par la perte de masse des feuilles placées dans des litterbags au champ, évolue différemment entre les 2 années d'étude (figure 2a).

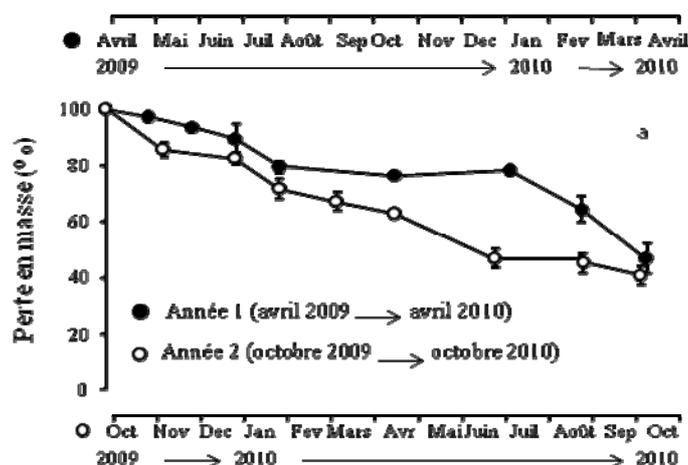
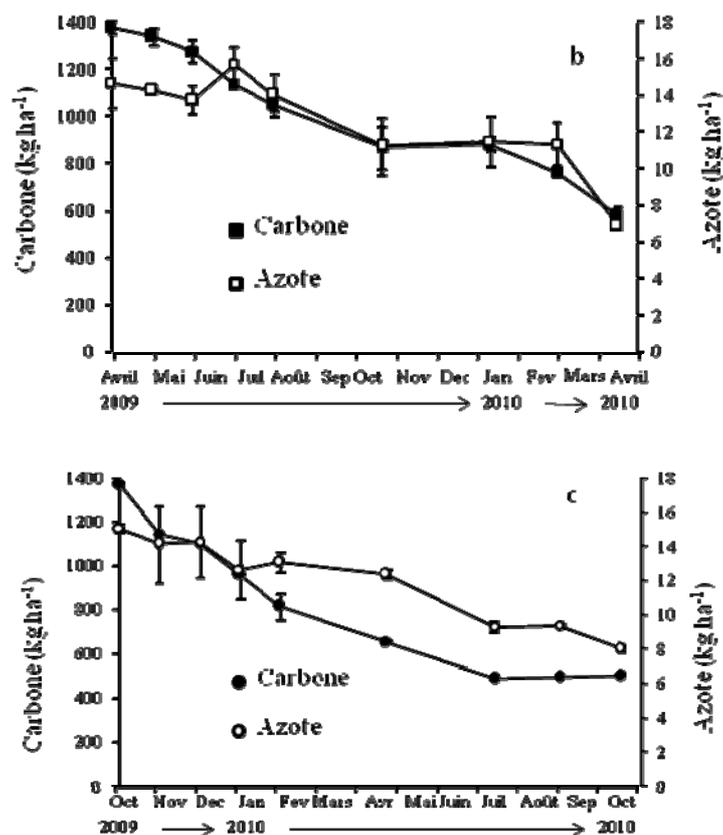


Figure 2a : Evolutions de la perte en masse (% de MS) sur la période avril 2009- avril 2010 (année 1) et sur la période Octobre 2009- Octobre 2010 (année 2). Chaque point est la moyenne de 3 litterbags prélevés à chaque date (\pm écart-type).

Au cours de la première année nous observons trois phases de décomposition, en fonction de la saison. La première phase située entre avril et juillet 2009 (375 jours), montre une décomposition lente et régulière qui aboutit environ à 20 % de perte de masse. La deuxième phase en plateau, entre juillet 2009 et janvier 2010 (365 jours), indique qu'il n'y a pas de perte de masse. La décomposition s'accélère ensuite à partir de janvier 2010. La perte de masse totale sur l'année correspond à 54 % de la masse initiale apportée. Au cours de la deuxième année, on observe une décomposition plus rapide et plus régulière comparée à celle de l'année 1, entre octobre 2009 et juin 2010 (240 jours), puis la masse reste constante entre juin et septembre. Cependant la perte totale des feuilles n'est pas différente de celle observée au cours de l'année 1, avec un taux de décomposition de 54 % en octobre 2010.

Les évolutions des quantités de C au cours de la décomposition suivent celle de la perte en masse des feuilles lors des 2 années d'étude (figures 2b, 2c).



Figures 2b, 2c : Evolutions de la quantité de C (kg C ha⁻¹) et N (kg N ha⁻¹) sur la période (b) avril 2009- avril 2010 (année 1) et (c) sur la période Octobre 2009- Octobre 2010 (année 2). Chaque point est la moyenne de 3 litterbags prélevés à chaque date (\pm écart-type).

Après une année de décomposition au champ la quantité de C des feuilles passe de 1375 à 494 kg ha⁻¹ pour l'année 1 et de 1400 à 579 kg ha⁻¹ pour l'année 2. L'évolution de l'azote des feuilles au cours de la décomposition est similaire pour les 2 années d'étude, passant respectivement de 15 à 9 et de 15 à 7 kg ha⁻¹ pour les années 1 et 2 (figures 2b, 2c).

La conversion des cinétiques de décomposition au champ de nombre de jours à nombre de jours normalisés (à une température de 15°C), conduit à une durée de cinétique équivalente à 300 jours à 15°C pour l'année 1 et à 288 jours à 15°C pour l'année 2 (figure 3). Cette conversion accentue les différences entre les 2 années de cinétiques. Lors de l'année 1, on

n'observe plus que 2 phases de décomposition, une phase lente et progressive située entre 0 et 260 jours, puis une phase rapide à partir du jour 260 jusqu'au jour 300. L'année 2 montre une décomposition rapide et progressive dès les premiers jours (de 0 à 160 jours) suivie d'une phase constante entre 160 et 288 jours.

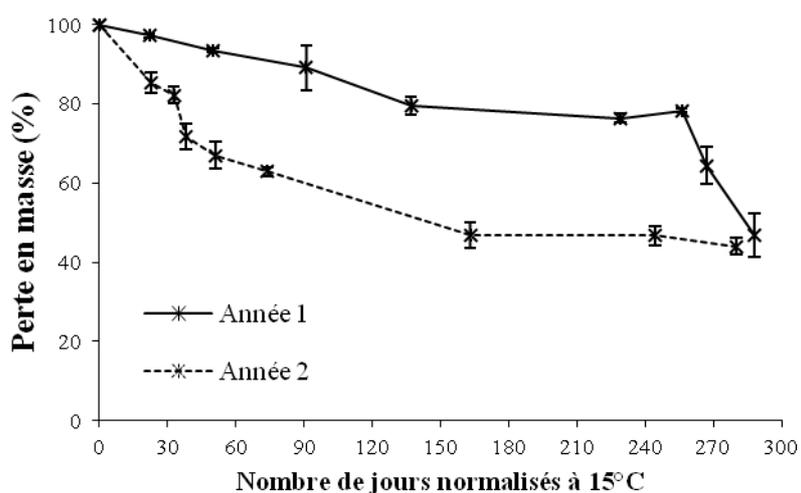


Figure 3 : Cinétiques de décomposition des feuilles, exprimées en fonction des jours normalisés à 15°C. Elles ont été réalisées à partir d'avril 2009 jusqu'à avril 2010 (année 1) et d'octobre 2009 à octobre 2010 (année 2). Chaque point est la moyenne de 3 litterbags.

Devenir de l'azote des feuilles au sol

Quatre mois après le placement des feuilles marquées ^{15}N sur les pieds de Miscanthus, on observe une diminution de perte en masse des feuilles équivalente à 22 ± 1.2 % de la masse initiale apportée. Cette perte de masse est équivalente à celle observée par la méthode des litterbags décrite ci-dessus, sur la même période de temps. Cette perte en masse s'accompagne d'une diminution de 20 % de l'azote et d'une perte de 71 % de la quantité de ^{15}N (Tableau 2). Les feuilles vertes ne sont pas enrichies en ^{15}N , alors que les feuilles sénescentes ont un faible enrichissement comparé aux organes équivalents de la plante témoin sur les placettes non marquées (données des plantes "témoin" non montrées). Les tiges, les rhizomes et les racines ont un excès isotopique ^{15}N de 0.0012 ± 0.0003 %, 0.0004 ± 0.0001 % et 0.0002 ± 0.0001 %, respectivement (Tableau 4). Au total on retrouve dans la plante 2 % du ^{15}N apporté par les feuilles.

Pour le sol, le compartiment organique formé par les particules de feuilles à sa surface est enrichi significativement en ^{15}N avec un excès isotopique de 0.0170 ± 0.0097 %, et la quantité de ^{15}N représente 12 % de l'apport. La couche de sol sous jacente (0-5 cm) est aussi enrichie en ^{15}N par rapport au témoin avec un excès isotopique ^{15}N égal à 0.0027 ± 0.0010 % alors que les couches 5-12 cm et 12-27 cm ont une abondance isotopique identique à celle des couches équivalentes du sol témoin (tableau 2). Ceci suggère qu'il n'y a pas eu de migration significative du ^{15}N apporté par les feuilles à ces profondeurs. Au total le recouvrement du ^{15}N est équivalent à 45 %, il manque donc dans ce bilan 55 % du ^{15}N apporté initialement par les feuilles.

Tableau 2 : Matière sèche, teneur en N et excès isotopique ^{15}N des compartiments mesurés : feuilles marquées initiales et restantes, particules de résidus, organes des plantes de *Miscanthus*, couches de sols. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions (\pm écart-type de la moyenne). L'excès ^{15}N des compartiments représente la différence d'abondance ^{15}N avec les compartiments équivalents mesurés sur la plante et le sol de placettes « témoin » n'ayant pas reçu de feuilles enrichies en ^{15}N .

		Matière sèche	Teneur N	excès ^{15}N	Recouvrement ^{15}N
		g m^{-2}	%	%	% ^{15}N apporté
	Initial	289	0.72	0.1377	100
Feuilles ^{15}N					
	Final	230	0.70	0.0402	29
	<i>ecartype</i>	28	0.03	0.0018	
	Feuille verte	462	1.5	0.0000	0
	<i>ecartype</i>	48	0.1113	0.0001	
	Feuille sénescente	197	0.4	0.0003	0.2
	<i>ecartype</i>	47	0.0219	0.0001	
Plante	Tige	2917	0.4	0.0012	0.9
	<i>ecartype</i>	309	0.0698	0.0003	
	Racine	177	0.7	0.0002	0.1
	<i>ecartype</i>	63	0.0763	0.0001	
	Rhizome	1444	0.9	0.0004	0.3
	<i>ecartype</i>	323	0.0909	0.0001	
Fraction particulaire		210	0.6	0.0170	12
	<i>ecartype</i>	16	0.0061	0.0097	
Sol	Couche 0-5cm	9156	0.1	0.0027	2
	<i>ecartype</i>	2818	0.0064	0.0010	
	Couche 5-12cm	12818	0.1	0.0000	0
	<i>ecartype</i>	3822	0.01	0.0000	
	Couche 12-27cm	27468	0.1	0.0000	0
	<i>ecartype</i>	9597	0.01	0.0000	
Recouvert					45
Pertes					55

Quantification et caractérisation du mulch de feuilles

Les quantités de feuilles mesurées à l'automne 2009 à la surface du sol représentent 4 et 5 t ha⁻¹ respectivement pour les traitements 120N et 0N (tableau 3). Elles proviennent des chutes de feuilles des deux premières années de la culture de Miscanthus. Ces quantités passent à 5 (120N) et à 6 t ha⁻¹ (0N) en février 2010. L'augmentation des quantités de feuilles durant l'hiver se traduit aussi par une augmentation de 2 cm d'épaisseur du mulch au sol (Tableau 3). Puis la masse de mulch mesurée durant l'hiver diminue de 22 % entre février 2010 et octobre 2010, ce qui s'accompagne aussi d'une baisse d'épaisseur de 2 cm du mulch observée en octobre 2010.

Tableau 3 : Epaisseurs, masse sèche, quantités de C et N et rapport C/N des feuilles formant un mulch et des fractions particulières végétales prélevées en octobre 2009, février 2010 et octobre 2010 dans les parcelles 0 et 120 kg N ha⁻¹. Les traitements affectés d'une même lettre au sein d'un paramètre étudié ne sont pas significativement différents (test *LSD*, $P \leq 0.05$). Pour l'épaisseur, chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions représentant 3 parcelles différentes. Pour les autres paramètres, chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions représentant 3 parcelles différentes.

fertilisation	date	Epaisseur	Matière sèche	C	N	C/N		
		cm	t ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹			
MULCH	0N	oct-09	2b	4.9a	1260b	31a	42b	
		févr-10	4a	5.8a	2134a	36a	60a	
		oct-10	2b	4.6a	1487ab	25a	60a	
	120N	oct-09	2b	3.9a	900b	26a	35bc	
		févr-10	4a	5.0a	1895a	33a	58a	
		oct-10	2b	3.9a	1174ab	25a	47b	
		<i>LSD</i>	0.6	2	767	17	12	
	MOP	0N	oct-09		2.3a	480a	11a	44a
			févr-10		2.6a	466a	12a	39a
oct-10				2.8a	427a	11a	39a	
120N		oct-09		2.6a	456a	13a	35a	
		févr-10		4.1a	762a	20a	38a	
		oct-10		2.4a	400a	10a	40a	
	<i>LSD</i>		2	366	10	7		

Les quantités de C à l'automne 2009 stockées sous forme de mulch représentent respectivement 900 et 1261 kg C ha⁻¹ pour les traitements 120N et 0N. Ces quantités de C augmentent significativement ($P \leq 0.05$) pendant l'hiver suite à la chute totale des feuilles et passent respectivement à 1895 et 2134 kg ha⁻¹ pour 120N et 0N. En octobre 2010 on observe une diminution de 38 et 30 % de la quantité de C du mulch des traitements 120N et 0N (Tableau 3). Les quantités d'azote mesurées dans le mulch à l'automne 2009 représentent 26 (120N) et 31 kg N ha⁻¹ (0N), et augmentent un peu à 33 (120N) et 36 kg N ha⁻¹ (0N) après la chute des feuilles. Ces augmentations ne sont pas significatives (Tableau 3). La fraction particulaire ou MOP ne varie pas significativement, tous traitements et toutes dates de prélèvement confondus tant en quantité de matière sèche qu'en quantités de C et N.

L'analyse Van Soest révèle des variations significatives ($P \leq 0.05$) des teneurs relatives en fraction soluble et en hémicellulose des feuilles du mulch entre le prélèvement en Octobre 2009 et celui en Février 2010, alors que les teneurs en cellulose et lignine ne sont pas significativement différentes entre ces deux dates (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractérisation chimique (Van Soest, 1963) du mulch de feuilles et des particules végétales au sol (MOP) prélevées en octobre 2009, février 2010 et octobre 2010. Les traitements affectés d'une même lettre au sein d'un paramètre étudié ne sont pas significativement différentes (test *LSD*, $P \leq 0.05$). Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions représentant 3 parcelles différentes.

			Soluble (% de la masse sèche)	Hémicellulose	Cellulose	Lignine
Mulch	0N	Oct-09	22a	30b	35a	14a
		Fév-10	20b	34a	35a	10a
		Oct-10	23a	31b	34a	13a
		<i>LSD</i>	1.3	2.3	2.8	4.3
MOP	0N	Oct-09	19a	25a	39a	17a
		Fév-10	19a	26a	37a	18a
		Oct-10	19a	24a	38a	18a
		<i>LSD</i>	3.8	3.9	6.0	4.3

Cependant les variations même significatives demeurent faibles avec une teneur relative en soluble qui passe de 22 à 20 % MS entre octobre et février alors que les teneurs en hémicellulose varient de 30 à 34 % entre les deux dates. Les mulchs prélevés en octobre 2009 et en octobre 2010 présentent les mêmes caractéristiques biochimiques (Tableau 4). Les teneurs relatives en soluble (19 %), hémicellulose (25 %), cellulose (39 %) et lignine (18 %) de la fraction particulaire en contact avec le sol ne varient pas significativement entre les dates de prélèvement (Tableau 4).

Simulation de l'accumulation des feuilles au sol

Nous avons simulé avec STELLA l'évolution de l'accumulation des feuilles à la surface du sol et ce, pendant 10 années (figure 6a). Les feuilles s'accumulent progressivement pour atteindre un total de matière sèche équivalent à 6.9 t ha^{-1} au bout de 4 années de chute des feuilles. Après 4 ans, la quantité accumulée devient constante et ce jusqu'à 10 ans (fin de la simulation). Expérimentalement, nous avons mesuré la quantité de matière sèche accumulée à la surface du sol après 4 années d'installation de la culture du Miscanthus.

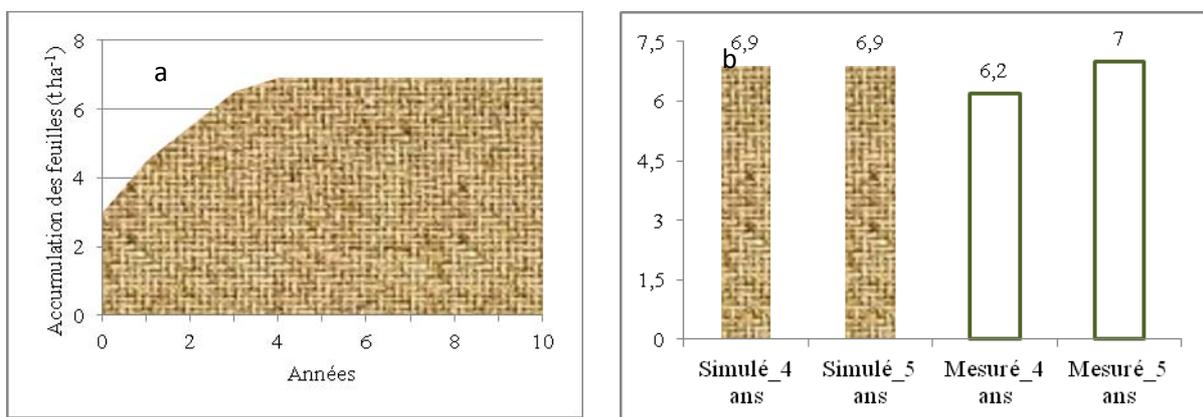


Figure 6 : (a) Simulation de l'accumulation des feuilles pendant 10 ans depuis l'implantation de la culture, en tenant compte d'une entrée de feuilles annuelle de 3 t ha^{-1} et d'une constante de décomposition de 0.00189. (b) Comparaisons des valeurs simulées et mesurées d'accumulation des feuilles au bout de 4 et 5 ans d'installation de la culture du Miscanthus.

La quantité accumulée représente 7.2 t ha⁻¹ dans les parcelles 0N et 6.5 t ha⁻¹ dans les parcelles 120N. Nous constatons que ces valeurs mesurées sont proches des valeurs simulées même si la simulation ne prend pas en compte des variations saisonnières de chute des feuilles et de décomposition. Le modèle prédit qu'au delà de 4 ans qu'il n'y a plus d'augmentation d'accumulation, l'équilibre étant atteint entre entrée de matière et leur décomposition. Nos mesures tendent à confirmer cette simulation, puisque en année 5 (octobre 2010), la quantité de matière sèche sous forme de mulch est équivalente à celle d'octobre 2009 (figure 6b).

Discussion

Dynamique de chute des feuilles

Dans notre étude les feuilles de *Miscanthus* commencent à tomber en automne (octobre) comme cela est observé dans d'autres travaux concernant *Miscanthus* (Acaroglu et Aksoy, 2005 ; Hansen et al. 2004). D'autres auteurs ont cependant observé une chute de feuilles précoce en été (juillet) (Kahle et al. 2001). Cette différence est associée à la physiologie de la plante, elle-même liée aux conditions climatiques. En effet, la carence en eau causée par la sécheresse, crée un stress hydrique qui déclenche les stades de floraison et de sénescence chez *Miscanthus* (Cosentino et al. 2007 ; Ercoli et al. 1999 ; Heaton et al. 2004). Il a par exemple été montré en Grèce, que les dates de floraison et de sénescence des parcelles de *Miscanthus* irriguées en eau, étaient repoussées en automne. La vitesse du vent et les moyennes mensuelles de précipitation élevées au cours de l'année 2 (voir annexe 1) expliquent les différences observées de cinétique de chute des feuilles entre les années d'étude 1 et 2. Des conclusions similaires ont été rapportées dans les écosystèmes forestiers (Nikolaidou et al. 2010).

La remobilisation de l'azote avant la chute des feuilles dans les autres compartiments de la plante est capitale, l'azote étant un élément essentiel pour la croissance des plantes. De nombreuses études effectuées sur organe détaché (par exemple feuille étendard du blé et feuille de l'épi du maïs) fournissent de bonnes informations sur le métabolisme des protéines des feuilles qui est profondément modifié au début de la sénescence (Cliquet et al. 1991). Dans le présent travail, 66 % environ de l'azote des feuilles vertes (passage de la teneur en N des feuilles vertes de 1.5 % à 0.5 % MS à la sénescence) ont été remobilisés à la sénescence vers les rhizomes. Cela explique l'absence de variation des teneurs en azote observées pour les feuilles sénescentes aux différentes dates de collecte. Nos résultats sont accord avec d'autres travaux : Himken et al. 1997, Neukirchen et al. 1999 ont montré que 70 % d'azote des feuilles vertes de *Miscanthus* étaient remobilisés vers les parties souterraines avant la sénescence complète de la plante. Des phénomènes similaires sont aussi observés dans les pins et les aulnes (Das et Das, 2010; Edmonds et Tuttle, 2010).

Les feuilles tombées annuellement au sol ont représenté en moyenne 3 t MS ha⁻¹, ce qui représente 1300 kg C ha⁻¹ et 15kg N ha⁻¹ recyclés vers le sol. Cette entrée considérable de matière organique peut contribuer à long terme à l'augmentation du C organique dans le sol. Nous avons calculé que l'entrée annuelle d'azote par les feuilles tombées au sol représente 15 kg N ha⁻¹, alors que 55 kg N ha⁻¹ sont remobilisés des parties aériennes vers les rhizomes pour des cultures de 2 à 3 ans (voir chapitre 2). Les quantités de feuilles collectées au sol sont en accord avec d'autres travaux (Burner et al. 2009 ; Miguez et al. 2008) et les différences observées avec ces études sont dues à l'âge des cultures de *Miscanthus* et à la méthode d'estimation des feuilles : les cultures plus âgées (6 ans) que les nôtres (3 ans) ont des quantités de feuilles plus importantes comprises entre 3 et 7 t ha⁻¹. Ces travaux prennent aussi en compte les parties supérieures tiges dans le calcul des feuilles (Beuch et al. 2000) ce qui peut expliquer ces matières sèches supérieures.

L'absence d'effet de la fertilisation azotée sur la production de biomasse végétale en général, et celle des feuilles en particulier est due aux faibles besoins en azote de cette plante. Ces besoins sont assurés par les remobilisations d'azote entre les parties aérienne et souterraine, par la minéralisation des feuilles au sol et enfin par la minéralisation de la matière organique du sol. D'autres auteurs ont obtenus les mêmes résultats et concluent à l'absence d'effet de la fertilisation azotée (Christian et al. 2008 ; Danalatos et al. 2007; Ercoli et al. 1999).

Décomposition des feuilles à la surface du sol

A notre connaissance, ce travail est le seul qui porte sur la décomposition des feuilles de *Miscanthus in situ* soit en conditions de champ. Pour chacune des deux cinétiques de décomposition réalisées, un peu plus de 50 % des feuilles sont décomposées au bout d'une année. Les études de décomposition des litières sénescents de légumineuse pérenne (Kalburtji et al. 2003) et de plusieurs types de litières forestières (hêtre, peuplier, etc.) conduisent à des taux de décomposition similaires aux nôtres après un an (Duchesne et al. 2010 ; Semwall et al. 2003). Par contre, la cinétique de décomposition n'a pas démarrée à la même période pour les deux années (la mise en place expérimentale des litters-bags ayant été retardée la première année) et cela explique la différence de cinétique observée.

La température, l'humidité, la qualité du substrat ainsi que l'activité biologique du sol influencent la décomposition (Harmon et al. 2009 ; Prescott, 1996 ; Zhang et al. 2008). Dans l'étude présente, la sécheresse (voir annexe 1) et l'absence de canopée occasionnée par la récolte des tiges de *Miscanthus* en hiver, (avril 2009) expliquent probablement la décomposition lente observée en début de la première année de cinétique. Byard et al. (1996) ont observés les mêmes effets lors de leurs travaux en forêt. Concernant la deuxième année d'étude, les conditions idéales d'humidité du sol favorisées par des fortes précipitations (voir

annexe 2) et la présence de canopée à l'automne ont probablement accéléré la décomposition. Ces résultats suggèrent que les conditions de climat favorables (humidité de l'air, pluviométrie, etc.) sont importantes pour la décomposition des feuilles à la surface du sol, comme l'a montré Coppens et al. (2007) avec des pluies simulées sur des mulchs de résidus. La conversion des cinétiques en jours normalisés à 15°C a permis de s'affranchir des variations de température et a révélé l'influence d'autres facteurs comme par exemple l'humidité. Dans la présente étude, pour un nombre de jours normalisés à 15°C de 260 les feuilles perdent 50 % de leur matière sèche pendant l'année 2 contre 20% pendant l'année 1, même si à la fin de l'expérimentation (300 jours normalisés), les pertes en matières sèches sont similaires pour les 2 années. Ce résultat confirme que les conditions favorables d'humidité en année 2 en début d'expérimentation ont favorisé la décomposition. D'autres travaux de décomposition dans les forêts (Hofer et al. 2004 ; Martius et al. 2004 ; Tripathi et al. 1992) ont montré la même influence des conditions d'humidité.

Au bout de 4 mois de décomposition, nous avons calculé une perte (attribuée à la minéralisation) de 20% d'N des feuilles marquées et une perte de 71 % de la quantité de ^{15}N . Cette différence dans la diminution de N et de ^{15}N des feuilles marquées, alors que la diminution de 20% correspond à celle observée sur les litterbags, suggère une hétérogénéité initiale du marquage ^{15}N dans les feuilles. Une forme plus mobile (^{15}N minéral) ou très facilement minéralisable (protéines), peut expliquer à la fois cette variation importante du ^{15}N du compartiment « feuille » et une perte possible par lessivage des feuilles ou par volatilisation. En outre, le faible marquage initial des feuilles peut entraîner une absence de sensibilité sur les mesures (Machet et al. 1987), et une difficulté à détecter du ^{15}N dans la plante et le sol en raison d'une forte dilution avec l'azote non marqué. Par ailleurs, nous avons recouvré environ la moitié du ^{15}N apporté (45 %) dans les compartiments sol + plante + feuilles. Les feuilles se sont décomposées à la surface du sol et ont été exposées aux

conditions de sécheresse et de plein air pendant la période d'étude. Ces conditions ont pu favoriser les pertes gazeuses par volatilisation comme l'ont discuté d'autres auteurs (Dejoux et al. 2000 ; Johnson et al. 2009), et combiné à une hétérogénéité du marquage initial, cela pourrait expliquer le faible recouvrement du ^{15}N .

Nous avons observé qu'au bout d'une année au champ, les feuilles de *Miscanthus* se décomposent lentement comparé par exemple aux résidus des grandes cultures comme le blé, le riz etc. (Ma et al. 1999 ; Ordonez-Fernandez et al. 2007 ; Yadvinder et al. 2010). Les feuilles sénescents de *Miscanthus* contiennent très peu de soluble et sont riches en lignine, cela explique la décomposition lente observée. En effet, nous avons par exemple vu que la teneur en lignine affecte négativement la décomposition en la ralentissant (Chapitre 2). En outre, ces feuilles contiennent très peu d'azote (0.5 %) et se décomposent donc à la surface du sol au champ, dans des conditions de faible disponibilité en azote pour les microorganismes. Or, il est connu qu'une faible disponibilité en azote peut ralentir les cinétiques de minéralisation du C au cours de la décomposition (Chapitre 3).

A même nombre de jours normalisés à 15°C (300 jours), 54 % de la matière sèche des feuilles est décomposée au champ contre 44% en conditions de laboratoire. Ceci apparaît contraire aux résultats attendus, parce que les incubations en conditions contrôlées visent à étudier la biodégradabilité en conditions potentielles (et plutôt optimales). En effet au laboratoire, les feuilles ont été coupées en fines particules et incubées dans des conditions d'humidité et de température constantes (Chapitre 2). Au champ, elles ont été confinées dans un litterbag et posées à la surface du sol. Dans le premier cas, l'accès aux particules de feuilles pour les microorganismes est facilité, ce qui devrait favoriser la décomposition (Yadvinder et al. 2010). Nous attribuons cette différence aux méthodes utilisées : au laboratoire, la décomposition est essentiellement le résultat de l'activité de la microflore (mesurée par la respiration), alors qu'au champ la décomposition (mesurée par la perte en masse des résidus)

est sous l'influence du climat (lessivage) et de ses variations, de la faune du sol et des microorganismes du sol (Cotrufo et al. 2010). Dans le présent travail, les mailles des litterbags sont larges (10 mm), cela favorise l'accès à une large communauté de décomposeurs. Cependant, il est aussi possible de perdre les fragments de feuilles entre le prélèvement au champ et le retour au laboratoire (Gartner et Cardon, 2004) mais nous excluons cette dernière hypothèse dans ce travail.

Une des hypothèses de ce travail était qu'une entrée de feuilles et une décomposition lente s'accompagnent d'une accumulation de feuilles au sol. Nous avons mesuré une perte en masse des feuilles du mulch de 22 % entre février 2010 et octobre 2010 alors que sur la même période nous avons observé une perte de 50 % de matière sèche des feuilles dans les litterbags. Cependant l'étude de l'accumulation des feuilles dans le mulch a été faite 3 à 4 ans après l'installation de la culture de Miscanthus, ce qui signifie qu'il y avait déjà des feuilles au sol au moment de la chute des nouvelles feuilles en février 2009. Par contre les litterbags sont posés directement sur le sol ce qui probablement accélère leur décomposition. La dynamique d'accumulation des feuilles du mulch a aussi été mise en évidence à travers les caractéristiques physiques (quantités, épaisseurs) et chimiques du mulch, et celles des particules de feuilles en contact avec le sol. Le mulch prélevé en hiver 2008 a les mêmes caractéristiques que celui prélevé en hiver 2009.

Au bout de 4 ans d'installation de la culture, la quantité de feuilles accumulée mesurée au champ atteint 7 t ha^{-1} . Ce résultat est confirmé par notre modèle STELLA qui simule l'accumulation des feuilles sur le long terme en fonction des entrées de feuilles annuelles et de leur constante de décomposition (k). Le modèle est simple, il ne tient compte que de la masse initiale et finale des stocks entrants et pas des variations qui surviennent au cours des cinétiques de décomposition. En outre, la phase d'établissement de la culture de Miscanthus

se traduit par une production initiale faible de feuilles sénescentes (inférieure à 3 t ha⁻¹ MS) qui n'est pas prise en compte par ce modèle.

Cependant, les variables (stocks de feuilles, constante k) utilisées pour paramétrer notre modèle sont issues de 2 années d'études indépendantes, c'est-à-dire après 2 et 3 ans d'installation de la culture. Cette approche a d'ailleurs été utilisée par Johnson et al. (2009) pour simuler au cours du temps les pertes d'azote dues aux feux de forêts dans les écosystèmes forestiers. Nous avons paramétré le modèle avec l'hypothèse que le compartiment de matière organique a la même constante de décomposition chaque année. La quantité des feuilles de mulch mesurée au bout de 5 ans d'installation de la culture confirme cette hypothèse puisque la valeur simulée se rapproche de celle mesurée. En outre, à long terme le modèle prédit une stabilisation de l'accumulation des feuilles au sol c'est-à-dire un équilibre entre la quantité entrant chaque année et la quantité décomposée. Ceci signifie que la décomposition alimente en composés plus récalcitrants la fraction plus fine de la matière organique particulaire (dans notre étude) puis le sol.

Ce mulch de feuilles protège le sol contre l'érosion, conserve l'humidité du sol et explique probablement l'absence de mauvaises herbes dans les parcelles âgées de Miscanthus. Plusieurs travaux sur les mulchs ont mis en évidence les mêmes propriétés (Byard et al. 1996 ; Cushman et al. 2005 ; Montagnini et al. 1993).

Conclusion

Du point de vue de l'impact de la culture de miscanthus sur le recyclage des matières organiques vers les sols (et ses conséquences sur la fertilité à moyen terme), ce travail a permis de quantifier et de caractériser des feuilles sénescentes qui se décomposent à la surface du sol (apport annuel). Nous montrons l'importance des feuilles de miscanthus, d'une part

quantitativement en tant qu'apport de MO au sol : une à deux tonnes de C par hectare sont recyclés annuellement dans le sol; d'autre part qualitativement : la faible décomposition observée en laboratoire est confirmée au champ, ce qui conduit à la formation d'un mulch assez important (en épaisseur et en masse) de feuilles en cours de décomposition à la surface du sol sous le couvert de Miscanthus. Au bout de 4 ans d'installation, notre modèle simule correctement l'accumulation du mulch observée au champ et prédit une stabilisation à partir de 4 ans et ce jusqu'à 10 ans. Nos mesures de mulch en cinquième année confirment cette prédiction. Il a été observé par ailleurs que ce mulch modifie les conditions environnementales et climatiques à l'interface sol-atmosphère, en favorisant le maintien de l'humidité et en limitant le réchauffement du sol. Ces modifications ont des effets significatifs sur l'émergence et la croissance initiale des tiges nouvelles (S. Cadoux, communication personnelle).

CHAPITRE 4

**Impact de la richesse en azote sur la dynamique microbienne
hétérotrophe au cours de la décomposition de feuilles de
miscanthus dans un sol**

Introduction

La biodégradation des litières végétales est un processus important qui contrôle le stockage du C dans les sols (Wardle, 2002). Elle est dépendante d'une part de la disponibilité en N du sol (apport sous forme de fertilisant azoté), et de l'azote contenu dans les résidus d'autre part (Fog, 1988 ; Knorr et al. 2005). La microflore hétérotrophe assimile simultanément le C et N pour ses besoins de croissance et de maintenance (Hungate et al. 2003 ; Sall et al. 2007), ce qui explique le couplage étroit de ces deux cycles au cours de la décomposition des matières organiques dans les sols.

Les dynamiques microbiennes ont été mises en évidence au cours de la décomposition des résidus végétaux en conditions de laboratoire (Bastian et al. 2009 ; McMahon et al. 2005) et de plein champ (Pascual et al. 2010). Baumann et al. (2009) montrent que ces dynamiques de populations microbiennes sont souvent liés au rapport C/N des résidus de récolte (~50-150) et à la disponibilité initiale en azote minéral du sol. En effet, chaque groupe microbien œuvre à maintenir son rapport C/N constant pendant la décomposition. Les besoins en N des bactéries (C/N~5-10) vont par exemple être relativement plus élevés que ceux des champignons (C/N~15-20). En conséquence on peut penser qu'en présence d'une forte disponibilité en N (sol + résidus) la croissance bactérienne est favorisée ; et inversement, en conditions de disponibilité en N (sol + résidus) faible, voire de limitation, la biomasse fongique s'installe majoritairement pour minéraliser le C des résidus de récolte.

Les études relatives aux effets de la disponibilité en N sur les dynamiques microbiennes du sol, sont cependant contradictoires (Hobbie, 2005). Certaines études (Boberg et al. 2008 ; Rousk et Baath, 2007) montrent qu'à court terme, les indicateurs de présence de la microflore fongique sont augmentés en conditions de forte disponibilité en N (sol + résidus), alors que d'autres (Entry, 2000 ; Leung et Pointing, 2002) montrent le contraire, à savoir, une

diminution relative de la microflore fongique par rapport à la microflore bactérienne. Cette contradiction s'étend aussi à court terme aux activités enzymatiques extracellulaires (cellulases et phénol oxydases) des microorganismes (Demoling et al. 2008 ; Frey et al. 2004 ; Hofmockel et al. 2007 ; Waldrop et al. 2004). Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées à court terme et souvent avec des substrats 'modèles' (glucose, cellulose, lignine, etc.).

Les effets de la disponibilité en N (sol + résidus) sur la minéralisation du C ne sont donc pas bien connus (Neff et al. 2002). Les travaux menés en laboratoire (Kastovska et al. 2010 ; Wang et al. 2004) et aux champs (Bowden et al. 2004) montrent qu'à court terme, une forte disponibilité en N (sol + résidus) accélère la minéralisation du C. A plus long terme, c'est la minéralisation du C dans les situations de limitation en N (faible disponibilité) qui est favorisée (Craine et al. 2007 ; Wang et al. 2004). A court terme, l'azote disponible satisfait la demande microbienne pendant la minéralisation de la fraction labile des résidus (C soluble) ce qui accélère leur décomposition (Berg et Matzner, 1997). A long terme, les composés récalcitrants des résidus et ceux formés après réaction avec l'azote minéral du sol (réaction de Maillard), ralentissent la décomposition à cause de leur faible dégradabilité.

Ces travaux à court terme, on aboutit à la proposition des niveaux de disponibilité en N qui correspondent à des conditions 'optimales' pour la minéralisation du C des résidus végétaux fraîchement ajoutés au sol. Dans les conditions 'optimales', la cinétique de minéralisation du C observée dépend seulement de la composition chimique des résidus en décomposition (Recous et al. 1995). Ce niveau 'optimal' d'azote représente entre 1.2 et 2% de la matière sèche totale (Nicolardot et al. 2001 ; Pinck et al. 1950 ; Recous et al. 1995). Selon ces auteurs, quand la richesse en N est inférieure au seuil de 1.2% MS, la minéralisation du C des résidus est ralentie à court terme. La disponibilité en N étant insuffisante pour assurer les besoins en

N de la microflore hétérotrophe. Cependant, très peu d'études ont testé cette hypothèse à plus long terme.

Miscanthus × *giganteus* est étudié en tant que culture à vocation énergétique en raison de sa forte production de matière sèche aérienne et de son faible besoin en fertilisant azoté (Heaton et al. 2008). Alors que la quantité de feuilles sénescentes qui tombent au sol est connue (Chapitre 3), la décomposition des feuilles de *Miscanthus* en conditions de faible disponibilité en N (sol + feuilles) dans un sol demeure inconnue. Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier le rôle de la disponibilité en N (feuilles + sol) sur les dynamiques microbiennes hétérotrophes et leur impact sur les cinétiques de minéralisation de C et N à long terme. Notre stratégie a consisté à créer des conditions artificielles de disponibilité en azote en faisant varier soit la quantité d'azote minéral apportée (4 mg N kg⁻¹ sol et 74 mg N kg⁻¹ sol) pour une même quantité de C dans le sol (traitements notés 2C), soit la quantité de C apportée pour une même quantité d'azote minéral du sol (4 mg N kg⁻¹ sol) (traitements 2C à 8C). Les hypothèses suivantes sont testées : i) à court terme, une forte disponibilité en N initial (sol+feuilles) accélère la minéralisation du C des feuilles, alors qu'à long terme, la décomposition est plutôt favorisée dans les conditions de faible disponibilité en N (limitation) ; ii) une augmentation de la limitation en N (sol + feuilles) favorise la biomasse fongique et ses activités enzymatiques associées.

Matériels et méthodes

Echantillonnage des feuilles sénescentes

Les feuilles sénescentes de *Miscanthus* ont été collectées sur le dispositif 'biomasse & énergie' mis en place en 2006 au Nord Est de la France (Estrées-Mons, Région Picardie, 49°80'N, 3°60'E). Ce dispositif comprend deux traitements azotés: le premier correspond à un apport d'azote annuel de 120 U ha⁻¹ (traitement 120N), le second à pas d'apport d'azote depuis l'implantation de la culture (traitement 0N). Les feuilles utilisées pour l'expérience décrite ci-dessous ont été prélevées dans les parcelles 0N. Entre l'automne 2008 et l'hiver 2009, les feuilles ont été ramassées périodiquement dans 3 placettes de 3.84 m² sur lesquelles un filet nylon de maille 1 cm × 1 cm avait été posé à la surface du sol afin d'éviter le contact entre les feuilles et le sol. Ces feuilles ont été mélangées en raison de l'absence de différences de teneur en azote pour chaque date de prélèvement puis séchées à 25°C pendant 1 semaine à l'étuve avant l'expérience d'incubation.

Incubation

Le sol issu du même site d'étude, a été prélevé sur une profondeur 0 - 10cm. Ce sol a été séché à l'air pendant 2 jours afin de ramener l'humidité à environ 120 mg g⁻¹ de sol sec, et tamisé à 2 mm. La majorité des débris végétaux restants ont été enlevés à la main après le tamisage du sol. Le sol ainsi préparé a été conservé et fermé dans des bacs plastiques à la température d'incubation (15°C) pendant 1 semaine avant l'incubation. La concentration initiale en azote minéral du sol était de 4 mg kg⁻¹ sol sec, et correspond au traitement N-. Un traitement supplémentaire a été réalisé dans lequel 70 mg N kg⁻¹ sol sec sous forme de KNO₃

ont été ajoutés 2 jours avant l'incubation : c'est le traitement N+. Ces traitements seront par la suite nommés 'limitant' N- et 'non limitant' N+. La concentration d'azote minéral ajoutée a été calculée pour que la vitesse de décomposition des résidus soit optimale (Henriksen et Breland 1999 ; Recous et al 1995). La solution concentrée d'azote (KNO₃) a été calculée pour obtenir une humidité du sol à -80 kPa de potentiel, ce qui correspond à une teneur en eau finale du sol de 185 g kg⁻¹ sol sec après l'application de la solution d'azote. L'humidité du traitement N- a été ajustée avec de l'eau déminéralisée.

Les feuilles de Miscanthus contenant 43% C et 0.5% N ont été coupées à la main en morceaux de taille d'environ 3 à 5 mm. Quatre traitements ont été préparés. D'une part les feuilles ont été apportées dans des pots en verre de 500 ml contenant 50 g de sol N-équivalents secs à raison de 2, 4 et 8 g C kg⁻¹ sol, ce qui correspond respectivement aux traitements 2CN-, 4CN- et 8CN-. La disponibilité en azote est calculée comme la quantité d'azote total apportée par les feuilles plus la quantité d'azote minéral disponible initialement dans le sol, et est exprimée par rapport à la matière sèche de résidu apporté. Ces trois traitements amendés correspondent à des disponibilités en N de 0.58%, 0.54% et 0.52% MS respectivement pour 2CN-, 4CN- et 8CN-. D'autre part un traitement supplémentaire 2CN+, a été réalisé par ajout de 2 g C kg⁻¹ dans 50 g de sol contenant 70 mg N kg⁻¹ sol sec sous forme de KNO₃, ce qui correspond à une disponibilité en azote de 2.1% MS.

Enfin des traitements 'témoins' sans ajout de feuilles ont aussi été réalisés: sans ajout d'azote minéral 0CN- et avec ajout d'azote minéral 0CN+. Tous les traitements ont ensuite été incubés à 15 °C pendant 417 jours. L'humidité du sol a été maintenue constante dans les fioles tout au long de l'incubation en les pesant chaque semaine et en ajoutant si nécessaire de l'eau déminéralisée.

Le C minéralisé (CO₂) a été mesuré à partir de 50 g de sol (équivalent poids sec) incubés dans des pots de verre de 500 ml et contenant un piège à CO₂ (15 ml NaOH). Trois répétitions par

traitements ont été réalisées. L'azote minéral du sol a été déterminé sur des échantillons de sols distincts correspondant à 30 g de sol (équivalent poids sec) placés dans des bocaux en verre de 2 litres (2L), avec 3 répétitions à chaque prélèvement et par traitement. Ces pots contenaient également un piège à CO₂ (40 ml de NaOH 1M) afin d'être dans les mêmes conditions atmosphériques que dans les pots de suivi de minéralisation du C, mais la concentration du CO₂ piégé dans la solution de NaOH n'a pas été dosée. L'humidité a aussi été maintenue constante dans ces pots de 2L tout au long de l'incubation. L'azote minéral a été extrait aux jours 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 184, et 252 par extraction avec une solution de KCl 1M (ratio sol:solution de 1:4).

La concentration de CO₂ piégée dans la solution de NaOH a été mesurée par colorimétrie en flux continu (Chaussod et al. 1986) en utilisant un analyseur automatique (TRAACS 2000, Bran et Luebbe). La minéralisation apparente (C minéralisé issu des feuilles) dans le sol a été calculée comme étant la différence entre la quantité de CO₂ mesuré dans le sol avec les feuilles et celle du sol non amendé (témoin). Nous faisons l'hypothèse que l'apport de résidus dans le sol ne provoque pas la minéralisation de la matière organique du sol (absence de 'priming effect') ou très faiblement, et si tel est le cas, ce 'priming effect' est similaire pour tous les traitements.

NO₃⁻ et NO₂⁻ ont été déterminés par colorimétrie à flux continu en utilisant une adaptation de la méthode proposée par Kamphake et al. (1967), NH₄⁺ a été déterminé selon la méthode décrite par Krom (1980). La minéralisation nette d'azote provoquée par la décomposition des feuilles dans le sol est calculée en réalisant deux différences, d'une part la différence à chaque date, entre la quantité de N minéral mesurée dans le sol avec les feuilles et celle du sol non amendé (témoin), et d'autre part en soustrayant la quantité initiale d'azote au temps 0. La minéralisation nette peut prendre des valeurs positives ou négatives.

Carbone microbien du sol

Le C microbien a été extrait en utilisant la méthode de fumigation extraction proposée par Vance et al. (1987). A chacune des dates de prélèvement suivantes : 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 184, et 252, 15g de sol équivalent poids sec de chaque pot de 500 ml (0CN-, 2CN-, 4CN-, 8CN-, 0CN+ et 2CN+) ont été prélevés après prélèvement de piège à CO₂ et directement mélangés avec une solution de K₂SO₄ 0.025M (ratio sol : solution, 1:4). Le mélange (sol + K₂SO₄) a été agité 40 tr min⁻¹ pendant 30 minutes, puis centrifugé 5000 tr min⁻¹ pendant 10 minutes à 20°C. Le surnageant recueilli est filtré (0.70 µm, filtre en fibre de verre Durieux n°28) et le filtrat est conservé à -20°C pour le dosage ultérieur du C microbien. Ils représentent les échantillons non fumigés.

Pour la fumigation, 15g de sol (équivalent poids sec) des mêmes traitements ont été placés sous atmosphère de chloroforme sous hotte pendant 18 heures à température ambiante. La fumigation s'arrête au bout de 18 heures et les échantillons de sol sont récupérés une fois tout le chloroforme piégé par l'azote liquide. Ces échantillons dits 'fumigés' sont ensuite traités de manière similaire aux échantillons non fumigés après réajustement de l'humidité des sols à l'eau distillée. Le C microbien des filtrats (fumigé et non fumigé) est dosé sur un analyseur TOC-O-Analytical 1010 et la quantité de C microbien exprimée en mg C kg⁻¹ sol est calculée comme étant la différence entre le C microbien des échantillons fumigés et celui des échantillons non fumigés, avec un coefficient K_{EC} = 0.38 (Vance et al. 1987) pour convertir la quantité de C extrait en quantité de C microbien. Nous avons calculé la respiration spécifique encore appelé quotient métabolique (qCO₂) de la biomasse microbienne comme le rapport entre la vitesse de minéralisation du C sur un temps t donné (exprimée par unité de temps) et la quantité de C microbien mesuré sur le même pas de temps (Anderson et Domsch, 2010 ; Raubuch et al. 2010).

Extraction et dosage de l'ergostérol

Le protocole utilisé est celui proposé par Gong et al. (2001). Quatre grammes de sol humide (18.5 %) de chaque traitement (3 répétitions par traitement et par date de prélèvement destructif) ont été conservés à -20°C avant l'extraction d'ergostérol. Cette quantité de sol a été introduite dans un flacon à scintillation contenant 2 g de billes de verre de diamètre 250- 300 µm et 2 g de billes de diamètre 1000 µm. Après l'addition de 6 ml de méthanol au mélange sol + billes de verre, le flacon à scintillation a été passé au vortex pendant 10 s et placé dans un vibro-broyeur (Retsch MM 2000, GmbH Germany) pour agitation dans l'obscurité et à température ambiante durant 15 min. Après agitation, une aliquote de 1.5 ml a été prélevée et transférée dans un tube de 2 ml puis centrifugée à 11000 tr min⁻¹ pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a été filtré (0.45µm PTFE) et le filtrat (1ml environ) transféré dans des flacons pour analyse HPLC.

L'ergostérol a été mesuré en utilisant un système Waters 2690 HPLC muni d'une colonne C 18 en phase inverse (Waters Spherisorb ODS-2 5µm, 250 mm × 4.6 mm) et d'un détecteur à UV réglé à 282 nm. La température de la colonne a été réglée à 30°C. Une élution en mode isocratique a été réalisée avec du méthanol (HPLC grade) à un débit de 1 ml min⁻¹. Le volume d'injection était de 30 µl, dans ces conditions le temps de rétention de l'ergostérol était de 10 minutes. L'ergostérol pur a été utilisé (pureté ≥ 95% ; Sigma Aldrich, Germany) pour réaliser la gamme d'étalonnage aux concentrations de 0.10, 0.25, 0.50, 1, 2, 5 µg ml⁻¹.

Activités enzymatiques

Aux dates de prélèvement 0, 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 184, et 252 une aliquote de 2 g de sol humide (18.5%) a été prélevée et conservée à -20°C pour analyses ultérieures. Cette quantité

de sol a été homogénéisée dans 250 ml de tampon acétate de sodium 50 mM pH 7 à l'aide d'un Ultra-Turrax (T25 IKA Labortechnik, Germany) pendant 3 minutes à 11000 tr min⁻¹ sous un bain de glace pour éviter l'échauffement. Des aliquotes de suspension de 15 ml ont été prélevées et conservées à -20°C jusqu'au dosage des activités enzymatiques.

Pour la mesure de l'activité laccase, une aliquote de 1 ml de suspension de sol a été mélangée à 0.5 ml de substrat ABTS dissout dans du tampon citrate-phosphate pH 5 (100 mM citrate, 200 mM phosphate). L'ensemble est incubé pendant 3 heures avant la mesure. L'activité a été mesurée en suivant l'oxydation de l'ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Spectronic, Hélios Gamma, England) (Baldrian et al. 2009). L'enzyme pure (EC 1.10.3.2) extraite de *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich) a été utilisée pour construire la gamme d'étalonnage aux concentrations de 0.01, 0.02, 0.05 et 1×10⁻³ UI ml⁻¹.

L'activité L-leucine aminopeptidase est réalisée en mélangeant 100 µl de suspension à 25 µl de substrat 7-AMC-Leucine 200 µM (7- amino-4-methylcoumarin-leucine) dissout dans du méthanol et de l'eau distillée. L'ensemble est incubé pendant 3 heures avant la mesure. L'activité a été mesurée en définissant 365 nm comme longueur d'onde d'excitation et 460 nm comme longueur d'onde d'émission. La réaction est détectée en suivant la fluorescence du 7-AMC à l'aide du spectrofluomètre (Spectro max, Gemini). La courbe d'étalonnage a été construite à l'aide du 7-AMC (Sigma Aldrich) pour les concentrations suivantes : 0.014, 0.028, 0.056, 0.14, 0.28 et 0.56×10⁻³ Unités de Fluorescence ml⁻¹.

Pour l'activité xylanase, une aliquote de 0.5 ml de suspension de sol a été mélangée à 0.5 ml de substrat RBB-Xylan (Remazol Brilliant Blue D-xylan, Fluka) dissout dans de l'eau distillée chaude (90°C) et refroidit à 4°C. Après 3 heures d'incubation, 2 ml d'éthanol sont rajoutés au mélange pour stopper la réaction. L'ensemble est passé rapidement au vortex et laissé au repos pendant 10 minutes. Après une centrifugation de l'ensemble à 5000 tours

pendant 5 minutes le surnageant est prélevé et la lecture se fait à 590 nm à l'aide du spectrophotomètre (Thermo Spectronic, Hélios Gamma, England). L'enzyme xylanase purifiée à partir de *Thermobacillus xylaniticus* (Debeire-Gosselin et al. 1992) a été utilisée pour construire la gamme d'étalonnage aux concentrations de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 et 0.05 UI ml⁻¹.

Analyses statistiques

L'effet de la disponibilité en azote sur les différentes variables est examiné à travers l'analyse de variance (ANOVA 1 facteur) suivi du test LSD de Fischer au seuil $P < 0.05$ quand la valeur de F est significative. La corrélation de Pearson est utilisée pour analyser les relations entre différentes variables utilisées. Le logiciel libre R 2.9.2 est utilisé pour traiter les données.

Résultats

Minéralisation du carbone

La minéralisation du C est présentée figure 1. Les sols 0CN+ et 0CN- ont des cinétiques identiques de minéralisation du C sur toute la période d'incubation (figure 1a). Après 417 jours, la minéralisation cumulée représente 110 ± 78 et 118 ± 80 mg C-CO₂ kg⁻¹ de sol sec et ces valeurs ne sont pas significativement différentes ($P < 0.05$).

En présence de feuilles, la minéralisation cumulée du C est 4 à 12 fois plus importante qu'avec les sols témoins ($P < 0.001$) (figure 1a). A même niveau de C apporté initialement, la vitesse de minéralisation du C de 2CN+ devient supérieure à celle de 2CN- à partir de 28 jours et reste forte jusqu'au jour 140. Ces vitesses ont représenté 6.08 ± 1.8 mg C kg⁻¹ jour⁻¹ pour 2CN+ contre 4.84 ± 1.3 mg C kg⁻¹ jour⁻¹ pour 2CN- sur la période 28-140 jours et les différences sont significatives ($P < 0.05$). Cette vitesse forte pour 2CN+ s'est traduite au jour 140 par une minéralisation cumulée du C de $36 \pm 2\%$ contre $31 \pm 1\%$ pour 2CN- ; ces différences étant significatives ($P < 0.05$) (figure 1b).

Ensuite à partir de 189 jours, la vitesse de minéralisation du C de 2CN- (2.22 ± 0.34 mg C kg⁻¹ jour⁻¹) est devenue supérieure à celle de 2CN+ (1.37 ± 0.24 mg C kg⁻¹ jour⁻¹). Cela s'est traduit par une quantité de CO₂ totale émise identique pour les 2 traitements au jour 300, puis par un léger dépassement de la cinétique 2CN+ par celle de 2CN-, mais ces différences ne sont pas significatives.

La quantité de C-CO₂ minéralisée est d'autant plus importante que la quantité de C apportée est élevée avec $8CN- > 4CN- > 2CN- > 0CN-$ ($P < 0.001$). Au bout de 417 jours, la minéralisation cumulée du C représente $51 \pm 2\%$, $42 \pm 1\%$ et $41 \pm 2\%$ du C apporté pour les

traitements 2CN-, 4CN- et 8CN-, 4CN- et 8CN- n'étant pas significativement différents ($P < 0.05$) (figure 1b).

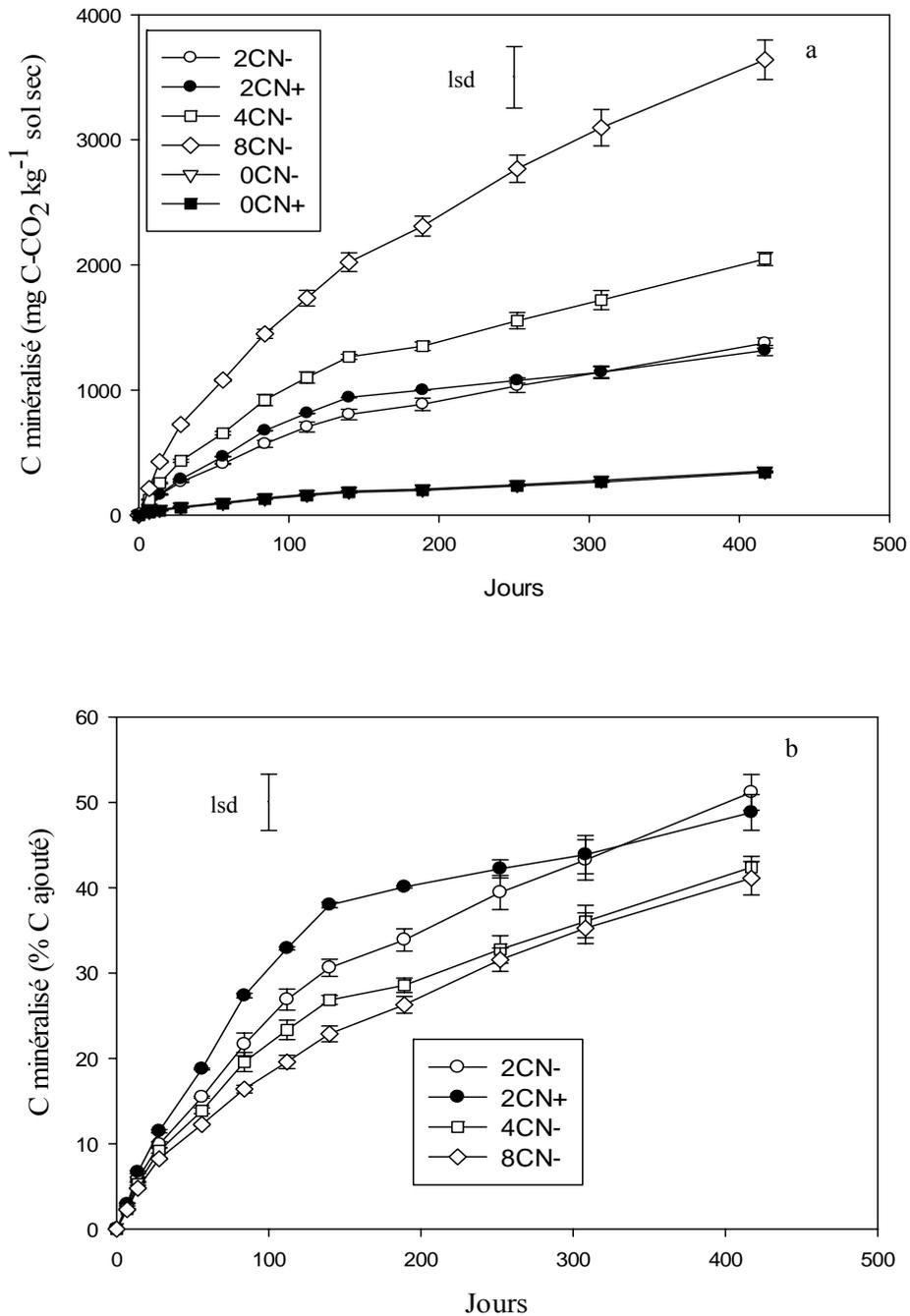


Figure 1. Cinétique de minéralisation cumulée du C pour les sols amendés (2C, 4C et 8C) ou non (0C). (a) Minéralisation exprimée en $\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ sol}$ et (b) minéralisation apparente exprimée en % de C ajouté sous forme de feuilles. Les sols N- et N+ contenaient respectivement 4 et 74 mg N kg^{-1} .

Dynamique de N minéral du sol

Les quantités d'azote minéral dans les sols et la minéralisation nette d'azote sont présentées en figure 2 pour tous les traitements. L'évolution de la quantité d'azote minéral dans les traitements témoins est continue et quasi linéaire dans le temps (figure 2a). Au bout de 252 jours d'incubation, la minéralisation nette calculée pour ces deux traitements représente 19 ± 0.31 mg N kg⁻¹ sol pour 0CN- et 22 ± 2 mg N kg⁻¹ sol pour 0CN+. Cette différence n'est pas significative.

L'apport de C par les feuilles entraîne une diminution de l'azote minéral du sol (figure 2a). En effet, la quantité d'azote minéral passe de 80 à 37 mg N kg⁻¹ sol entre 0 et 84 jours pour 2CN+, alors que les quantités initialement faibles d'azote minéral du sol disparaissent plutôt (0-28 jours) pour 2CN-, 4CN- et 8CN-. Ensuite, on observe une phase d'accumulation d'azote minéral du jour 112 au jour 252 pour 2CN+, et une très faible accumulation d'azote minéral du jour 56 au jour 252 pour 2CN-. Cette accumulation est quasiment nulle pour 4CN- et 8CN-. La minéralisation nette de l'azote exprime le bilan entre la quantité d'azote minéralisé (sol + résidus) et la quantité d'azote organisé sur la même période de temps, c'est-à-dire la quantité d'azote minéral assimilée par la biomasse microbienne du sol (figure 2b). On observe que cette minéralisation nette prend des valeurs négatives pour tous les traitements avec feuilles (c'est-à-dire qu'on observe une organisation de l'azote) et décroissent régulièrement au cours de l'incubation et que les valeurs sont proches pour les traitements 2CN-, 4CN- et 8CN- au jour 252. L'organisation nette représente donc 18 ± 0.3 mg N kg⁻¹ pour 2CN-, 19 ± 0.3 mg N kg⁻¹ sol pour 4CN- et de 20 ± 0.2 mg N kg⁻¹ sol pour 8CN-.

Dans le traitement 2CN+, on observe une très forte et rapide décroissance jusqu'au jour 84, avec un maximum d'organisation nette de 44 ± 2.3 mg N kg⁻¹ sol. On observe ensuite une

phase d'inversion de cette courbe, correspondant à une re-minéralisation de l'azote organisé, qui produit à une minéralisation nette de $+7 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$ entre 84 et 252 jours.

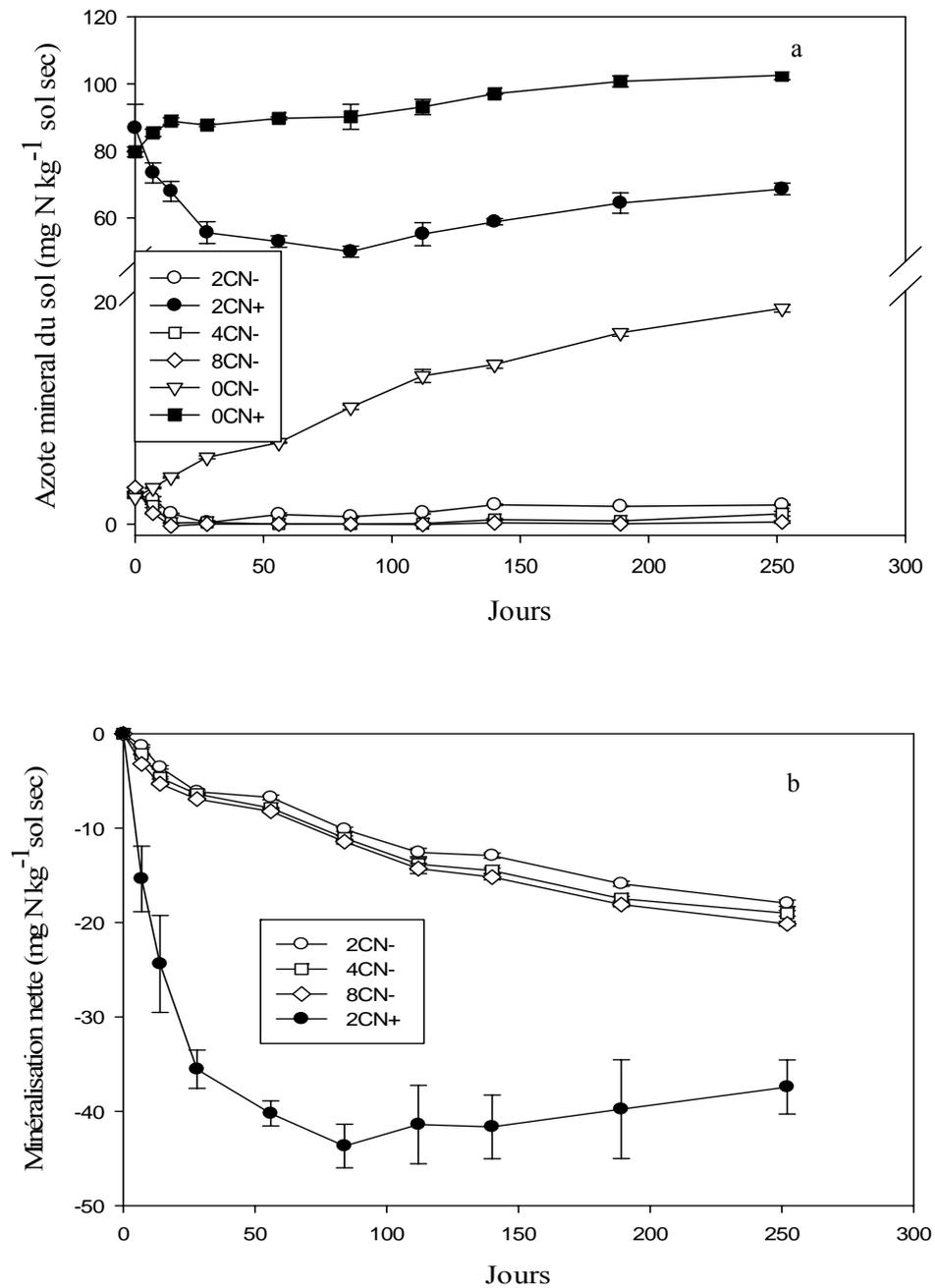


Figure 2. (a) Evolution de l'azote minéral du sol et (b) minéralisation nette de l'azote avec ajout de C (2C, 4Cg, 8C) et sans ajout de C (0C) dans les sols N- et N+ contenant initialement 4 et $74 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ sol sec}$.

Carbone microbien (C mic) et quotient métabolique (qCO₂)

Le carbone microbien (C microbien) représentait initialement 219 et 225 mg C kg⁻¹ sol sec pour les sols N⁻ et N⁺. Il est resté stable tout au long de l'incubation pour les traitements 0CN⁻ et 0CN⁺ (figure 3a). L'ajout de C conduit à une augmentation de 20 à 30 % du C microbien par rapport aux témoins ($P < 0.001$). A même niveau de C apporté, la quantité de C microbien est augmentée de 20% pour 2CN⁺ comparée à 2CN⁻ ($P < 0.001$) entre 0 et 140 jours. A partir du jour 184, il n'y a plus de différences entre 2CN⁺ et 2CN⁻ (figure 3a).

Après apport de doses successives de C, on observe un pic de C microbien entre 0 et 7 jours pour 2CN⁻ (287±20 mg C kg⁻¹ sol sec). Après 7 jours d'incubation, le niveau de C microbien de 2CN⁻ baisse progressivement pour atteindre son niveau initial au jour 184. Pour 4CN⁻ et 8CN⁻, les pics de C microbien interviennent au bout de 28 jours d'incubation et représentent respectivement 307±16 mg C kg⁻¹ sol sec et 332±39 mg C kg⁻¹ sol sec. Ensuite, le niveau de C microbien de 4CN⁻ reste quasiment stable du jour 28 au jour 84, puis baisse lentement pour atteindre le niveau de 2CN⁻ au jour 252. En revanche, le C microbien du traitement 8CN⁻ est quasiment stable jusqu'au jour 252.

Lorsque l'on exprime la quantité de C microbien par unité de C apporté, pour chaque traitement (figure 3b), les quantités maximales de C microbien sont obtenues au bout de 7 jours d'incubation pour les trois traitements 2CN⁻, 4CN⁻ et 8CN⁻. Ensuite ces niveaux restent constants jusqu'au jour 114, puis reviennent quasiment à leur niveau initial entre les jours 184 et 250. Pour 2CN⁺, la quantité maximale de C microbien (77 ± 30 mg g⁻¹ C apporté) est mesurée au jour 28. Au delà, la quantité de C microbien diminue progressivement pour atteindre celle des traitements 2CN⁻, 4CN⁻ et 8CN⁻ (figure 3b).

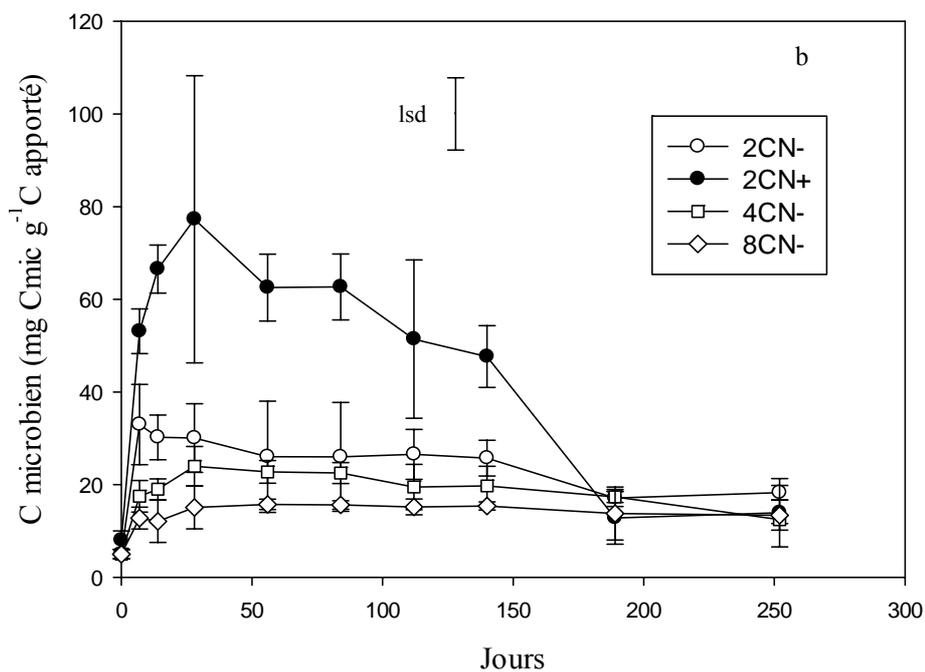
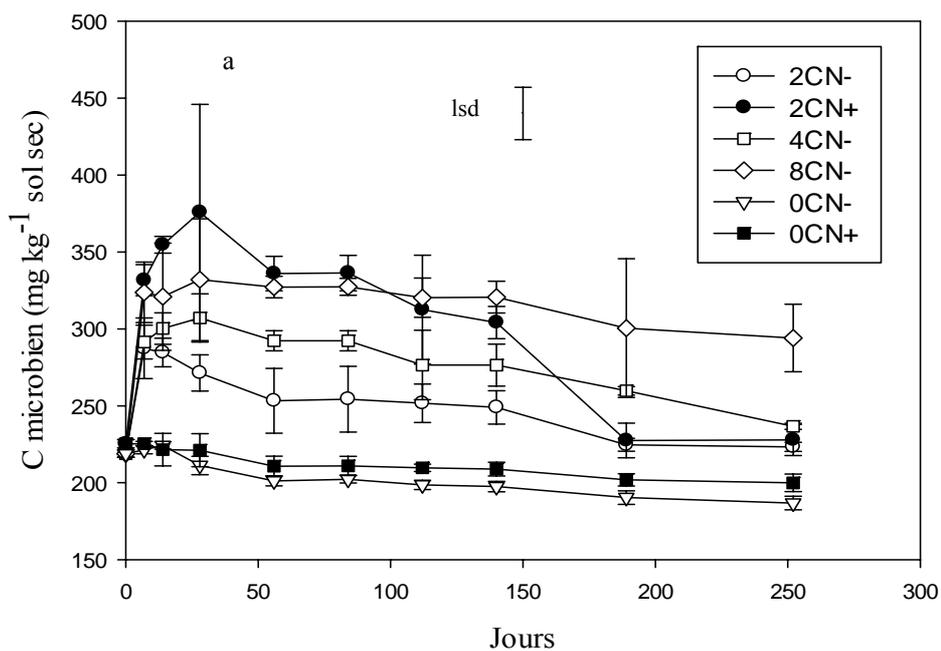


Figure 3. (a) Evolution au cours du temps du C microbien (en mg kg^{-1} de sol sec) dans le sol après ajout de C (2C, 4C et 8C) ou non (0C). (b) Evolution au cours du temps du C microbien (en $\text{mg kg}^{-1} \text{ g C}^{-1}$) pour 2C, 4C et 8C, ces valeurs sont obtenues par différence entre les sols avec apport de C et ceux sans apport de C. Les sols N- et N+ contenaient initialement 4 et 74 mg N kg^{-1} sol sec.

Les résultats du quotient métabolique (respiration spécifique) de la biomasse microbienne sont représentés sur la figure 4 (figure 4a). On observe que le qCO_2 reste faible et stable sur toute la période d'incubation pour 0CN- et 0CN+. Ce quotient a une valeur maximale au jour 14 pour tous les traitements amendés et cette valeur est croissante avec la quantité de C apportée : 0.34 ± 0.10 mg C- CO_2 mg⁻¹ C microbien jour⁻¹ pour 8CN-, 0.22 ± 0.04 pour 4CN-, 0.15 ± 0.03 mg pour 2CN- ; cette différence est significative ($P < 0.05$).

A même niveau de C apporté dans le sol (2C), on observe au jour 14, un qCO_2 de 0.08 ± 0.01 mg CO_2 mg⁻¹ C microbien jour⁻¹ pour le traitement 2CN+, et la différence avec 2CN- est significative ($P < 0.05$). Après 14 jours d'incubation, le qCO_2 diminue fortement pour 4CN- et 8CN- et rejoignent ceux des traitements 2CN- et 2CN+ au jour 250. Les différences ne sont plus significatives à partir du jour 56 pour les trois doses de C apportées (N-) et à partir du jour 184 avec le traitement N+ (figure 4a).

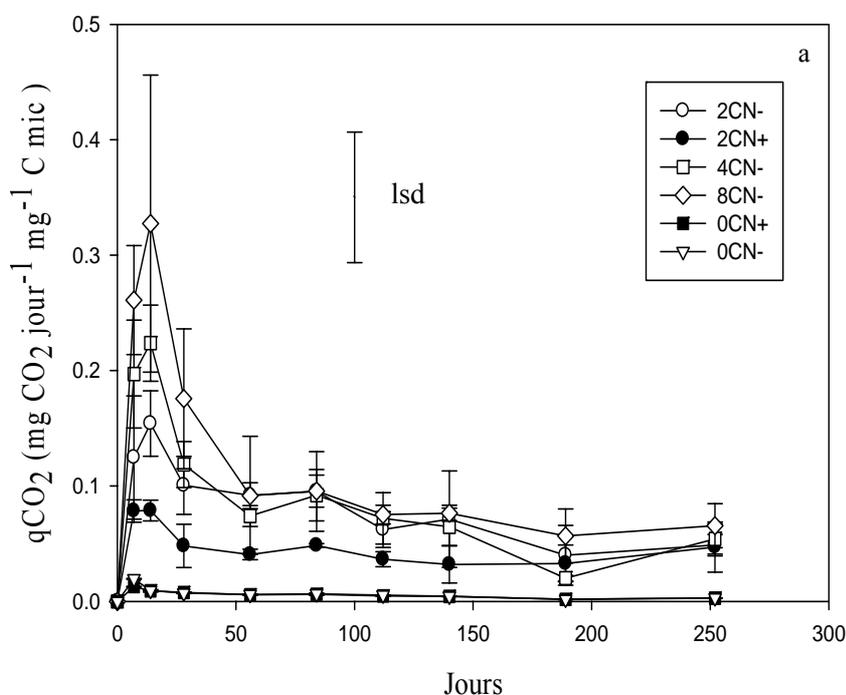


Figure 4. Evolution de l'activité spécifique au cours du temps après ajout de C (2C, 4C et 8C) ou non (0C) dans les sols N- et N+ contenant initialement 4 et 74 mg N minéral kg⁻¹ sol sec.

Ergostérol

Les teneurs en ergostérol, traceur de la biomasse fongique, sont similaires pour 0CN+ et 0CN- (figure 5a). On observe dans ces traitements au cours des 28 premiers jours une légère augmentation d'ergostérol qui reste constante jusqu'au jour 114, puis revient au niveau initial, cela jusqu'au jour 252.

L'apport de C dans les sols (2CN+, 2CN-, 4CN- et 8CN-) entraîne une augmentation significative ($P < 0.001$) de la teneur en ergostérol comprise entre 75 et 90 % par rapport aux traitements non amendés (0CN+ et 0CN-). Pour 2CN+, on observe entre 0 et 84 jours une augmentation de 28 % ($P < 0.05$) d'ergostérol par rapport à 2CN- (figure 5a). Entre 112 et 252 jours il n'y a plus de différence (figure 5a).

L'apport croissant de C organique (2CN- vs. 4CN- vs. 8CN-) induit des différences significatives d'ergostérol ($P < 0.001$) (figure 5a). On observe un pic d'ergostérol au jour 28 pour 4CN-, alors que le pic maximal d'ergostérol intervient au jour 84 pour 8CN-. Ensuite, on observe une baisse d'ergostérol de ces traitements jusqu'au jour 252, sans toutefois revenir aux niveaux initiaux.

Lorsque cette teneur en ergostérol est exprimée par unité de C apporté, nous observons au jour 28 un pic d'ergostérol équivalent à $2 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1} \text{C}$ pour 2CN+, alors que les quantités maximales d'ergostérol apparaissent au jour 56 pour 2CN- ($1.3 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1} \text{C}$). Pour 4CN- le pic d'ergostérol ($1 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1} \text{C}$) intervient plutôt (28 jours), alors qu'il intervient au jour 84 pour 8CN- ($0.91 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1} \text{C}$) (figure 5b). Après avoir atteint un maximum, les niveaux d'ergostérol diminuent pour tous les traitements et se rejoignent au jour 114, puis restent quasiment similaires jusqu'au jour 252.

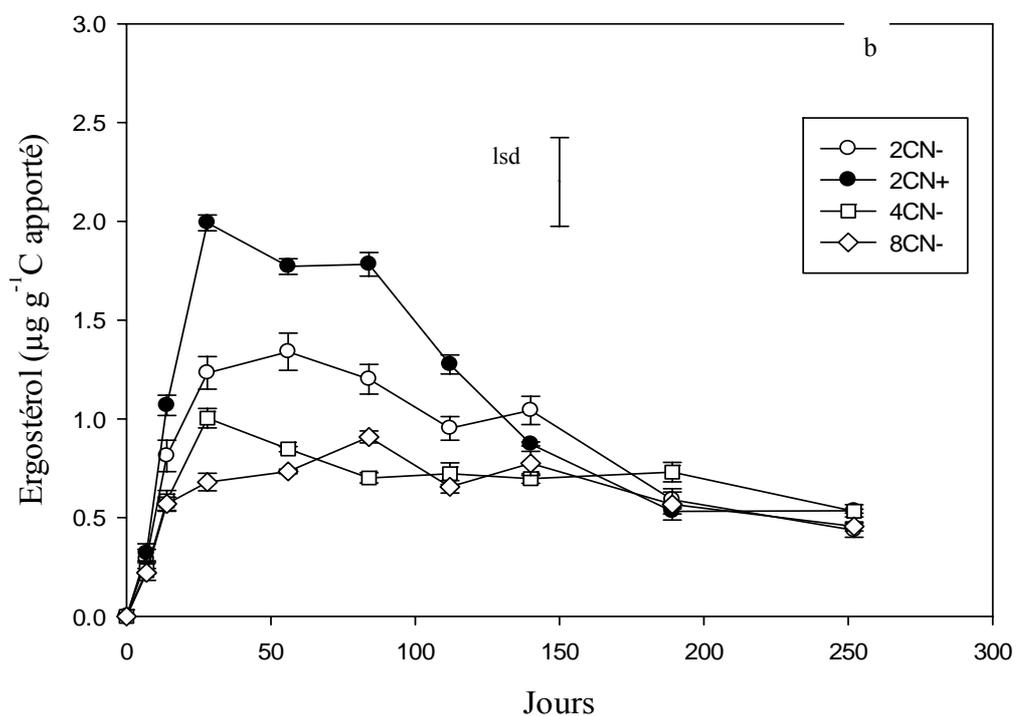
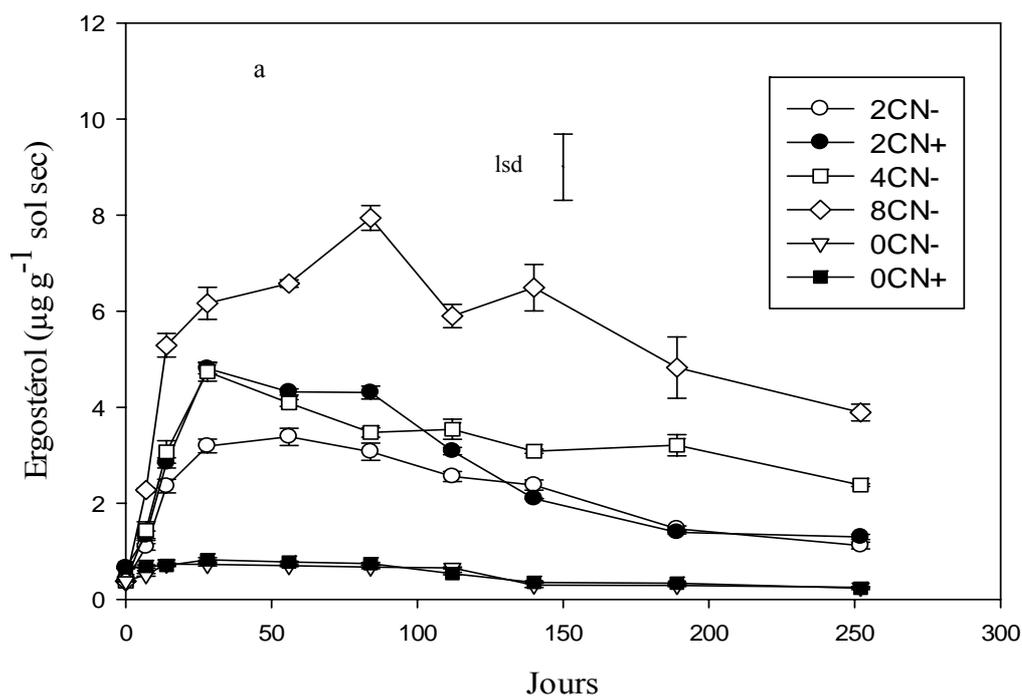


Figure 5. Evolution au cours du temps de la teneur en ergostérol des sols pour les traitements 0CN-, 0CN+, 2CN+, 2CN-, 4CN- et 8CN-. (a) Quantités d'ergostérol mesurées dans les différents traitements au cours du temps. (b) Effet net de l'apport de C sur l'évolution de la teneur en ergostérol. Ces valeurs sont obtenues par différence entre les sols avec apport de C et ceux sans apport de C.

Le rapport ergostérol/C microbien atteint une valeur maximale au jour 14 pour 8CN-, alors qu'il est maximal au jour 28 pour 2CN-, 4CN- et 2CN+. Ce rapport est fort ($P < 0.05$) avec la dose maximale de C apportée (8C) entre 0 et 14 jours. Le rapport ergostérol/C microbien reste constant du jour 28 jusqu'au jour 140 pour 2CN-, alors qu'il baisse fortement sur la même période pour 2CN+. Cette différence est significative au jour 140. A partir de 184 jours, le rapport ergostérol/C microbien de 2CN- baisse alors qu'on observe le phénomène inverse pour 2CN+.

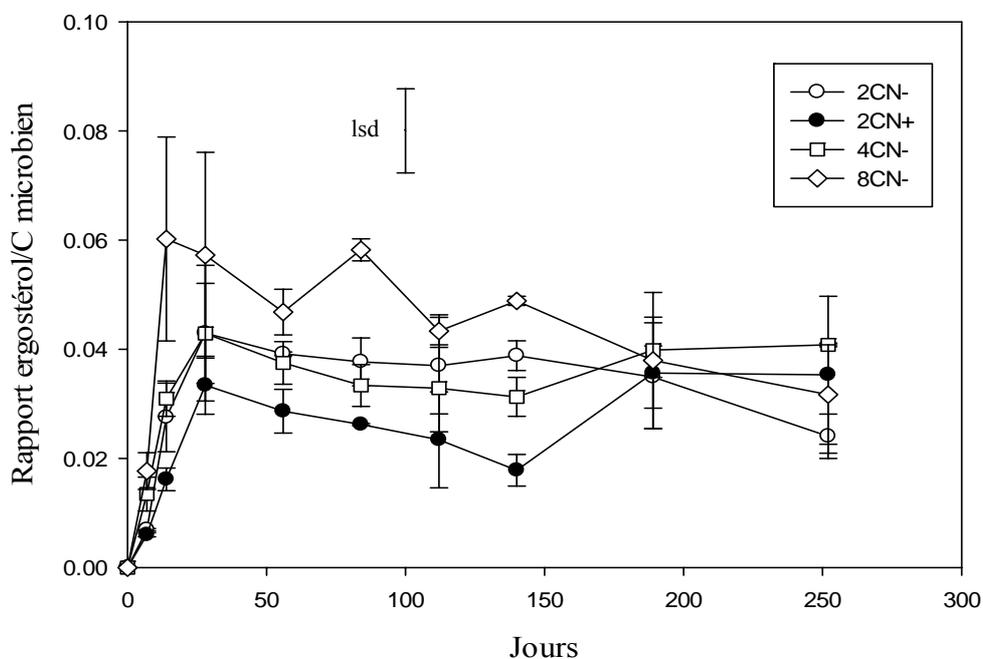


Figure 6. Evolution du rapport ergostérol/C microbien au cours du temps après ajout de C (2C, 4C et 8C) dans les sols N- et N+ contenant respectivement 4 et 74 mg N minéral kg⁻¹. Ces valeurs sont obtenues par différence entre les sols avec apport de C et ceux sans apport de C.

Activité laccase et rapport laccase/ergostérol

L'activité laccase présente dans 0CN- est supérieure à celle de 0CN+ en début de cinétique, et cette différence est significative aux dates 7, 14 et 28 jours ($P < 0.05$) (figure 7a).

L'apport de C dans le sol stimule l'activité laccase qui est maximale les 28 premiers jours puis décline rapidement entre 28 et 114 jours pour tous les traitements (figure 7a). A même niveau de C apporté (2C), l'apport de N minéral dans le sol provoque une diminution significative ($P < 0.001$) de l'activité laccase. Cela se traduit par une faible quantité d'activité laccase pour 2CN+ comparée à celle de 2CN- tout au long de l'incubation et cette différence est significative de 14 à 84 jours.

Les apports croissants de C (2CN-, 4CN-, 8CN-) augmentent de façon significative ($P < 0.001$) l'activité laccase au cours des 28 premiers jours notamment pour 8CN-. Cette activité décline fortement jusqu'au jour 114, puis reste constante jusqu'au jour 252 ; 4CN- et 8CN- restant similaires tout au long de cette période (figure 7a).

Le rapport laccase/ergostérol exprime la variation relative de la biomasse fongique (dont la présence est analysée via des mesures d'ergostérol) par rapport à la production d'enzymes de type laccase (figure 7b). L'effet net de l'apport de C, estimé après soustraction des valeurs obtenues dans les sols des traitements témoins 0CN+ et 0CN-, montre une diminution forte du rapport laccase/ergostérol entre 0 et 28 jours pour tous les traitements (figure 7b). Ce rapport baisse continuellement entre 0 et 114 jours pour 2CN+, puis augmente légèrement jusqu'au jour 252. Pour 2CN-, on observe une chute forte du rapport laccase/ergostérol entre 0 et 56 jours, puis une augmentation ($P < 0.001$) entre 28 et 56 ; entre 56 et 140 jours, le rapport laccase/ergostérol diminue à nouveau, puis reste constant jusqu'au jour 252. Les traitements 4CN- et 8CN- présentent une évolution du rapport laccase/ergostérol quasiment similaire à celle de 2CN-.

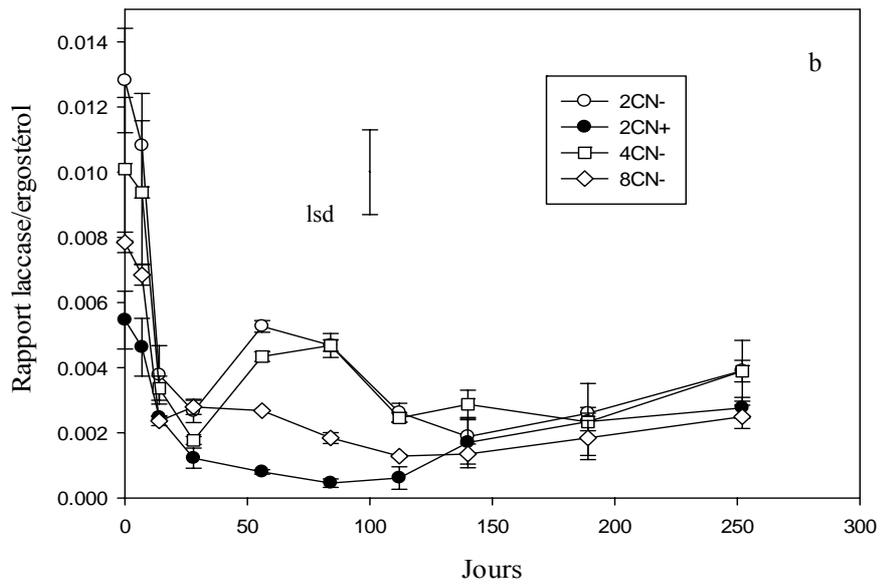
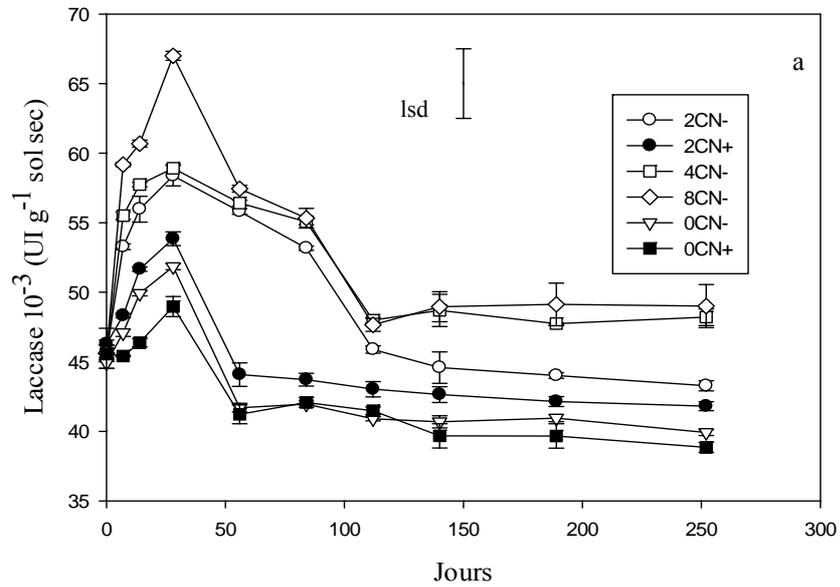


Figure 7. (a) Evolution au cours du temps de l'activité laccase dans les sols N- et N+ incubés sans (0C) et avec du C. (b) Evolution au cours du temps du rapport net laccase excretée sur ergostérol pour les traitements amendés (2C, 4C, 8C).

Activités L-leucine amino peptidase et xylanase

L'activité Leucine Amino Peptidase (LAP) est identique dans les sols témoins, indépendamment du traitement azoté (figure 8a). Elle augmente au cours des 56 premiers jours puis reste constante entre 56 et 252 jours. L'apport de C provoque une augmentation d'activité LAP et, à même quantité de C apportée, cette activité est plus forte pour 2CN+ que pour 2CN- (figure 8a). L'évolution au cours du temps de l'activité LAP est quasiment parallèle pour ces 2 traitements, mais reste significativement supérieure pour 2CN+.

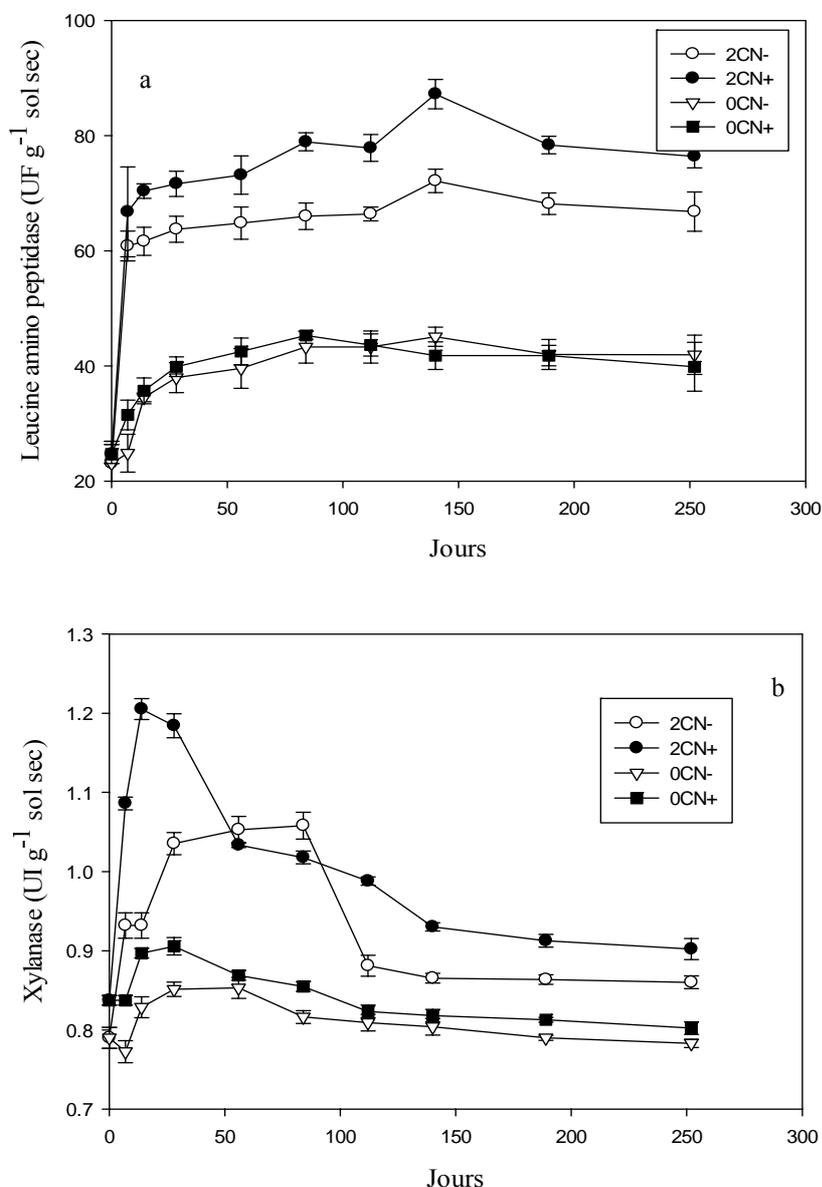


Figure 8. (a) Evolution de l'activité LAP et (b) l'activité xylanase dans un sol incubé sans (0C) et avec du C (2C). Les sols N- et N+ contenaient respectivement 4 et 74 mg N minéral kg⁻¹.

L'activité xylanase est stimulée au cours des 28 premiers jours dans les traitements témoins avec des valeurs légèrement mais significativement supérieures ($P < 0.05$) pour 0CN+ comparé à 0CN- (figure 8b). Après 252 jours d'incubation, ces deux traitements ne présentent plus de différence significative.

L'apport de C provoque une augmentation importante de l'activité xylanase et cette augmentation est plus forte ($P < 0.001$) pour 2CN+ (figure 8b). L'évolution au cours du temps de l'activité xylanase est différente pour 2CN+ et 2CN-. On observe un pic d'activité entre 0 et 14 jours suivi d'une diminution lente et progressive de l'activité située entre 28 et 252 jours pour 2CN+. Concernant 2CN-, l'activité xylanase atteint son maximum à 84 jours, puis cette activité diminue jusqu'au jour 252 (figure 8b).

Corrélations entre minéralisation du C, le C microbien et l'activité laccase

A très court terme (0-28 jours), les teneurs en ergostérol sont positivement et significativement corrélées à la minéralisation du C (C-min) dans tous les traitements (tableau 1a). L'activité laccase est négativement corrélée à la minéralisation cumulée du C seulement pour le traitement 4CN- et positivement corrélée à cette même variable pour 8CN-. Seuls ces traitements présentent des corrélations entre la teneur en ergostérol et l'activité laccase, $r = -0.91$, $P < 0.001$ pour 4CN- et $r = 0.89$, $P < 0.001$ pour 8CN-.

A moyen terme (56-112 jours), la teneur en ergostérol est toujours positivement corrélée à la minéralisation du C, mais les corrélations sont moins fortes que celles obtenues à très court terme (tableaux 1b et 1a). L'activité laccase est corrélée à la minéralisation du C et cette relation est forte pour les traitements 2CN- ($r = -0.93$ $P < 0.001$), 4CN- (0.88 $P < 0.001$) et 8CN- (0.92 $P < 0.001$). Seul le traitement 2CN- présente une corrélation négative ($r = -0.93$ $P < 0.001$) entre la biomasse fongique et l'activité laccase à ce stade de décomposition.

A long terme (140-252 jours) (tableau 1c), la teneur en ergostérol reste corrélée à la minéralisation du C pour tous les traitements. Le C microbien apparaît comme positivement et significativement corrélé à la teneur en ergostérol dans les traitements 2CN+ et 2CN-.

0-28 jours (a)												
	2CN+			2CN-			4CN-			8CN-		
	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac
C-min		0.99 ***			0.97 ***		0.69 *	0.99 ***	-0.90 ***		0.92 ***	0.73 *
Cmic							0.68 *	-0.73 **				
Ergo									-0.91 ***		0.89 ***	

56-112 jours (b)												
	2CN+			2CN-			4CN-			8CN-		
	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac
C-min		- 0.78 *	- 0.74 *		- 0.81 **	-0.93 ***		- 0.74 *	- 0.88 **		- 0.78 *	- 0.92 ***
Cmic												
Ergo						0.93 ***						

140-252 jours (c)												
	2CN+			2CN-			4CN-			8CN-		
	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac	Cmic	Ergo	Lac
C-min	-0.73 *	-0.80 *		-0.78 *			-0.74 *	-0.84 **		-0.88 ***		
Cmic		0.96 ***			0.82 **							
Ergo												

Tableaux 1a, b et c. Coefficient de corrélation de Pearson (r) entre le taux cumulé de minéralisation du C, le C microbien, l'ergostérol et l'activité laccase pour les traitements 2CN+, 2CN-, 4CN- et 8CN- au cours des pas de temps 0-28, 56-114 et 140-252 jours. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ et *** $p < 0.001$.

Discussion

Effet de la disponibilité en azote minéral du sol sur la décomposition de la MO humifiée

En l'absence d'apport de matière organique fraîche dans le sol, la vitesse de minéralisation du C de l'humus est faible et n'est pas modifiée par l'apport d'azote minéral. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature (Recous et al. 1995; Henriksen et Breland 1999 ; Allison et al. 2010) qui montrent aussi un effet non significatif de l'apport d'azote minéral sur la décomposition de l'humus. D'autres travaux (Dalmonech et al. 2010) ont souvent montré une augmentation de la minéralisation du C de l'humus suite à une fertilisation azotée. Ces études ont été réalisées sur des sols forestiers qui d'une part sont très pauvres en N (Geisseler et al. 2010), d'autre part les sols forestiers contiennent des débris de feuilles qui sont susceptibles d'être rapidement décomposés en présence d'une forte disponibilité en azote.

Il n'ya pas eu d'effet de la disponibilité en azote minéral sur la 'minéralisation nette' de l'azote du sol, la vitesse de minéralisation du C de l'humus étant lente, les besoins en N des microorganismes se sont avérés faibles. Nous montrons en effet que 19 mg N kg⁻¹ sol sont suffisants à la microflore hétérotrophe pour minéraliser ~110 mg C kg⁻¹ de l'humus du sol, les quantités finales de C minéralisé étant quasiment équivalentes entre 0CN- et 0CN+. Le rapport C/N de l'humus étant du même ordre de grandeur (C/N~ 8-11) que la microflore hétérotrophe (Nicolardot et al. 1997), la minéralisation du C de l'humus entraîne au cours une accumulation de l'azote minéral dans le sol comme montré dans d'autres travaux (Dalmonech et al. 2010).

Dans les sols à faible disponibilité en C organique, il est crucial pour les microorganismes de réguler leur croissance et la synthèse des enzymes (Geisseler et al. 2010). Dans notre étude, les niveaux de C microbien, de quotient métabolique (qCO₂) et d'ergostérol sont restés faibles

et constants tout au long de l'incubation. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a probablement pas eu de modification des communautés microbiennes en place (Dalmonech et al. 2010 ; Rousk et Baath, 2007). Sur toute la durée d'incubation, l'expression des activités laccase, xylanase et leucine amino-peptidase impliquées dans le recyclage du C et N, est restée présente et quasiment équivalente entre 0CN- et 0CN+. Ce résultat montre que les microorganismes du sol n'ont pas besoin de matière organique fraîche (Nazareth et Sampy, 2003) ni d'une forte disponibilité en azote minéral dans le sol pour produire ces enzymes : ce sont donc des enzymes constitutives, car produites de façon continue par les microorganismes du sol. Cependant, une teneur en azote minéral plus forte dans le sol (0CN+) a réduit l'activité laccase, et cela confirme l'hypothèse développée par Fog (1988) selon laquelle l'azote minéral peut réprimer l'expression des enzymes de type phénol oxydase comme la laccase impliquées dans la décomposition des composés récalcitrants de la matière organique des sols.

Effet de l'apport d'azote minéral sur la décomposition des feuilles à même niveau de C apporté

La première hypothèse de ce travail était qu'une disponibilité optimale en N minéral accélère la minéralisation du C à court terme, alors qu'à long terme, ce sont des conditions de faible disponibilité voire de limitation en N qui favorisent la décomposition de la matière organique apportée. Dans la littérature, des niveaux de disponibilité en N (sol + résidus) non 'limitants' pour la décomposition de résidus végétaux ont été définis à 1.2 - 2% MS. A ces seuils de richesse en azote, seules les caractéristiques chimiques des résidus contrôleraient leur biodégradation, pour des conditions environnementales données (température, humidité) (Nicolardot et al. 2001 ; Pinck et al. 1950 ; Recous et al.1995). En adoptant ce mode de calcul, nos traitements sans ajout d'azote minéral représentent une quantité d'azote (azote minéral du

sol + azote total du résidu) disponible équivalente à 0.58% MS pour 2CN-, 0.54% pour 4CN- et 0.52% pour 8CN-. Ils peuvent donc a priori être considérés comme ‘limitants’ en N pour la décomposition des feuilles apportées. On constate néanmoins que faire varier la quantité de carbone apporté (de 2C à 8C par kg de sol) fait peu varier la richesse relative en azote (0.52 à 0.58% MS). Par contre, le traitement 2CN+ représente une quantité d’azote disponible de 2.1% MS et peut donc être considérée comme ‘non limitant’ si l’on se réfère à la littérature mentionnée précédemment.

A court terme, on pouvait donc prévoir qu’à même niveau de C apporté dans le sol, la minéralisation du C issu du traitement 2CN+ serait accélérée par rapport à celle du traitement 2CN-. Nos résultats confirment cette hypothèse, la vitesse de minéralisation du C de 2CN+ est de 20% supérieure à celle de 2CN- à partir de 28 jours et ce jusqu’au jour 140.

Sur la période 28 à 140 jours, nous montrons que l’azote organisé par unité de C minéralisé baisse avec une intensité qui dépend de l’azote initiale du sol. En effet, l’organisation microbienne par unité de C minéralisé passe de 143 mg N g⁻¹ C à 53 mg N g⁻¹ C pour 2CN+ contre une transition de 30 mg N g⁻¹ C à 23 mg N g⁻¹ C observée pour 2CN-. Recous et al. (1995) ont obtenus des résultats similaires lors de l’étude de la décomposition des pailles de maïs sous différents niveaux d’azote. Ces auteurs ont conclu comme d’ailleurs d’autres (Ding et al. 2010 ; McFarland et al. 2002) qu’il y a une forte demande en azote de la part de la microflore hétérotrophe pendant la minéralisation de la fraction labile (C soluble) des feuilles.

A partir de 189 jours, la vitesse de minéralisation du C de 2CN+ chute. Au jour 300 la courbe cumulée de minéralisation du C de 2CN- rejoint celle de 2CN+. En effet, la minéralisation rapide du C conduit à un épuisement du substrat facilement dégradable pour 2CN+ alors que pour 2CN-, la décomposition est initialement plus lente puis se poursuit de façon plus stable. Deux explications sont possibles : soit la proportion de substrat plus facilement dégradable

persiste plus longtemps, soit la microflore hétérotrophe est dès le départ mieux adaptée à la dégradation de substrat en conditions limitantes en N. Cependant, il semble raisonnable de considérer qu'à 300 jours, le C restant dans les 2 traitements est de même nature (récalcitrant) et qu'il est colonisé par un même groupe de population microbienne. Les travaux de Machinet et al. (2009) ont montré que la réduction de la vitesse de minéralisation du C était associée à la présence des composés récalcitrants dont la proportion augmente avec l'avancée de la décomposition. A même niveau de C minéralisé (43%) l'organisation microbienne par unité de C minéralisé est de 37 mg N g⁻¹ C pour 2CN+ contre 23 mg N g⁻¹C pour 2CN-. Ce résultat suggère que lorsqu'il y a moins d'azote disponible les microorganismes diminuent leur besoin en azote (Recous et al. 1995).

Effet de la disponibilité en azote sur les dynamiques microbiennes à même niveau de C apporté

Notre deuxième hypothèse était qu'une décomposition dans un sol avec une faible disponibilité en N favorise la biomasse fongique et ses activités associées. Selon la littérature (Hu et al. 2001 ; Carney et al. 2007 ; Van Groeningen et al. 2007), lorsque le C organique est disponible pour les microorganismes du sol et que l'azote est limitant, les communautés fongiques sont favorisées ; mais si l'azote n'est pas limitant, ce sont plutôt les communautés bactériennes qui sont favorisées.

Nous avons montré qu'à court terme, une forte disponibilité en N (sol+ résidus) accélérât la décomposition (ou l'a ralentie en absence d'azote). Cela a conduit à une accélération de la formation du C microbien total (biomasse microbienne) et donc à une augmentation du niveau d'ergostérol, marqueur de la biomasse fongique. Cette observation a aussi été décrite par d'autres travaux (Rousk et Baath 2007). Elle s'expliquerait par une croissance des

communautés fongiques spécialisées dans la dégradation des substrats riches en composés cellulosiques et pauvres en N comme les feuilles sénescents (Carreiro et al. 2000 ; Gallo et al. 2004 ; Nemergut et al. 2008 ; Allison et al. 2010). La croissance microbienne en général dans 2CN+ s'est accompagnée d'une augmentation de production d'enzymes liées à l'acquisition du C et N comme la xylanase, la laccase et la leucine amino-peptidase comme l'ont montré d'autres travaux (Henry et al. 2005 ; Keeler et al. 2009). En effet, la croissance microbienne étant forte, les besoins en C et N augmentent ce qui conduit à la production d'enzymes extracellulaires qui dégradent les résidus végétaux (Keeler et al. 2009). Concernant l'activité laccase, nous confirmons qu'en présence de matière organique fraîche dans le sol, une forte disponibilité en N (2CN+) la réprime ; ceci est en accord avec d'autres résultats publiés dans la littérature (Carreiro et al. 2000 ; DeForest et al. 2004 ; Frey et al. 2004). Ce processus a été qualifié de répression catabolique par l'azote, car la présence de N minéral supprime la production d'enzymes impliquées dans la dégradation des composés phénoliques comme la lignine (Carreiro et al. 2000 ; Fog, 1988). Cependant, d'autres travaux ont aussi montré des effets neutres ou positifs d'une forte disponibilité en azote sur les activités phénol oxydase (Bragazza et al. 2007 ; Michel et Matzner 2003 ; Zeglin et al. 2007) mais ces auteurs n'expliquent pas clairement les processus observés et les attribuent plutôt à la diversité phénotypique des microorganismes, elle-même liée au type de sol.

Bien qu'inférieur à celui de 2CN- de 28 à 140 jours, le rapport ergostérol/C microbien du traitement 2CN+ augmente et rattrape celui de 2CN- au jour 189. Ce résultat suggère une modification/changement de populations microbiennes dans 2CN+ : de 28 à 140 jours, une forte disponibilité en N favoriserait l'installation d'une flore fongique à croissance rapide, pendant la décomposition de la fraction labile des feuilles ; après épuisement du substrat, c'est-à-dire à partir de 189 jours, une autre communauté fongique, spécialiste des composés récalcitrants se serait installée. Des travaux récents (Bastian et al. 2009) ont mis en évidence

la succession des communautés fongiques au cours de la décomposition des pailles de blé. Ces travaux rapportent l'installation des ascomycètes les 28 premiers jours de décomposition, puis des basidiomycètes à partir de 168 jours, ce qui semble être le cas pour notre étude.

Nous confirmons que les populations présentes dans ces traitements sont les mêmes à ce stade (300 jours) de la décomposition. Le C restant étant sous forme récalcitrante dans 2CN+ et 2CN- à ce stade de la décomposition, la richesse relative en azote n'a plus d'effet sur les cinétiques de minéralisation du C.

Effet de la modulation relative de la disponibilité en azote par apport croissant de feuilles à décomposer

Faire varier la quantité de carbone apporté dans le sens croissant (de 2C, 4C, 8C) a peu modifié la richesse relative en azote des traitements concernés (de 58% MS, 0.54% MS, 0.52% MS). Si l'on se réfère à la littérature mentionnée précédemment, ces traitements peuvent être considérés comme 'limitants' en N pour la décomposition des feuilles apportées.

Nous constatons qu'une variation de la richesse relative en azote de 0.58% à 0.52% MS contribue à ralentir de 10% la minéralisation cumulée du C dans 4CN- et 8CN- sur toute la durée d'incubation. Ce résultat confirme que les 'besoins' en N des traitements 4CN- et 8CN- sont importants mais ne sont pas satisfaits par la disponibilité en azote minéral du sol.

Nous confirmons aussi que lorsqu'il y a moins d'azote disponible les microorganismes diminuent leur besoin en azote. En effet, l'organisation microbienne par unité de C minéralisé reste quasiment stable sur toute la période de décomposition dans 4CN- (15 mg N g⁻¹C) et 8CN-(8 mg N g⁻¹C) ; alors qu'on observe une transition de 30 mg N g⁻¹C à 23 mg N g⁻¹C pour à 2CN-.

Cette situation de limitation croissante en azote des sols a réduit l'assimilation du C par les microorganismes ce qui s'est traduit par des faibles quantités de C microbien et donc d'ergostérol. On peut aussi penser que la limitation en azote provoque un recyclage accru de la biomasse microbienne dans le sol, qui se traduirait par l'augmentation du quotient métabolique (qCO_2), c'est-à-dire plus de CO_2 dû à la mortalité microbienne et moins de C microbien. Nos résultats confirment l'hypothèse de Schimel et Weintraub (2003) qui stipule qu'en conditions de faible disponibilité en N et de forte disponibilité en C, le CO_2 dégagé n'est pas associé à la croissance microbienne et donc à l'assimilation du C des résidus, mais plutôt au recyclage de la biomasse microbienne qui libère alors de l'azote dans le sol. Cette hypothèse a été démontrée par d'autres auteurs (Blagodatskaya et Anderson, 1999 ; Krashevskaya et al. 2010) qui confirment que les microorganismes, pour s'adapter aux conditions de faible disponibilité en nutriments comme N, orientent leur métabolisme de croissance vers celui de la maintenance.

Nous montrons que le rapport ergostérol/C microbien s'accroît avec l'augmentation de la dose de C organique apportée, c'est-à-dire avec une augmentation de la limitation relative en N. Ce résultat suggère que la proportion de biomasse fongique augmente lorsque la disponibilité en N diminue. En outre, les relations fortes et positives observées très tôt (0-28 jours) entre la minéralisation du C et l'ergostérol dans ces traitements (2CN-, 4CN- et 8CN-) confirment bien qu'à ce stade de la décomposition, les conditions de disponibilités relatives fortes en C et faibles en N favorisent la communauté fongique. Nos travaux sont donc en accord avec les études de Sinsabaugh et al. (2010) qui montrent aussi que les conditions de faible disponibilité en azote du sol favorisent la flore fongique qui peut décomposer un grand nombre de substrat.

A partir de 189 jours, il n'y a plus de différence entre les traitements 2CN-, 4CN-, 8CN- et 2CN+ concernant les rapports ergostérol/C microbien et de rapport laccase/ergostérol. Ces

résultats suggèrent que les communautés microbiennes sont similaires dans ces traitements à ce stade de la décomposition. Ces résultats confirment encore que la disponibilité en azote pilote la décomposition uniquement à court terme (0-140 jours), au-delà c'est la composition chimique du résidu à un temps donné qui pilote la décomposition. Enfin, nous montrons une absence de relation entre la minéralisation du C et l'activité laccase dans tous les traitements aux stades plus avancés de la décomposition des feuilles. Ceci suggère que d'autres classes d'enzymes oxydatives (lignine peroxydase, manganèse peroxydase, etc.) que nous n'avons pas étudiées dans la présente étude, ont pu être impliquées au cours de la décomposition.

CHAPITRE 5

Discussion générale

Discussion générale

L'objectif général de ce travail était d'étudier la contribution des litières d'origine aérienne (feuilles sénescents) et souterraine (rhizomes et racines) de *Miscanthus×giganteus* à l'évolution quantitative et qualitative des matières organiques des sols. *Miscanthus*, plante pérenne à rhizomes, est actuellement étudiée en France pour la production de carburants de seconde génération, en raison de son fort potentiel de production de biomasse végétale. Pour obtenir un bilan énergétique neutre ou favorable, la culture de *Miscanthus* doit être menée sous contraintes environnementales fortes : exportation systématique et complète de la biomasse végétale, réduction de la fertilisation azotée, peu ou pas d'utilisation d'herbicides et/ou fongicides. Les études menées précédemment en Europe ont principalement étudié la dose d'azote nécessaire à cette culture pour atteindre son maximum de production (Cosentino et al. 2007 ; Danalatos et al. 2007 ; Ercoli et al. 1999). Dans le cadre de notre travail, les traitements réalisés sur notre site expérimental (Estrées-Mons) nous ont permis d'étudier l'effet de la dose d'azote mais aussi celui des pratiques culturales en relation avec des choix technologiques. Ainsi, s'il s'avère que le fractionnement enzymatique offre potentiellement des rendements en sucres plus importants sur des cultures prélevées "vertes" (récolte précoce) que sur des cultures sénescents (récolte tardive) (Tran et al. 2010), cela pose cependant la question du maintien de la fertilité chimique et physique des sols, et donc de la pérennité de la culture.

Notre étude s'est donc articulée autour de 3 principaux objectifs : i) quantifier et caractériser chimiquement les trois principaux compartiments de litières susceptibles de contribuer au recyclage de la matière organique vers le sol : les feuilles sénescents, les rhizomes et les racines ; ii) étudier spécifiquement la contribution des feuilles sénescents à l'augmentation du C et N dans les sols dans le cas d'une récolte tardive, et enfin iii) comprendre les

interactions entre la disponibilité en azote et les dynamiques microbiennes hétérotrophes et leurs impacts sur les cinétiques de minéralisation du C et N au cours de la décomposition à court et long terme. Cette approche quantitative a pour objectif, à terme, de contribuer à la modélisation des impacts environnementaux des cultures de *Miscanthus*. Ces données pourront être intégrées d'une part dans les modèles sol-plante où il faudra renseigner les paramètres relatifs aux résidus de culture, et d'autre part dans les modèles de transformations couplées des cycles C et N où il faudra progresser sur les interactions entre cycles élémentaires et sur les fonctions de la biomasse microbienne.

1. Intérêts et limites de la démarche expérimentale adoptée

Obtention de la biomasse végétale

Ce travail de thèse s'est appuyé sur le programme REGIX qui a contribué à la mise en place en 2006 de la culture de *Miscanthus*×*giganteus* sur le site d'Estrées-Mons (Somme, Picardie), sur lequel nous avons travaillé.

Pour quantifier la biomasse végétale au champ, il est souvent préférable de récolter des plantes au hasard au sein des parcelles. Dans notre étude, nous avons été confrontés au problème d'hétérogénéité de la croissance des plantes de *Miscanthus* au sein des parcelles. Cette situation nous a amené à sélectionner les plantes ayant un nombre de tiges proche du nombre moyen de tiges des plantes situées au sein d'une placette d'étude (3.84 m²). Ensuite, à cause du caractère destructif des prélèvements et de la petite taille des parcelles (30m×12m), le nombre de prélèvements par date et par traitement a été limité à 3 répétitions. Cependant, malgré ces adaptations de la démarche expérimentale, nos résultats concernant la matière sèche aérienne (14-26 t ha⁻¹) pour une culture de 4 ans sont parfaitement en accord avec ceux

publiés dans la littérature (14-34 t ha⁻¹) (Danalatos et al. 2007 ; Himken et al. 1997 ; Kahle et al. 2001).

De la même façon que pour la partie aérienne, nous avons rencontré des difficultés pour quantifier précisément la matière sèche des rhizomes, en raison d'une forte variabilité du développement de ces organes. Cependant, nous montrons qu'il n'y a pas de différence de masse entre les rhizomes prélevés en coupe précoce (10-16 t ha⁻¹) et ceux prélevés en coupe tardive (10-17 t ha⁻¹). Nous observons aussi qu'au bout de 3 ans d'installation de *Miscanthus*, la masse sèche des rhizomes n'évolue plus, puisqu'elle reste stable entre 2008 et 2009. Ce résultat est en accord avec les travaux de Hansen et al. (2004) qui montrent qu'après 3 ans d'installation de *Miscanthus* et ce jusqu'à 14 ans, la masse des rhizomes reste stable. Notre protocole expérimental nous a permis de quantifier les racines attachées aux rhizomes (1-2 t ha⁻¹) sur une profondeur de 0 à 30 cm. La littérature rapporte une matière sèche des racines comprise entre 2 et 8 t ha⁻¹ (Beuch et al. 2000 ; Himken et al. 1997 ; Kahle et al. 2001, Monti et Zatta, 2009 ; Neukirchen et al. 1999). En prélevant uniquement les racines attachées aux rhizomes, nous sous-estimons la matière sèche racinaire. A ce propos, alors que Monti et Zatta (2009) montrent que 90% des racines se trouvent au niveau des rhizomes, Neukirchen et al. (1999) observent des racines de *Miscanthus* jusqu'à une profondeur de 250 cm et en concluent que la fraction racinaire située au niveau des rhizomes (0-30cm) ne représente que 28% de la masse sèche racinaire totale.

Qualité chimique de la biomasse végétale et décomposition dans le sol

Afin d'évaluer l'importance de la composition chimique des organes de *Miscanthus* (feuilles, racines et rhizomes) sur leur décomposition dans un sol, nous avons utilisé plusieurs méthodes : une méthode 'classique' de caractérisation chimique des résidus végétaux, à savoir

le fractionnement Van Soest (VS) et des méthodes plus spécifiques et moins répandues dans le domaine de la science du sol, telles la détermination des sucres neutres et la détermination de la lignine Klason (KL).

Le fractionnement VS est une analyse séquentielle qui permet de quantifier les fractions soluble, hémicellulose, cellulose et lignine d'un résidu végétal en fonction de son degré de 'récalcitrance' à des solutions chimiques de forces croissantes. Ces fractions, qui constituent les principaux composés des résidus végétaux, sont donc reliées aux cinétiques de minéralisation du C. La littérature montre par exemple sur une large gamme de résidus végétaux que la fraction soluble VS est significativement corrélée à la minéralisation du C sur les 14 premiers jours d'incubation (Trinsoutrot et al. 2000). La détermination des sucres neutres correspond à une hydrolyse acide de la paroi cellulaire qui libère les sucres constitutifs des polysaccharides ; une hydrolyse acide de la paroi en deux étapes permet d'obtenir la lignine Klason (Theander et al. 1995). En ce qui concerne notre travail, nous avons trouvé une corrélation forte ($R^2=0.85$) entre la teneur en glucose et la fraction cellulose VS de tous nos résidus, alors que la relation entre le reste des sucres neutres (arabinose+xylose+galactose) et l'hémicellulose VS était faible ($R^2=0.03$). En effet, il est bien connu que le fractionnement VS surestime la fraction hémicellulose des résidus ce qui explique l'absence de relation avec les sucres constitutifs des hémicelluloses (Wolfrum et al. 2009). Comme attendu, les concentrations en lignine Klason étaient sensiblement plus élevées que celles de la lignine VS (Bertrand et al. 2006 ; Jung et Lamb, 2004), mais la relation entre les deux types de lignine était forte ($R^2=0.89$) pour tous les résidus. Les détergents acides utilisés en cascade au cours du fractionnement VS solubilisent une partie de la lignine des résidus ce qui conduit à des quantités faibles de lignine en fin d'extraction par rapport à la méthode Klason (Monties, 1984). Plus spécifiquement, les interconnexions entre polysaccharides et lignine au sein de la paroi végétale pourraient rendre compte de

l'accessibilité de certains polymères aux microorganismes et enzymes. Ainsi, Machinet et al. (2009) ont montré que des rapports lignines/sucres étaient corrélés aux cinétiques de minéralisation des racines de maïs. Nous avons choisi de présenter la lignine klason parce qu'elle expliquait mieux la minéralisation du C ($R^2=0.85$) comparé à la lignine VS ($R^2=0.16$) (chapitre 2). Par cette caractérisation chimique, nous montrons pour la première fois que les rhizomes prélevés en récolte tardive ont des teneurs en soluble VS et N supérieures respectivement de 17% et 30% à celles des mêmes organes prélevés en récolte précoce. Nous montrons aussi que la teneur relative en lignine Klason des rhizomes prélevés en récolte tardive est inférieure de 25% à celle des rhizomes prélevés en récolte précoce. Ce résultat a conforté notre démarche expérimentale. En effet, au vu de la littérature, rien ne permettait d'affirmer que la composition chimique des rhizomes serait modifiée en fonction des dates de récolte (précoce versus tardive). Concernant l'étude de l'effet de la composition chimique des résidus sur leur décomposition dans un sol, nous avons obtenu un échantillonnage d'organes avec différentes teneurs en N et des caractéristiques chimiques proches et inversement des organes ayant des qualités chimiques distinctes et des teneurs en N comparables (Chapitre 2).

Partant de ce premier résultat, l'étude des biotransformations de C et N a été engagée par des incubations en conditions de laboratoire (et plutôt optimales) et de plein champ. Les incubations en conditions contrôlées et sans limitation de la décomposition des résidus par l'azote avaient pour objectif de différencier l'effet de la composition chimique des résidus de celui de la teneur en azote du sol, sur la décomposition. Cette distinction est en effet indispensable à la compréhension des processus de décomposition des résidus puis à la modélisation de ceux-ci (Chapitre 2).

Les incubations au champ avaient pour objectif d'étudier in situ la décomposition des feuilles à la surface du sol (Chapitre 3). Afin de tenir compte du caractère variable de la température et de l'humidité au champ et pour permettre d'une part une comparaison entre les deux années

d'études au champ, et d'autre part une comparaison avec la cinétique obtenue en laboratoire, les jours de cinétique au champ peuvent être convertis en 'jours normalisés', c'est-à-dire exprimés à une température de référence (15°C) et à une humidité de référence. Dans ce cas, l'humidité de référence est l'humidité à la capacité au champ (18.5% pour ce sol) en utilisant le facteur climatique $f(T, H)$ proposé par Andren et Paustian (1987). Dans notre étude, seul le facteur température a été pris en compte car les données d'humidité dans le mulch n'étaient pas disponibles lors de la conversion en jours normalisés.

Lorsque nous comparons la méthode d'incubation au champ à celle du laboratoire, nous montrons qu'à même nombre de jours normalisés à 15°C (300 jours), 54 % de la matière sèche de feuilles sont décomposés au champ contre 44% en conditions de laboratoire. Ce résultat apparaît contraire aux résultats attendus : en conditions de laboratoire, les résidus végétaux (sous formes de particules de taille 3-5 cm) sont intimement mélangés au sol et les conditions d'humidité et de température sont maintenues constantes sur toute la durée de l'incubation. Au champ, les feuilles sont confinées dans des litterbags de taille 20 cm×60 cm et posées à la surface du sol. Ce résultat pourrait en fait être expliqué par les différents facteurs influençant la décomposition dans chaque méthode : en laboratoire, la décomposition est essentiellement le résultat de l'activité de la microflore (mesurée par la respiration), alors qu'au champ la décomposition (mesurée par la perte en masse des résidus) est sous l'influence du climat (lessivage) et de ses variations, de la faune du sol et des microorganismes du sol (Cotrufo et al. 2010). Dans le présent travail, les mailles des litterbags sont larges (10 mm) ce qui favorise l'accès à une large communauté de décomposeurs. En outre, il est possible que des fragments de feuilles aient été perdus entre le prélèvement au champ et le retour au laboratoire (Gartner et Cardon, 2004). Cependant, cette dernière hypothèse est exclue dans ce travail.

Le recouvrement de l'azote des feuilles en décomposition dans la plante et le sol l'année qui suit l'apport de feuilles a été estimé par la méthode ^{15}N . Cette méthode a montré que les quantités de ^{15}N recouvrées dans la plante entière étaient faibles et représentent 4% du ^{15}N des feuilles apportées. L'azote restant dans les feuilles en décomposition représente 30% de l'apport (0.1377% excès ^{15}N). Dans la couche de sol de surface (0-5 cm) on a retrouvé 12% du ^{15}N apporté par les feuilles tandis que les couches sous jacentes n'étaient pas marquées. Le faible marquage initial des feuilles (0.1377% excès ^{15}N) et probablement l'hétérogénéité de ce marquage sont à l'origine du recouvrement partiel (45% apport initial) du ^{15}N apporté par les feuilles. En effet, un faible marquage initial des feuilles rend difficile la détection du ^{15}N dans la plante et le sol, en raison notamment de la dilution avec l'azote non marqué (Machet et al. 1987). L'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité du marquage expliquerait la perte du ^{15}N suppose qu'une forme plus mobile (^{15}N minéral) ou très facilement minéralisable (protéines) soit lessivée ou volatilisée. En effet, les feuilles se sont décomposées à la surface du sol et ont été exposées aux conditions de sécheresse et de plein air pendant la période d'étude. Ces conditions ont pu favoriser des pertes gazeuses par volatilisation comme l'ont discuté d'autres auteurs (Dejoux et al. 2000 ; Johnson et al. 2009).

La faible disponibilité en azote peut limiter l'action des microorganismes ce qui ralentit la décomposition à court terme (Henriksen et Breland 1999 ; Recous et al. 1995). Dans ce contexte, des niveaux de disponibilité en N (sol + résidus) non 'limitants' pour la décomposition des résidus végétaux ont été définis à 1.2 - 2% MS. A ces niveaux de richesse en azote, seules les caractéristiques chimiques des résidus contrôleraient leur biodégradation, pour des conditions environnementales données (température, humidité).

Notre stratégie a consisté à créer des conditions artificielles de disponibilité en azote en faisant varier soit la quantité d'azote minéral apportée (4 mg N kg⁻¹ sol et 74 mg N kg⁻¹ sol) pour une même quantité de C dans le sol (traitements notés 2C), soit la quantité de C apportée

pour une même quantité d'azote minéral du sol ($4 \text{ mg N kg}^{-1} \text{ sol}$) (traitements 2C à 8C). Nous avons obtenu un traitement dit 'non limitant' pour la décomposition 2CN+ avec une richesse relative en azote de 2.1% MS. En revanche, l'ajout de quantités croissantes de C dans le sol a fait peu varier la richesse en azote : 2CN- (0.58% MS), 4CN- (0.54% MS) et 8CN- (0.52% MS). Selon la littérature citée précédemment ces traitements peuvent être tous considérés comme 'limitants'. Nous avons ainsi pu suivre l'évolution en dynamique du compartiment microbien du sol (C microbien), de l'état physiologique ($q\text{CO}_2$) des microorganismes, de l'ergostérol marqueur fongique et de certaines activités enzymatiques (laccase, xylanase, leucine amino peptidase) au cours de la décomposition des feuilles dans chaque traitement. Parmi les méthodes disponibles pour quantifier le C contenu dans la biomasse microbienne, la méthode de fumigation/extraction (Vance et al. 1988) est particulièrement adaptée après un apport de résidus végétaux dans le sol. L'inconvénient de cette méthode est que le C, rendu extractible par les étapes de fumigation au chloroforme et d'extraction, doit être converti en C total de la biomasse microbienne par un coefficient K_{EC} . L'établissement de ce coefficient a fait l'objet de nombreux travaux et polémiques. Cependant, la plupart des travaux (Vance et al. 1987 ; Joergensen et al. 1996) montrent que la valeur de ce coefficient n'est pas fondamentale lorsqu'on étudie les fluctuations de la biomasse microbienne au cours du temps pour un même type de sol, ce qui est le cas de notre travail.

Par rapport au rôle de la disponibilité en azote sur la biomasse fongique (Chapitre 4), notre démarche d'étude a consisté à suivre en dynamique un marqueur fongique bien renseigné dans la littérature : l'ergostérol (West et al. 1987 ; Montgomery et al. 2000 ; Engelking et al. 2008). L'ergostérol est très utilisé pour indiquer les changements de la biomasse fongique au cours de la décomposition (Bonkowski, 2004). Nous avons utilisé la méthode dite 'physique' mise au point par Gong et al. (2001). Cette méthode d'extraction a l'avantage d'être rapide, moins toxique et moins coûteuse comparée à la méthode dite 'alcaline' mise au point par

Grant et West (1986) et adaptée par Djajakirana et al. (1996). En revanche, la méthode alcaline permet l'extraction de quantités élevées d'ergostérol. En effet, cette méthode extrait de l'ergostérol libre + de l'ergostérol estérifié aux chaînes d'acides gras des membranes plasmiques fongiques. Cependant, les travaux de De Ridder-Duine et al. (2006) ont toutefois montré qu'il n'y avait pas de différence significative d'extraction d'ergostérol entre les deux méthodes.

Dans ce travail, nous avons mesuré les activités enzymatiques extracellulaires (laccase, xylanase et leucine amino peptidase) impliquées dans la minéralisation du C et N. Ces mesures relativement faciles à mettre en œuvre ont permis de donner des indications sur les activités enzymatiques intervenant au cours de la décomposition des résidus végétaux dans des sols de différents niveaux de disponibilité en azote. Ces mesures d'activités enzymatiques permettent une approche fonctionnelle des microorganismes intervenants au cours de la décomposition des résidus dans les sols. En revanche, ces activités enzymatiques sont dosées dans des conditions optimales (température, pH optimum, substrat non limitant). En conséquence, les activités obtenues sont potentielles et ne sont pas forcément représentatives d'une décomposition dans un sol donné (Nannipieri, 2003).

2. Résultats acquis

Après seulement 4 années d'implantation, le Miscanthus confirme un potentiel de production très élevé comparativement à d'autres espèces, avec 24 à 28 t MS ha⁻¹ en coupe précoce et 19 à 21 t MS ha⁻¹ en coupe tardive (figure 1a). Les quantités de biomasse aérienne ont augmenté de 20 à 27% en coupe précoce et de 35 à 40% en coupe tardive entre 2007 et 2009 (Chapitre 2). Ces augmentations sont dues à la densification du couvert végétal pour toutes les modalités sauf pour le Miscanthus précoce conduit sans azote, dont la production est restée

stable. Cette stabilité est probablement associée à l'apparition en 2009 d'un stress azoté (diminution d'azote observée dans les rhizomes de 26 kg N ha^{-1}) pénalisant la production de biomasse (projet Misqual AAP07-52). La diminution de la matière sèche constatée pendant la phase de sénescence est expliquée à 60% par la chute des feuilles sénescentes ($3\text{-}6 \text{ t MS ha}^{-1}$) et à 40% par la perte de poids des tiges (figure 1a). Nous montrons aussi que le compartiment souterrain est considérable. La masse des rhizomes représente $8\text{-}16 \text{ t MS ha}^{-1}$, dont 1 à 2% sous forme nécrosée alors que celle des racines échantillonnée est comprise entre 1 et 2 t MS ha^{-1} (figure 1a). Comme vu précédemment, nos rendements de matière sèche aérienne et souterraine sont en accord avec les données citées dans la littérature. Nous avons ainsi pu quantifier les quantités de C et N de la plante à différents stades physiologiques (figure 1b). Le compartiment souterrain représente une entrée potentielle considérable de 7 à 9 t C ha^{-1} dans le sol, alors que les feuilles sénescentes contribuent à raison de $1.5 \text{ à } 3 \text{ t C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ à la surface du sol (figure 1b). En faisant la différence entre les quantités d'azote dans les rhizomes prélevés en hiver (tardif) et celles dans les mêmes organes prélevés en automne (précoce), nous montrons qu'une récolte précoce prive le rhizome d'une remobilisation de 55 kg N ha^{-1} .

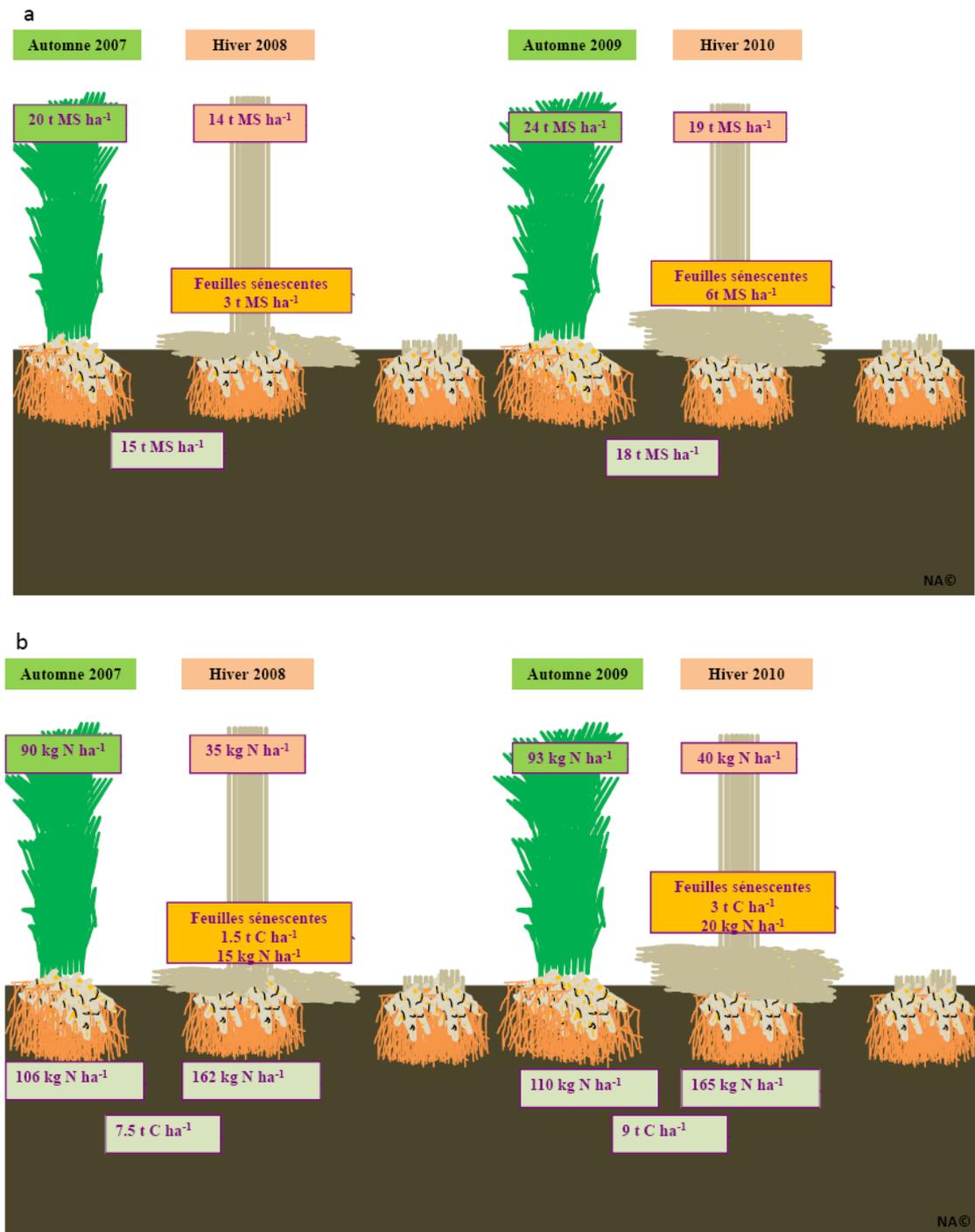


Figure 1. (a) Rendements de matière sèche et (b) quantités de C et N des parties aérienne et souterraine de *Miscanthus* prélevées en automne-2007/hiver-2008 et automne-2009/hiver-2010. Les plantes ont été prélevées sur les parcelles 0N.

Les feuilles sénescentes (apport annuel), les racines et les rhizomes sont des compartiments de biomasse végétale qui sont potentiellement recyclés au sol. D'un point de vue chimique, la fraction soluble (21%) des feuilles de *Miscanthus* est similaire à celles rencontrées dans les feuilles des autres espèces de plante comme le riz (22%), le sorgho (20%) ou le *brachiaria* (22%). En revanche, la teneur en lignine (15%) des feuilles de *Miscanthus* est supérieure à celles des espèces mentionnées ci-dessus (Abiven et al. 2005 ; Bertrand et al. 2006). Les racines de *Miscanthus* présentent aussi des teneurs en lignine fortes (19-20%) ce qui est en accord avec d'autres travaux de la littérature, où Beuch et al. (2000) ont estimé à 29% la fraction lignine présente dans les racines. Concernant les rhizomes, l'augmentation de la fraction soluble et de la teneur en azote entre l'automne et l'hiver est due au phénomène de remobilisation entre les parties aérienne et les rhizomes. En effet, les réserves de la plante (protéines, amidon) sont transférées vers les rhizomes avant la sénescence et sont utilisées pour le cycle végétatif suivant (Beale and Long 1997; Himken et al. 1997; Lewandowski et al. 2000). Nous avons réalisé la caractérisation chimique des organes d'une plante âgée de 2 ans (2007-2008), stade auquel la culture n'est pas encore établie. L'effet à long terme de la date de récolte sur la composition chimique des organes souterrains ne peut donc pas être évalué.

Nous avons montré précédemment que les biomasses végétales recyclées dans le sol représentent des quantités considérables qui vont être minéralisées ou stabilisées dans le sol en fonction de leur composition chimique et des conditions environnementales données (Balesdent et al. 2004). Les travaux de Dondini et al. (2009) ont par exemple montré qu'une quantité importante de C issu de *Miscanthus* s'accumulait dans le sol. Ces auteurs ont indirectement associé cet enrichissement du sol en C à la chute annuelle des feuilles et à la présence des rhizomes et racines. Dans la présente étude, nous avons évalué la décomposition des organes dans le sol en conditions optimales (résidus finement coupés et mélangés au sol,

absence de limitation en N) en vue d'obtenir des paramètres pour la modélisation des flux de C et N à court et long terme.

La décomposition des feuilles (53-54%) est intermédiaire entre celle des racines (30-42%) et celle des rhizomes (54-63%). Ce classement est en accord avec les résultats obtenus par Beuch et al. (2000). La cinétique de minéralisation du C des rhizomes est rapide et similaire à celle des résidus issus des parties aériennes de certaines plantes annuelles (colza, blé, etc.). On observe en effet des vitesses rapides de décomposition en début d'incubation en présence d'une forte teneur en soluble puis un ralentissement à long terme de ces vitesses quand apparaissent les composés récalcitrants (Trinsoutrot et al. 2000 ; Jensen et al. 2005). La minéralisation du C des racines de *Miscanthus* (30-42%) est proche de celles observées par d'autres études portant sur les racines de Maïs (Machinet et al. 2009) ou d'autres espèces comme *Brachiaria* ou colza (Abiven et al. 2005). Notre étude suggère que les racines de *Miscanthus* contribuent au stockage de C dans le sol en raison de leur teneur en lignine forte (Johnson et al. 2007 ; Machinet et al. 2009 ; Rasse et al. 2005). Nous montrons aussi que le rapport lignine/sucres totaux qui souligne les interactions entre lignine et polysaccharides dans le réseau pariétal (Machinet et al. 2009) est meilleur dans la prédiction de la décomposition des rhizomes que dans celle des racines. Ce résultat suggère que la plupart des polysaccharides des rhizomes (organe de réserve) seraient sous forme cyto-soluble, ce qui n'est pas le cas pour les racines.

Notre travail a aussi montré l'importance des feuilles de *Miscanthus* sur l'apport de matière organique au sol. D'une part, les feuilles de *Miscanthus* apportent de la matière organique au sol comme l'atteste le scénario 'récolte précoce' qui prive le sol d'une entrée annuelle d'une ou deux tonnes de carbone par hectare. D'autre part, la forte teneur en lignine des feuilles explique la faible dégradabilité observée en conditions de laboratoire (Chapitre 2) et confirmée au champ (Chapitre 3). Ceci conduit à la formation à la surface du sol d'un mulch

de feuilles assez important en épaisseur (2-4 cm) et en masse (6-7 t ha⁻¹). Il a été observé par ailleurs que ce mulch modifiait les conditions environnementales et climatiques à l'interface sol-atmosphère, en favorisant le maintien de l'humidité et en limitant le réchauffement du sol. Ces modifications ont des effets significatifs sur l'émergence et la croissance initiale des tiges nouvelles (S Cadoux, communication personnelle).

Nous avons étudié en laboratoire les processus de décomposition des feuilles de *Miscanthus* en conditions de faible ou forte disponibilité en azote. Nous montrons qu'à même niveau de C apporté dans le sol, une disponibilité en azote forte (2CN+) accélère la vitesse de minéralisation du C de 20% par rapport au traitement 2CN- à court terme (entre le jour 28 et le jour 140). Nous montrons aussi que sur la même période, qui correspond à la minéralisation de la fraction labile (C soluble) des feuilles, il y a une forte demande en azote de la part de la microflore hétérotrophe (Ding et al. 2010 ; McFarland et al. 2002). En effet, nous montrons que l'organisation microbienne de N exprimée par unité de C minéralisé passe de 143 mg N g⁻¹ C à 53 mg N g⁻¹ C pour 2CN+. Le traitement limitant 2CN- présente quant à lui une transition de 30 mg N g⁻¹ C à 23 mg N g⁻¹ C sur la même période. Nos résultats sont en accord avec ceux de Recous et al. (1995) qui ont montré les mêmes effets en étudiant la décomposition des pailles de maïs sous différentes disponibilités en N du sol.

A long terme (à partir de 189 jours), la vitesse de minéralisation du C de 2CN+ chute. Au jour 300, la courbe cumulée de minéralisation du C de 2CN- rejoint celle de 2CN+. En effet, la minéralisation rapide du C conduit à un épuisement du substrat facilement dégradable pour 2CN+ alors que pour 2CN-, la décomposition est initialement plus lente puis se poursuit de façon plus stable. Deux explications sont possibles : soit la proportion de substrat plus facilement dégradable persiste plus longtemps, soit la microflore hétérotrophe est dès le départ mieux adaptée à la dégradation de substrat en conditions limitantes en N. Cependant, il semble raisonnable de considérer qu'à 300 jours, le C restant dans les 2 traitements est de

même nature (récalcitrant) et qu'il est colonisé par un même groupe de population microbienne. Cette hypothèse est validée par le fait que le rapport ergostérol/C microbien du traitement 2CN+ augmente et 'rattrape' celui de 2CN- au jour 189. Après 189 jours, les rapports ergostérol/C microbien sont identiques dans les 2 traitements (2CN- et 2CN+). Ce résultat suggère une modification de populations microbiennes dans 2CN+ : de 28 à 140 jours, une forte disponibilité en N aurait favorisé l'installation d'une flore fongique à croissance rapide pendant la décomposition de la fraction labile des feuilles ; après épuisement du substrat, c'est-à-dire à partir de 189 jours, une autre communauté fongique, spécialiste des composés récalcitrants, se serait installée. Des travaux récents (Bastian et al. 2009) ont mis en évidence la succession des communautés fongiques au cours de la décomposition des pailles de blé. Ces travaux rapportent l'installation des ascomycètes les 28 premiers jours de décomposition, puis des basidiomycètes à partir de 168 jours, ce qui semble être le cas pour notre étude.

Une disponibilité forte en N (sol+ résidus) a accéléré la décomposition. Cela a conduit à une accélération de la formation du C microbien total (biomasse microbienne) et donc à une augmentation du niveau d'ergostérol, marqueur de la biomasse fongique. Cette observation est contraire à la littérature qui montre que lorsque le C organique est disponible pour les microorganismes du sol et que l'azote est limitant, les communautés fongiques sont favorisées ; mais si l'azote n'est pas limitant, ce sont plutôt les communautés bactériennes qui sont favorisées (Hu et al. 2001 ; Carney et al. 2007 ; Van Groeningen et al. 2007). Nos résultats sont cependant en accord avec d'autres études (Bargett et al. 1999 ; Rousk et Baath 2007) et s'expliqueraient par une croissance des communautés fongiques spécialisées dans la dégradation des substrats riches en composés cellulosiques et pauvres en N comme les feuilles sénescents (Carreiro et al. 2000 ; Gallo et al. 2004 ; Nemergut et al. 2008 ; Allison et al.

2010). Ceci sous-entend que lesdites communautés fongiques ont des besoins en azote comparables à ceux des communautés microbiennes.

Nous montrons aussi que l'augmentation de la croissance microbienne dans 2CN+ s'est accompagnée d'une augmentation de la production d'enzymes liées à l'acquisition du C et N (xylanase, laccase et leucine amino-peptidase) comme l'ont montré d'autres travaux (Henry et al. 2005 ; Keeler et al. 2009 ; Olander et Vitousek 2000 ; Saiya-Cork et al. 2002 ; Sturstonova et al. 2006). La croissance microbienne étant forte, les besoins en C et N augmentent ce qui conduit à la production d'enzymes extracellulaires qui dégradent les résidus végétaux. Nous confirmons dans ce travail qu'une forte disponibilité en N réprime l'activité laccase ce qui est en accord avec d'autres résultats publiés dans la littérature (Carriero et al. 2000 ; DeForest et al. 2004 ; Frey et al. 2004). Ce processus a été qualifié de répression catabolique par l'azote car la présence de N minéral supprime la production d'enzymes impliquées dans la dégradation des composés phénoliques comme la lignine (Carriero et al. 2000 ; Fog 1988).

Concernant la modulation de la richesse en azote (sol + résidus) par ajout de quantités croissantes de C, nous constatons qu'une variation de 0.58% à 0.52% MS de la richesse relative en azote contribue à ralentir de 10% la minéralisation cumulée du C de 4CN- et 8CN- sur toute la durée d'incubation. Ce résultat confirme que les 'besoins' en N des traitements 4CN- et 8CN- sont importants mais ne sont pas satisfaits par la disponibilité en azote minéral du sol.

La minéralisation ralentie du C (et donc l'assimilation ralentie du C par les microorganismes) conduit à une faible croissance microbienne ce qui se traduit par des faibles quantités de C microbien et d'ergostérol. On peut aussi penser que la limitation en azote provoque un recyclage accru de la biomasse microbienne dans le sol, qui se traduirait par l'augmentation du quotient métabolique (qCO_2), c'est-à-dire plus de CO_2 dû à la mortalité microbienne et moins de C microbien. Nos résultats confirment l'hypothèse de Schimel et Weintraub (2003)

qui stipule qu'en conditions de faible disponibilité en N et de forte disponibilité en C, le CO₂ dégagé n'est pas associé à la croissance microbienne et donc à l'assimilation du C des résidus, mais plutôt au recyclage de la biomasse microbienne qui libère alors de l'azote dans le sol. Cette hypothèse a été démontrée par d'autres auteurs (Blagodatskaya et Anderson, 1999 ; Krashevskaya et al. 2010) qui confirment que les microorganismes, pour s'adapter aux conditions de faible disponibilité en nutriments comme N, orientent leur métabolisme de croissance vers celui de la maintenance.

Nous montrons que le rapport ergostérol/C microbien s'accroît avec l'augmentation de la dose de C organique apportée, c'est-à-dire avec une augmentation de la limitation relative en N. Ce résultat suggère que la proportion de biomasse fongique augmente lorsque la disponibilité en N diminue. En outre, nous démontrons que ces conditions limitantes en N favorisent la production de laccase, connue pour décomposer les composés récalcitrants qui contiennent souvent de l'azote (Craine et al. 2007). Nos travaux sont en accord avec les études de Sinsabaugh et al. (2010) qui montrent aussi que les conditions de faible disponibilité en azote du sol favorisent la flore fongique décomposant un grand nombre de substrats. Enfin, nous montrons qu'à partir de 189 jours, il n'y a plus de différence entre les traitements (2CN-, 4CN-, 8CN- et 2CN+) concernant les rapports ergostérol/C microbien et laccase/ergostérol. Ceci suggère, qu'à ce stade de la décomposition des feuilles, les communautés microbiennes sont similaires pour tous les traitements.

3. Perspectives

Les rhizomes constituent un compartiment organique important (6 à 7 t C ha⁻¹, 100 à 150 kg N ha⁻¹) qui contribuera à enrichir la matière organique des sols, notamment au moment de la destruction de la culture. Nous avons vu d'un point de vue chimique que les rhizomes sont

des organes particuliers (organes de réserves et de remobilisation de l'azote) qui se décomposent plus rapidement en conditions potentielles que les racines et les feuilles, pour lesquels les références sont plus nombreuses en littérature. La caractérisation chimique des rhizomes a été réalisée sur des organes âgés de 2 ans, ce qui ne renseigne pas sur l'évolution de leur composition chimique à long terme. La compréhension de l'évolution de cette composition chimique et de son impact sur la biodégradation des rhizomes est importante du point de vue des cycles biogéochimiques du C et N par exemple.

Le volet modélisation n'a finalement pas été abordé dans ce travail. Initialement nous avons fait le choix d'utiliser le module de décomposition STICS (Nicolardot et al. 2001), qui est un module du modèle sol-plante STICS dont l'utilisation est envisagée pour simuler la croissance et les flux de C et N pour cette culture (INRA Agro-Impact Laon-Mons). Ce modèle a en effet montré sa capacité à simuler ces flux pour d'autres cultures (Brisson et al. 1998). Le module de décomposition comprend trois pools de matière organique : les résidus végétaux, la biomasse microbienne et la matière organique humifiée. La qualité des résidus de récolte n'est définie que par leur rapport C/N, qui détermine le taux de minéralisation du C, le rapport C/N de la biomasse microbienne et le taux d'humification du C microbien. La dynamique de l'azote du sol est régie par le taux de minéralisation du C et le rapport C/N des différents pools. Les paramètres standards du modèle ont été déterminés à partir des cinétiques de minéralisation du C et de N des résidus provenant de 27 cultures cultivées sous des conditions climatiques tempérées et mis en décomposition dans des conditions optimales de laboratoire (Nicolardot et al. 2001). Les données des cinétiques de minéralisation du C et N des résidus (rhizomes, racines et feuilles) issus des différents traitements (automne-0N/120N, hiver-0N/120N, voir chapitre 2) ont été testées avec les paramètres standards du modèle STICS. Le modèle n'a pas pu prédire les dynamiques de C et N observées (figure 2). Pour les rhizomes (figure 2a), la quantité de C minéralisé a été assez bien estimée au cours des 10 premiers jours, puis a été

surestimée. Concernant les racines (figure 2c), le modèle surestime la vitesse initiale de minéralisation du C et n'arrive pas à prédire le plateau observé expérimentalement au jour 40. Enfin, pour les feuilles sénescents (figure 2e), le modèle surestime largement la minéralisation initiale du C. En ce qui concerne la dynamique de N dans le sol, le modèle prédit une rapide et forte organisation de N pour tous les résidus sur l'intervalle de 0 à 40 jours. Le modèle simule aussi une phase de minéralisation nette de N (figures 2b, d, f) qui n'a pas été observée expérimentalement.

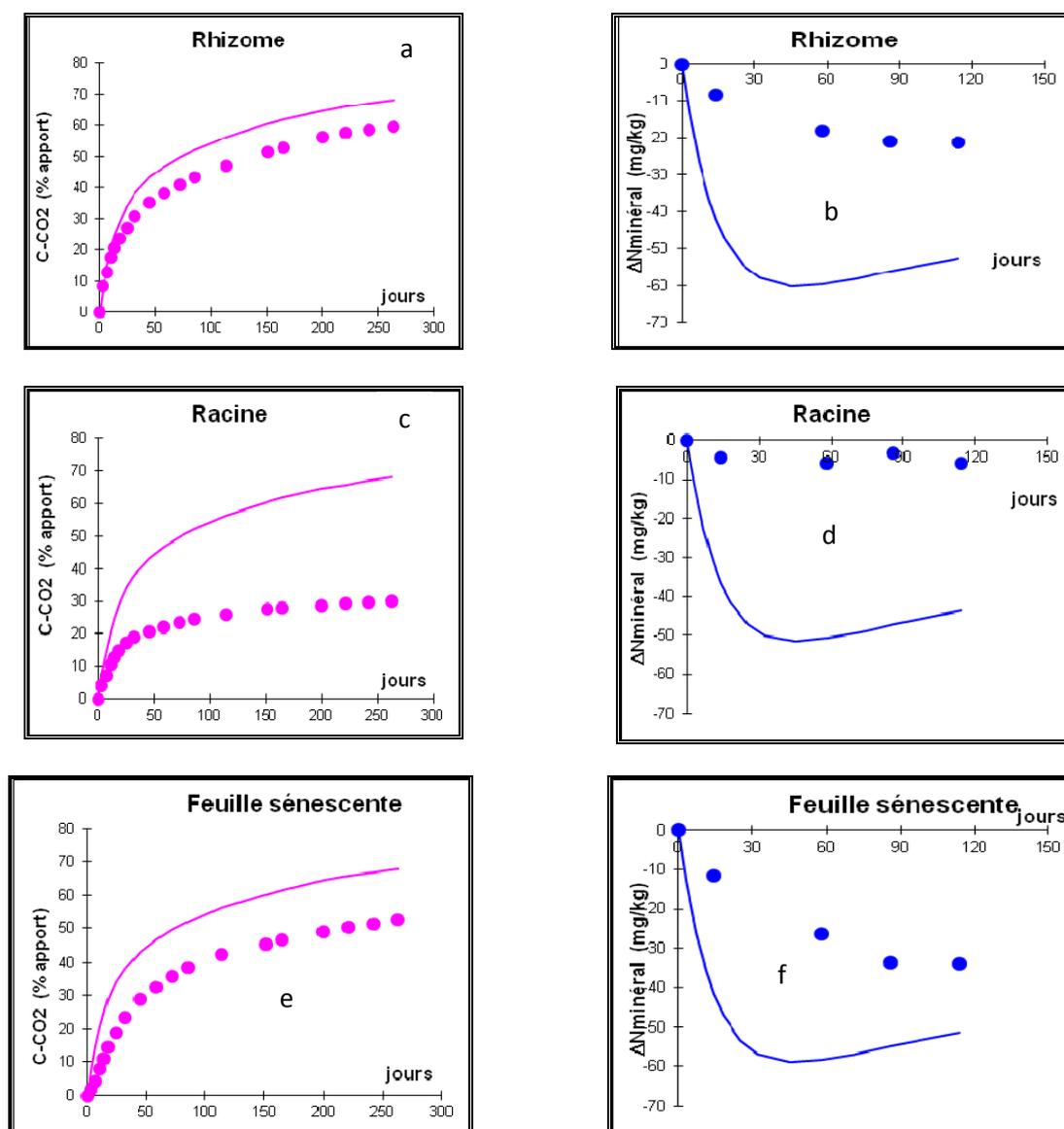


Figure 2. Quantités de C minéralisé et minéralisation nette d'azote après enfouissement des résidus de rhizomes (a, b), racines (c, d) et feuilles sénescents (e, f) dans le sol incubé en conditions contrôlées de température (15°C) et d'humidité (18.5%). Les organes souterrains ont été prélevés en février. (trait continu : valeurs simulées ; symbole rond : valeurs observées).

Pour la simulation de la minéralisation du C, les résultats montrent que la simplification du modèle qui consiste à décrire la qualité des résidus uniquement par leur teneur en azote ne convient pas pour décrire la minéralisation des résidus de Miscanthus. Les résidus de Miscanthus avaient des teneurs en lignine plus fortes que celles des résidus utilisés pour calibrer STICS or Abiven et al. (2005) ont montré que ce modèle ne simulait pas correctement la minéralisation des racines fortement lignifiées. Pour prédire les dynamiques de N dans le sol, un bon ajustement du modèle aux données observées supposerait un rapport C/N de la biomasse microbienne beaucoup plus élevé, ce qui donnerait une plus faible organisation de N dans le sol. Ces résultats suggèrent aussi que le rhizome, qui est un organe de réserve très peu étudié dans la littérature notamment du point de vue de sa biodégradabilité, n'est pas, au moment de sa décomposition, un résidu de récolte 'classique'. Pour simuler la décomposition des rhizomes mais aussi des racines, il semble nécessaire d'utiliser un modèle de décomposition plus complexe, qui prenne en compte une partie de la composition chimique des résidus, comme par exemple une ou plusieurs fractions plus ou moins récalcitrantes à la décomposition. Il apparaît envisageable d'utiliser le modèle CANTIS (Mary et al. 1993). Une originalité de ce modèle est qu'il tient compte des différentes fractions d'un résidu végétal (soluble, hémicellulose, cellulose et lignine) et de la répartition de l'azote au sein de ces fractions, pour simuler les cinétiques de minéralisation du C et N. Un autre aspect important du modèle résulte dans la prise en compte de la limitation de la décomposition par la concentration d'azote minéral dans le sol. En milieu naturel, cette limitation peut s'exercer sur la décomposition des matières organiques assez pauvres en azote comme les feuilles sénescentes.

Pour répondre à la question posée sur l'évolution de la matière organique dans les sols après introduction d'une plante pérenne comme le Miscanthus, il faudrait examiner l'accumulation du mulch des feuilles à la surface du sol à plus long terme. Nous avons vu (Chapitre 3) que le modèle utilisé pour simuler la décomposition du mulch prédisait une stabilisation de l'accumulation des feuilles à partir de 4 ans d'installation de la culture ; or cette prédiction a été validée par nos mesures expérimentales. Il serait intéressant de poursuivre le suivi de l'évolution du mulch sur le dispositif expérimental pour confronter les observations au champ et les prédictions du modèle au-delà de 5 ans.

Enfin, le C microbien, l'ergostérol et l'activité laccase ont été mesurés pour le suivi de la dynamique microbienne au cours de la décomposition des feuilles en conditions de faible/forte disponibilité en azote. Afin de caractériser la succession des populations fongiques mise en évidence par nos indicateurs (ergostérol/C microbien), il serait maintenant intéressant d'utiliser les techniques actuelles de biologie moléculaires de types PCR quantitatives qui déterminent des nombres de copies 16s bactérien et 18s fongique.

4. Conclusion

Comparé aux cultures annuelles (blé, orge, colza, maïs) qui sont fortement dépendantes des apports azotés, Miscanthus, grâce à son système souterrain, produit rapidement de la biomasse aérienne, dont une partie considérable (3-6 t MS ha⁻¹) est recyclée annuellement au sol (feuilles) en cas de récolte tardive. Ces feuilles assurent à moyen et long terme un approvisionnement du sol en matière organique important pour le maintien de la fertilité du sol. Le scénario précoce supprime la remobilisation des photo-assimilats vers les rhizomes, ce qui à long terme diminue la productivité de la plante. Même si la date de récolte ne modifie pas les quantités considérables de matières sèches souterraines, la composition chimique de ces organes en est fortement influencée, ce qui en retour influence leur biodégradation

potentielle dans les sols. Enfin, la nature récalcitrante des racines et des feuilles sénescents limite leur décomposition ce qui permet une accumulation potentielle de C organique favorable au maintien de la fertilité des sols à long terme. En outre, l'absence de labour des sols sous *Miscanthus* permet de favoriser le stockage du C dans les sols, les cultures étant installées pour plusieurs années. Ceci favorise aussi l'installation d'espèces animales (oiseaux, insectes, etc.) et donc a un effet positif sur la biodiversité, comme l'ont montré Karp et Shield (2008). Cependant, il est crucial de conduire ces cultures énergétiques sur des terres marginales (friches industrielles, sols pauvres ou pollués) non seulement afin d'enrichir ces sols en matière organique, mais aussi pour éviter l'utilisation des terres destinées à l'alimentation humaine et animale.

Bibliographie

Bibliographie

- Abiven, S; Recous, S (2007). Mineralisation of crop residues on the soil surface or incorporated in the soil under controlled conditions. *Biology and Fertility of Soils* 43:849-852.
- Abiven, S; Recous S; Oliver R (2005). Mineralization of C and N from root, stem and leaf-residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils* 45:119-128
- Abrahamson, L. P; Robison, D. J; Volk, T. A; White, E. H; Neuhauser, E. F; Benjamin, W. H; Peterson, J. M (1998). Sustainability and environmental issues associated with willow bioenergy development in New York (USA). *Biomass and Bioenergy* 15:17-22.
- Acaroglu, M; Aksoy, A. S (2005). The cultivation and energy balance of *Miscanthus x giganteus* production in Turkey. *Biomass and Bioenergy* 29:42-48.
- Adiku, S. G. K; Jones, J. W; Kumaga, F. K; Tonyigah, A (2009). Effects of crop rotation and fallow residue management on maize growth, yield and soil carbon in a savannah-forest transition zone of Ghana. *Journal of Agricultural Science* 147:313-322.
- Aerts, R (1997). Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: A triangular relationship. *Oikos* 79:439-449.
- Agoston-Szabo, E; Dinka, M; Nemedi, L; Horvath, G (2006). Decomposition of *Phragmites australis* rhizome in a shallow lake. *Aquatic Botany* 85:311-318.
- Allison, S. D; Gartner, T. B; Mack, M. C; McGuire, K; Treseder, K (2008). Nitrogen alters carbon dynamics during early succession in boreal forest. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1157-1164.
- Altieri, M. A (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 74:19-31.

- Appeldoorn, M. M; Kabel, M. A; Van Eylen, D; Gruppen, H; Schols, H. A (2010). Characterization of Oligomeric Xylan Structures from Corn Fiber Resistant to Pretreatment and Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:11294-11301.
- Asaeda, T; Nam, LH (2002). Effects of rhizome age on the decomposition rate of *Phragmites australis* rhizomes. *Hydrobiologia* 485:205-208
- Balesdent, J; Balabane, M (1996). Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28:1261-1263
- Atanassova, I; Teoharov, M (2010). Nature and Origin of Lipids in Clay Fractions from a Fluvisol in a Sewage Sludge Deposition Field. *Water Air and Soil Pollution* 208:295-304.
- Baldrian, P; Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 32:501-521.
- Bastian, F; Bouziri, L; Nicolardot, B; Ranjard, L (2009). Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry* 41(2): 262-275.
- Bauen, A. W; Dunnett, A. J; Richter, G. M; Dailey, A. G; Aylott, M; Casella, E; Taylor, G (2010). Modelling supply and demand of bioenergy from short rotation coppice and *Miscanthus* in the UK. *Bioresource and Technology* 101:8132-8143.
- Baumann, K; Marschner, P; Smernik, R. J; Baldock, J. A (2009). Residue chemistry and microbial community structure during decomposition of eucalypt, wheat and vetch residues. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1966-1975.
- Beale, C. V; Long, S. P (1995). Can perennial C-4 grasses attain high efficiencies of radiant energy-conversion in cool climates. *Plant Cell and Environment* 18:641-650.
- Beale, C. V; Long, S. P. (1997). Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning

- in the perennial C-4-grasses *Miscanthus x giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass and Bioenergy* 12:419-428.
- Beale, C. V; Morison, J. I. L; Long, S. P (1999). Water use efficiency of C-4 perennial grasses in a temperate climate. *Agricultural and Forest Meteorology* 96:103-115.
- Berg, B (2000). Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management* 133:13-22.
- Berndes, G (2002). Bioenergy and water: the implications of large-scale bioenergy production for water use and supply. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* 12:253-271.
- Bertrand, I; Chabbert, B; Kurek, B; Recous, S (2006). Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil* 281:291-307
- Bertrand, I; Prevot, M; Chabbert, B (2009). Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresource and Technology* 100:155-163
- Beuch, S; Boelcke, B; Belau, L (2000). Effect of the organic residues of *Miscanthus x giganteus* on the soil organic matter level of arable soils. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau* 184:111-119.
- Blakeney, A. B; Harris, P. J; Henry, R. J; Stone, B. A (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113:291-211
- Bhogal, A; Nicholson, F. A; Chambers, B. J (2009). Organic carbon additions: effects on soil bio-physical and physico-chemical properties. *European Journal of Soil Science* 60:276-286.
- Blagodatskaya, E. V; Anderson, T. H (1999). Adaptive responses of soil microbial communities under experimental acid stress in controlled laboratory studies. *Applied*

Soil Ecology 11:207-216.

- Blanco-Canqui, H; Lal, R (2009). Crop Residue Removal Impacts on Soil Productivity and Environmental Quality. *Critical Reviews in Plant Sciences* 28:139-163.
- Blanco-Canqui, H; Lal, R; Post, W. M; Izaurralde, R. C; Owens, L. B (2006). Corn stover impacts on near-surface soil properties of no-till corn in Ohio. *Soil Science Society of America Journal* 70:266-278.
- Boberg, J; Finlay, R. D; Stenlid, J; Nasholm, T; Lindahl, B. D (2008). Glucose and ammonium additions affect needle decomposition and carbon allocation by the litter degrading fungus *Mycena epipterygia*. *Soil Biology and Biochemistry* 40:995-999.
- Boehmel, C; Lewandowski, I; Claupein, W (2008). Comparing annual and perennial energy cropping systems with different management intensities. *Agricultural Systems* 96: 224-236.
- Bragazza, L; Freeman, C (2007). High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment* 377:439-443.
- Bunemann, E. K (2008). Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2116-2129.
- Bullard, M. J; Nixon, P. M. I; Cheath, M (1997). Quantifying the yield of *Miscanthus x giganteus* in the UK. *Aspects Applied Biology* 49:199-206
- Burner, D. M; Tew, T. L; Harvey, J. J; Belesky, D. P (2009). Dry matter partitioning and quality of *Miscanthus*, *Panicum*, and *Saccharum* genotypes in Arkansas, USA. *Biomass and Bioenergy* 33:610-619.
- Burvall, J (1997). Influence of harvest time and soil type on fuel quality in reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L). *Biomass and Bioenergy* 12:149-154.
- Byard, R; Lewis, K. C; Montagnini, F (1996). Leaf litter decomposition and mulch performance from mixed and monospecific plantations of native tree species in Costa

- Rica. *Agriculture Ecosystems and Environment* 58:145-155.
- Cadisch, G; Giller, K. E (1997). Driven by Nature. *CAB International, Wallingford, UK*, pp. 409.
- Caldwell, B. A (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49:637-644.
- Cantero-Martinez, C; Westfall, D. G; Sherrod, L. A; Peterson, G. A (2006). Long-term crop residue dynamics in no-tilt cropping systems under semi-arid conditions. *Journal of Soil and Water Conservation* 61:84-95.
- Carney, K. M; Hungate, B. A; Drake, B. G; Megonigal, J. P (2007). Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4990-4995.
- Carreiro, M. M; Sinsabaugh, R. L; Repert, D. A; Parkhurst, D. F (2000). Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81:2359-2365.
- Carter, M. R; Parton, W. J; Rowland, I. C; Schultz, J. E; Steed, G. R (1993). Simulation of soil organic carbon and nitrogen changes in cereal and pasture systems of southern Australia. *Australian Journal of Soil Research* 31:481-491.
- Cellier, P; Germon, J. C; Henault, C; Genermont, S (1997). Les émissions d'ammoniac (NH₃) et d'oxyde d'azote (NO_x et N₂O) par les sols cultivés : mécanismes de production et quantification des flux. In : Lemaire, G., Nicolardot, B. (Eds.) *Maîtrise et gestion de l'azote dans les agrosystèmes, série les Colloques de l'INRA, INRA Editions, Paris*, pp.25-37.
- Chaussod, R; Nicolardot, B; Catroux, G (1986). Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol* 2:201-211

- Chen, Z; Cui, H. M; Wu, P; Zhao, Y. L; Sun, Y. C (2010). Study on the optimal intercropping width to control wind erosion in North China. *Soil and Tillage Research* 110:230-235.
- Christensen, B. T (2001). Physical fractionation of soil and structural and functional complexity in organic matter turnover. *European Journal of Soil Science* 52:345-353.
- Christian, D. G (1994). Quantifying the yield of perennial grasses grown as a biofuel for energy generation. *Renewable Energy* 5:762-766.
- Christian, D. G; Poulton, P. R; Riche, A. B; Yates, N. E (1997). The recovery of ¹⁵N-labelled fertilizer applied to *Miscanthus x giganteus*. *Biomass and Bioenergy* 12:21-24
- Christian, D. G., Poulton, P. R., Riche, A. B., Yates, N. E; Todd, A. D (2006). The recovery over several seasons of N-15-labelled fertilizer applied to *Miscanthus x giganteus* ranging from 1 to 3 years old. *Biomass and Bioenergy* 30:125-133.
- Christian, D. G; Riche, A. B; Yates, N. E (2008). Growth, yield and mineral content of *Miscanthus x giganteus* grown as a biofuel for 14 successive harvests. *Industrial Crops Products* 28:320-327
- Christian, D. G; Riche, A. B; Yates, N. E (2009). Estimation of ramet production from *Miscanthus giganteus* rhizome of different ages. *Industrial Crops Products* 30:176-178.
- Clifton-Brown, J. C; Lewandowski, I (2000). Water use efficiency and biomass partitioning of three different *Miscanthus* genotypes with limited and unlimited water supply. *Annals of Botany* 86:191-200.
- Clifton-Brown, J. C; Lewandowski, I; Andersson, B; Basch, G; Christian, D. G; Kjeldsen, J. B; Jorgensen, U; Mortensen, J. V; Riche, A. B; Schwarz, K. U; Tayebi, K; Teixeira, F (2001). Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. *Agronomy Journal* 93:1013-1019.
- Clifton-Brown, J. C; Neilson, B; Lewandowski, I; Jones, M. B (2000). The modelled productivity of *Miscanthus x giganteus* (GREEF and DEU) in Ireland. *Industrial Crops*

and Products 12: 97-109.

- Cliquet, J. B; Boutin, J. P ; Deleens, E; Morotgaudry, J. F (1991). Ethephon Effects on Translocation and Partitioning of Assimilates in Zea-Mays. *Plant Physiology and Biochemistry* 29:623-630.
- Conn, C; Dighton, J (2000). Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 32:489-496.
- Coppens, F; Garnier, P; Findeling, A; Merckx, R; Recous, S (2007). Decomposition of mulched versus incorporated crop residues: Modelling with PASTIS clarifies interactions between residue quality and location. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2339-2350.
- Cosentino, S. L; Patane, C; Sanzone, E; Copani, V; Foti, S (2007). Effects of soil water content and nitrogen supply on the productivity of *Miscanthus x giganteus* (Greef and Deu) in a Mediterranean environment. *Industrial Crops and Products* 25:75-88.
- Cotrufo, M. F; Ngao, J; Marzaioli, F; Piermatteo, D (2010). Inter-comparison of methods for quantifying above-ground leaf litter decomposition rates. *Plant and Soil* 334:365-376.
- Cowie, A. L; Gardner, W. D (2007). Competition for the biomass resource: Greenhouse impacts and implications for renewable energy incentive schemes. *Biomass & Bioenergy* 31(9): 601-607.
- Craine, J. M; Morrow, C; Fierer, N (2007). Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology* 88:2105-2113.
- Curtin, D; Rostad, H. P. W (1997). Cation exchange and buffer potential of Saskatchewan soils estimated from texture, organic matter and pH. *Canadian Journal of Soil Science* 77:621-626.
- Cushman, K. E; Maqbool, M; Gerard, P. D (2005). Mulch type, mulch depth, and rhizome

- planting depth for field-grown American mayapple. *HortScience* 40: 635-639.
- Dalmonech, D; Lagomarsino, A; Moscatelli, M. C.; Chiti, T; Valentini, R (2010). Microbial performance under increasing nitrogen availability in a Mediterranean forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1596-1606.
- Danalatos, N. G; Archontoulis, S. V; Mitsios, I (2007). Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus x giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass and Bioenergy* 31:145-152.
- Das, T; Das, A. K (2010). Litter production and decomposition in the forested areas of traditional homegardens: a case study from Barak Valley, Assam, northeast India. *Agroforestry Systems* 79:157-170.
- David, K; Ragauskas, A. J (2010). Switchgrass as an energy crop for biofuel production: A review of its ligno-cellulosic chemical properties. *Energy and Environmental Science* 3:1182-1190.
- Davis, S. C; Anderson-Teixeira, K. J; DeLucia, E. H (2009). Life-cycle analysis and the ecology of biofuels. *Trends in Plant Science* 14:140-146.
- DeForest, J. L; Zak, D. R; Pregitzer, K. S; Burton, A. J (2004). Atmospheric nitrate deposition and the microbial degradation of cellobiose and vanillin in a northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 965-971.
- Dejoux, J. F; Recous, S; Meynard, J. M; Trinsoutrot, I; Leterme, P (2000). The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil* 218: 257-272.
- Dignac, M. F; Bahri, H; Rumpel, C; Rasse, D.P; Bardoux, G; Balesdent, J; Girardin, C; Chenu, C; Mariotti, A (2005). Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma* 128, 3-17.

- Dinka, M; Ágoston-Szabó, E; Tóth, I (2004). Changes in nutrients content of decomposing *Phragmites australis* litter. *International Review Hydrobiology* 89:519-535
- Ding, X. L; Zhang, X. D; He, H. B; Xie, H. T (2010). Dynamics of soil amino sugar pools during decomposition processes of corn residues as affected by inorganic N addition. *Journal of Soils and Sediments* 10:758-766.
- Dhugga, K. S (2007). Maize biomass yield and composition for biofuels. *Crop Science* 47:2211-2227
- Dondini, M; Van Groenigen, K. J; Del Galdo, I; Jones, M. B (2009). Carbon sequestration under Miscanthus: a study of C-13 distribution in soil aggregates. *Global Change Biology Bioenergy* 1: 321-330.
- Dornburg, V; van Vuuren, D; van de Ven, G; Langeveld, H; Meeusen, M; Banse, M; van Oorschot, M; Ros, J; van den Born, G. J.; Aiking, H; Londo, M; Mozaffarian, H; Verweij, P; Lysen, E; Faaij, A (2005). Bioenergy revisited: Key factors in global potentials of bioenergy. *Energy and Environmental Science* 3:258-267.
- Duchesne, L; Ouimet, R; Houle, D (2010). Nutrient transfer by leaf litterfall during a sugar maple decline episode at Lake Clair watershed, Quebec, Canada. *Plant Ecology* 208:213-221.
- Dungait, J. A. J; Bol, R; Bull, I. D; Evershed, R. P (2009). Tracking the fate of dung-derived carbohydrates in a temperate grassland soil using compound-specific stable isotope analysis. *Organic Geochemistry* 40:1210-1218.
- Edmonds, R. L; Tuttle, K. M (2010). Red alder leaf decomposition and nutrient release in alder and conifer riparian patches in western Washington, USA. *Forest Ecology and Management* 259:2375-2381.
- Ehrenfeld, J. G (2003). Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems* 6:503-523.

- El-Bassam, N; Meier, D; Gerdes, C; Korte, A. M (2002). Potential of producing biofuels from bamboo. *Bamboo for sustainable development. Proceedings of the Vth International Bamboo Congress and the VIth International Bamboo Workshop, San Jose, Costa Rica, 2-6 November 1998*: 797-806.
- Enrique, A. G; Bruno, C; Christopher, A; Virgile, C; Steven, C (2008). Effects of nitrogen availability on microbial activities, densities and functional diversities involved in the degradation of a Mediterranean evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 40:1654-1661.
- Entry, J. A (2000). Influence of nitrogen on cellulose and lignin mineralization in blackwater and redwater forested wetland soils. *Biology and Fertility of Soils* 31:436-440.
- Epron, D; Marsden, C; M'Bou, A. T; Saint-Andre, L; d'Annunzio, R; Nouvellon, Y (2009). Soil carbon dynamics following afforestation of a tropical savannah with Eucalyptus in Congo. *Plant and Soil* 323:309-322.
- Ernst, G; Henseler, I; Felten, D; Emmerling, C (2009). Decomposition of energy crop residues governed by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1548-1554
- Ercoli, L; Mariotti, M; Masoni, A; Bonari, E (1999). Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of *Miscanthus*. *Field Crops Research* 63:3-11.
- Ericsson, K; Nilsson, L. J (2006). Assessment of the potential biomass supply in Europe using a resource-focused approach. *Biomass and Bioenergy* 30:1-15.
- Farage, P. K; Blowers, D; Long, S. P; Baker, N. R (2006). Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO₂ assimilation in leaves of two chilling-tolerant C-4 species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus x giganteus*. *Plant Cell and Environment* 29:720-728.
- Fernandes, S. D; Trautmann, N. M; Streets, D. G; Roden, C. A; Bond, T. C (2007). Global

- biofuel use, 1850-2000. *Global Biogeochemical Cycles* 21.
- Ferraro, D. O (2009). Fuzzy knowledge-based model for soil condition assessment in Argentinean cropping systems. *Environmental Modelling and Software* 24:359-370.
- Fioretto, A; Papa, S; Fuggi, A (2003). Litter-fall and litter decomposition in a low Mediterranean shrubland. *Biology and Fertility of Soils* 39:37-44.
- Fischer, G; Prieler, S; van Velthuisen, H (2005). Biomass potentials of miscanthus, willow and poplar: results and policy implications for Eastern Europe, Northern and Central Asia. *Biomass and Bioenergy* 28:119-132.
- Foeroid, B; de Neergaard, A; Høgh-Jensen, H (2004). Turnover of organic matter in a Miscanthus field: effect of time in Miscanthus cultivation and inorganic nitrogen supply. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1075-1085.
- Fog, K (1988). The Effect of Added Nitrogen on the Rate of Decomposition of Organic-Matter. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 63:433-462.
- Fontaine, S Mariotti, A; Abbadie, L (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35:837-843.
- Frey, S. D; Knorr, M; Parrent, J. L; Simpson, R. T (2004). Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management* 196:159-171.
- Gabrielle, B; Gagnaire, N (2008). Life-cycle assessment of straw use in bio-ethanol production: A case study based on biophysical modelling. *Biomass and Bioenergy* 32:431-441.
- Gallo, M. E; Lauber, C. L; Cabaniss, S. E; Waldrop, M. P; Sinsabaugh, R. L; Zak, D. R (2005). Soil organic matter and litter chemistry response to experimental N deposition in northern temperate deciduous forest ecosystems. *Global Change Biology* 11:1514-1521.

- Gartner, T. B; Cardon, Z. G (2004). Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. *Oikos* 104:230-246.
- Geisseler, D; Horwath, W. R; Joergensen, R. G; Ludwig, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms - A review. *Soil Biology and Biochemistry* 42:2058-2067.
- Ghosh, S; Wang, Z. Y; Kang, S; Bhowmik, P. C; Xing, B. S (2009). Sorption and Fractionation of a Peat Derived Humic Acid by Kaolinite, Montmorillonite, and Goethite. *Pedosphere* 19:21-30.
- Gillespie, A. W; Walley, F. L; Farrell, R. E; Leinweber, P; Schlichting, A; Eckhardt, K. U; Regier, T. Z; Blyth, R. I. R (2009). Profiling Rhizosphere Chemistry: Evidence from Carbon and Nitrogen K-Edge XANES and Pyrolysis-FIMS. *Soil Science Society of America Journal* 73:2002-2012.
- Gleixner, G; Bol, R; Balesdent, J (1999). Molecular insight into soil carbon turnover. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13:1278-1283.
- Goering, H. K; Van Soest, P. J (1970). Forage fibre analyses. US Government Printing Office, Washington DC, *Agricultural Handbook* No. 379, USDA-ARS
- Gregg, J. S; Smith, S. J (2010). Global and regional potential for bioenergy from agricultural and forestry residue biomass. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 15:241-262.
- Hadas, A; Kautsky, L; Goek, M; Kara, E. E (2004). Rates of decomposition of plant residues and available nitrogen in soil, related to residue composition through simulation of carbon and nitrogen turnover. *Soil Biology and Biochemistry* 36:255-266.
- Hansen, E. M; Christensen, B. T; Jensen, L. S; Kristensen, K (2004). Carbon sequestration in soil beneath long-term Miscanthus plantations as determined by C-13 abundance. *Biomass and Bioenergy* 26:97-105.
- Hansen, J; Kristiansen, K (1997). Short-term in vitro storage of Miscanthus x ogiformis

- Honda 'Giganteus' as affected by medium composition, temperature, and photon flux density. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49:161-169.
- Harmon, M. E; Silver, W. L; Fasth, B; Chen, H; Burke, I. C; Parton, W. J; Hart, S. C; Currie, W. S (2009). Long-term patterns of mass loss during the decomposition of leaf and fine root litter: an intersite comparison. *Global Change Biology* 15:1320-1338.
- Haynes, R. J (2008). Soil organic matter quality and the size and activity of the microbial biomass: Their significance to the quality of agricultural soils. In *Soil Mineral-Microbe-Organic Interactions: Theories and Applications*, 201-231 (Eds Q. Huang, P. M. Huang and A. Violante).
- Heaton, E. A; Clifton-Brown, J; Voigt, T. B; Jones, M. B; Long, S. P (2004). Miscanthus for renewable energy generation: European Union experience and projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9:433-451.
- Heaton, E. A; Dohleman, F. G; Long, S. P (2008). Meeting US biofuel goals with less land: the potential of Miscanthus. *Global Change Biology* 14:2000-2014.
- Helfrich, M; Ludwig, B; Potthoff, M; Flessa, H (2008). Effect of litter quality and soil fungi on macroaggregate dynamics and associated partitioning of litter carbon and nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1823-1835.
- Henriksen, T. M; Breland, T. A (1999). Decomposition of crop residues in the field: evaluation of a simulation model developed from microcosm studies. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1423-1434.
- Henriksen, T. M; Breland, T. A (1999). Evaluation of criteria for describing crop residue degradability in a model of carbon and nitrogen turnover in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1135-1149.
- Henriksen, T. M; Breland, T. A (2002). Carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities as affected by contact between crop residues and soil. *Biology*

and Fertility of Soils 35:41-48.

- Henry, H. A. L; Juarez, J. D; Field, C. B; Vitousek, P. M (2005). Interactive effects of elevated CO₂, N deposition and climate change on extracellular enzyme activity and soil density fractionation in a California annual grassland. *Global Change Biology* 11:1808-1815.
- Hill, J; Nelson, E; Tilman, D; Polasky, S; Tiffany, D (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11206-11210.
- Hillier, J; Whittaker, C; Dailey, G; Aylott, M; Casella, E; Richter, G. M; Riche, A; Murphy, R; Taylor, G; Smith, P (2009). Greenhouse gas emissions from four bioenergy crops in England and Wales: Integrating spatial estimates of yield and soil carbon balance in life cycle analyses. *Global Change Biology Bioenergy* 1:267-281.
- Himken, M; Lammel, J; Neukirchen, D; CzypionkaKrause, U; Olf, H. W (1997). Cultivation of Miscanthus under west European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant and Soil* 189:117-126.
- Hobbie, S. E (1996). Temperature and plant species control over litter decomposition in Alaskan tundra. *Ecological Monographs* 66:503-522.
- Hobbie, S. E (2005). Contrasting effects of substrate and fertilizer nitrogen on the early stages of litter decomposition. *Ecosystems* 8:644-656.
- Hobbie, S. E (2008). Nitrogen effects on decomposition: A five-year experiment in eight temperate sites. *Ecology* 89:2633-2644.
- Hobbie, S. E; Chapin, F. S (1996). Winter regulation of tundra litter carbon and nitrogen dynamics. *Biogeochemistry* 35:327-338.
- Hobbs, P. R; Sayre, K; Gupta, R (2008). The role of conservation agriculture in sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*

363:543-555.

- Hofmockel, K. S; Zak, D. R; Blackwood, C. B (2007). Does atmospheric NO₃- deposition alter the abundance and activity of ligninolytic fungi in forest soils? *Ecosystems* 10:1278-1286.
- Hoogwijk, M; Faaij, A; van den Broek, R; Berndes, G; Gielen, D; Turkenburg, W (2003). Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Bioenergy* 25:119-133.
- Hopkins, D. W; Sparrow, A. D; Shillam, L. L; English, L. C; Dennis, P. G; Novis, P; Elberling, B; Gregorich, E. G; Greenfield, L. G (2008). Enzymatic activities and microbial communities in an Antarctic dry valley soil: Responses to C and N supplementation. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2130-2136.
- Hu, S; Chapin, F. S; Firestone, M. K; Field, C. B; Chiariello, N. R (2001). Nitrogen limitation of microbial decomposition in a grassland under elevated CO₂. *Nature* 409:188-191.
- Hungate, B. A; Naiman, R. J; Apps, M; Cole, J. J; Moldan, B; Satake, K; Stewart, J. W. B; Victoria, R; Vitousek, P. M (2003). Disturbance and element interactions. *Interactions of the Major Biogeochemical Cycles* 61: 47-62.
- Huyen, T. L. N; Remond, C; Dheilly, R. M; Chabbert, B (2010a). Effect of harvesting date on the composition and saccharification of *Miscanthus x giganteus*. *Bioresource Technology* 101:8224-8231.
- Jensen, L. S; Salo, T; Palmason, F; Breland, T. A; Henriksen, T. M; Stenberg, B; Pedersen, A; Lundstrom, C; Esala, M (2005). Influence of biochemical quality on C and N mineralisation from a broad variety of plant materials in soil. *Plant and Soil* 273:307-326.
- Joergensen, R. G; Scholle, G. A; Wolters, V (2009). Dynamics of mineral components in the forest floor of an acidic beech (*Fagus sylvatica* L.) forest. *European Journal of Soil*

Biology 45:285-289.

- Johnson, J. M. F; Barbour, N. W; Weyers, S. L (2007). Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition. *Soil Science Society of America Journal* 71:155-162
- Johnson, D. W; Miller, W. W; Susfalk, R. B; Murphy, J. D; Dahlgren, R. A; Glass, D. W (2009). Biogeochemical cycling in forest soils of the eastern Sierra Nevada Mountains, USA. *Forest Ecology and Management* 258:2249-2260.
- Jokic, A; Wang, M. C; Liu, C; Frenkel, A. I; Huang, P. M (2004). Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of delta-MnO₂. *Organic Geochemistry* 35:747-762.
- Kahle, P; Beuch, S; Boelcke, B; Leinweber, P; Schulten, H. R (2001). Cropping of miscanthus in central europe: biomass production and influence on nutrients and soil organic matter. *European Journal of Agronomy* 15:171-184.
- Kahle, P; Boelcke, B; Zacharias, S (1999). Effects of Miscanthus x giganteus cultivation on chemical and physical soil properties. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde* 162:27-32.
- Kalbertji, K. L; Mamolos, A. P (2000). Maize, soybean and sunflower litter dynamics in two physicochemically different soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 57:195-206.
- Kalbertji, K. L; Mosjidis, J. A; Mamolos, A. P (1999). Litter dynamics of low and high tannin sericea lespedeza plants under field conditions. *Plant and Soil* 208:271-281.
- Kamphake, L.J; Hannah, S.A; Cohen, J. M (1967). Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Resource* 1:205-216
- Karp, A; Shield, I (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. *New Phytologist* 179:15-32.
- Kassim, G; Martin, J. P; Haider, K (1981). Incorporation of a Wide Variety of Organic Substrate Carbons into Soil Biomass as Estimated by the Fumigation Procedure. *Soil*

- Science Society of America Journal* 45:1106-1112.
- Kastovska, E; Santruckova, H; Picek, T; Vaskova, M; Edwards, K. R (2010). Direct effect of fertilization on microbial carbon transformation in grassland soils in dependence on the substrate quality. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173:706-714.
- Kato, Y; Nevis, D. J (1985). Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- α -L-arabinosyl) – (1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose as a component of *Zea* shoot cell-walls. *Carbohydrate Research* 137:139-150
- Keeler, B. L; Hobbie, S. E; Kellogg, L. E (2009). Effects of long-term nitrogen addition on microbial enzyme activity in eight forested and grassland sites: Implications for litter and soil organic matter decomposition. *Ecosystems* 12: 1-15.
- Kim, S; Dale, B. E (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26:361-375.
- Knorr, M; Frey, S. D; Curtis, P. S (2005). Nitrogen additions and litter decomposition: A meta-analysis. *Ecology* 86:3252-3257.
- Krom, M. D (1980). Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Anal* 105:305-316
- Kojima, T;, Hayashi, H; Saito, M (2007). Community of arbuscular mycorrhizal fungi in Japanese semi-natural grassland dominated by *Pleuroblastus chino* and *Miscanthus sinensis*. *Grassland Science* 53:111-119.
- Korsaeth, A; Henriksen, T. M; Bakken, L. R (2002). Temporal changes in mineralization and immobilization of N during degradation of plant material: implications for the plant N supply and nitrogen losses. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 789-799.
- Kuzyakov, Y (2010). Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1363-1371.
- Kuzyakov, Y; Friedel, J. K; Stahr, K (2000). Review of mechanisms and quantification of

- priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1485-1498.
- Kuzyakov, Y; Mitusov, A; Schneckenberger, K (2007). Effect of C-3-C-4 vegetation change on delta C-13 and delta N-15 values of soil organic matter fractions separated by thermal stability. *Plant and Soil* 283:229-238.
- Lal, R (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environment International* 31:575-584.
- Lal, R (2009). Soil quality impacts of residue removal for bioethanol production. *Soil Tillage Research* 102:233-241
- Lal, R (2008). Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. *Waste Management* 28:747-758.
- Lee, J. W; Kim, H. Y; Koo, B. W; Choi, D. H; Kwon, M; Choi, I. G (2008). Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 106:162-167.
- Leung, P. C; Pointing, S. B (2002). Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly R decolorization by white-rot fungi. *Mycological Research* 106:86-92.
- Lewandowski, I; Clifton-Brown, J. C; Andersson, B; Basch, G; Christian, D. G; Jorgensen, U; Jones, M. B; Riche, A. B; Schwarz, K. U; Tayebi, K; Teixeira, F (2003). Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal* 95:1274-1280.
- Lewandowski, I; Clifton-Brown, J. C; Scurlock, J. M. O; Huisman, W (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy* 19:209-227.
- Lewandowski, I; Heinz, A (2003). Delayed harvest of *miscanthus*: influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19:45-63.
- Lewandowski, I; Kauter, D (2003). The influence of nitrogen fertilizer on the yield and

- combustion quality of whole grain crops for solid fuel use. *Industrial Crops and Products* 17:103-117.
- Lewandowski, I; Kicherer, A (1997). Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus x giganteus*. *European Journal of Agronomy* 6:163-177.
- Lewandowski, I; Schmidt, U (2006). Nitrogen, energy and land use efficiencies of miscanthus, reed canary grass and triticale as determined by the boundary line approach. *Agriculture Ecosystems and Environment* 112:335-346.
- 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 and Bioenergy* 25:335-361.
- Liebig, M. A; Schmer, M. R; Vogel, K. P; Mitchell, R. B (2008). Soil carbon storage by switchgrass grown for bioenergy. *Bioenergy Resource*. 1:245-222
- Lucas, R. W; Casper, B. B (2008). Ectomycorrhizal community and extracellular enzyme activity following simulated atmospheric N deposition. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1662-1669.
- Magid, J; Luxhøi, J; Lyshede, O. B (2004). Decomposition of plant residues at low temperatures separates turnover of nitrogen and energy rich tissue components in time. *Plant and Soil* 258:351-365.
- Machinet, G. E; Bertrand, I; Chabbert, B; Recous, S (2009). Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *European Journal of Soil Science* 60:176-185.
- Marland, G; Hamal, K; Jonas, M (2009). How uncertain are estimates of CO₂ emissions? *Journal of Industrial Ecology* 13:4-7.
- Martius, C; Hofer, H; Garcia, M. V. B; Rombke, J; Hanagarth, W (2004). Litter fall, litter

- stocks and decomposition rates in rainforest and agroforestry sites in central Amazonia. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 68: 137-154.
- Mary, B; Beaudoin, N; Justes, E; Machet, J. M (1999). Calculation of nitrogen mineralization and leaching in fallow soil using a simple dynamic model. *European Journal of Soil Science* 50:549-566.
- Matos, E. S; Freese, D; Slazak, A; Bachmann, U; Veste, M; Huttel, R. F (2010). Organic-carbon and nitrogen stocks and organic-carbon fractions in soil under mixed pine and oak forest stands of different ages in NE Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173:654-661.
- Maurer, T; Herrmann, L; Stahr, K (2009). The effect of surface variability factors on wind-erosion susceptibility: A field study in SW Niger. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 172:798-807.
- McFarland, J. W; Ruess, R. W; Kielland, K; Doyle, A. P (2002). Cycling dynamics of NH₄⁺ and amino acid nitrogen in soils of a deciduous boreal forest ecosystem. *Ecosystems* 5:775-788.
- McMahon, S. K; Williams, M. A; Bottomley, P. J; Myrold, D. D (2005). Dynamics of microbial communities during decomposition of carbon-13 labeled ryegrass fractions in soil. *Soil Science Society of America Journal* 69:1238-1247.
- Mele, P. M; Carter, M. R (1999). Impact of crop management factors in conservation tillage farming on earthworm density, age structure and species abundance in south-eastern Australia. *Soil and Tillage Research* 50:1-10.
- Michel, K; Matzner, E (2003). Response of enzyme activities to nitrogen addition in forest floors of different C-to-N ratios. *Biology and Fertility of Soils* 38:102-109.
- Michel, R; Mischler, N; Azambre, B; Finqueneisel, G; Machnikowski, J; Rutkowski, P; Zimny, T; Weber, J. V (2006). Miscanthus x Giganteus straw and pellets as sustainable

- fuels and raw material for activated carbon. *Environmental Chemistry Letters* 4:185-189.
- Miguez, F. E; Villamil, M. B; Long, S. P; Bollero, G. A (2008). Meta-analysis of the effects of management factors on *Miscanthus x giganteus* growth and biomass production. *Agricultural and Forest Meteorology* 148:1280-1292.
- Montagnini, F; Ugalde, L; Navarro, C (2003). Growth characteristics of some native tree species used in silvopastoral systems in the humid lowlands of Costa Rica. *Agroforestry Systems* 59:163-170.
- Monties, B (1984). Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* 4:387-392
- Monti, A; Zatta, A (2009). Root distribution and soil moisture retrieval in perennial and annual energy crops in Northern Italy. *Agricultural Ecosystems Environment* 132:252-259.
- Mourad, A. L; Coltro, L; Oliveira, P; Kletecke, R. M; Baddini, J (2007). A simple methodology for elaborating the life cycle inventory of agricultural products. *International Journal of Life Cycle Assessment* 12:408-413.
- Moyin-Jesu, E. I (2007). Use of plant residues for improving soil fertility, pod nutrients, root growth and pod weight of okra (*Abelmoschus esculentum* L). *Bioresource and Technology* 98:2057-2064.
- Mudrick, D. A; Hoosein, M; Hicks, R. R; Townsend, E. C (1994). Decomposition of Leaf litter in an Appalachian Forest: Effects of leaf species, aspect, slope position and time. *Forest Ecology and Management* 68:231-250.
- Murnen, H. K; Balan, V; Chundawat, S. P. S; Bals, B; Sousa, L. D; Dale, B. E (2007). Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnology Progress*

23:846-850.

- Naidu, S. L; Long, S. P (2004). Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C-4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an in vivo analysis. *Planta* 220:145-155.
- Nazareth, S. W; Sampy, J. D (2003). Production and characterisation of lignocellulases of *Panus tigrinus* and their application. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52:207-214.
- Neff, J. C; Townsend, A. R; Gleixner, G; Lehman, S. J; Turnbull, J; Bowman, W. D (2002). Variable effects of nitrogen additions on the stability and turnover of soil carbon. *Nature* 419:915-917.
- Nelson, R. G (2002). Resource assessment and removal analysis for corn stover and wheat straw in the Eastern and Midwestern United States - rainfall and wind-induced soil erosion methodology. *Biomass and Bioenergy* 22:349-363.
- Nemergut, D. R; Townsend, A. R; Sattin, S. R; Freeman, K. R; Fierer, N; Neff, J. C; Bowman, W. D; Schadt, C. W; Weintraub, M. N; Schmidt, S. K (2008). The effects of chronic nitrogen fertilization on alpine tundra soil microbial communities: implications for carbon and nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 10:3093-3105.
- Neto, C; Carranca, C; Clemente, J (2009). Senescent leaf decomposition in a Mediterranean pear orchard. *European Journal of Agronomy* 30:34-40.
- Neukirchen, D; Himken, M; Lammel, J; Czyionka-Krause, U; Olf, H. W (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.
- Nicolardot, B; Mary, B; Houot, S; Recous, S (1997). Nitrogen dynamics in cropland. *Controlling Nitrogen Concentration in Agrosystems* 83:87-103.
- Nicolardot, B; Recous, S; Mary, B (2001). Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: A simple dynamic model based on the C/N ratio of the residues.

Plant and Soil 228:83-103.

- Nikolaidou, A. E; Pavlatou-Ve, A. K; Kostopoulou, S. K; Mamolos, A. P; Kalburtji, K. L (2010). Litter quality and decomposition of *Vitis vinifera* L. residues under organic and conventional farming systems. *European Journal of Soil Biology* 46:208-217.
- Onyekwelu, J. C; Mosandl, R; Stimm, B (2006). Productivity, site evaluation and state of nutrition of *Gmelina arborea* plantations in Oluwa and Omo forest reserves, Nigeria. *Forest Ecology and Management* 229:214-227.
- Ordenez-Fernandez, R; Rodriguez-Lizana, A; Carbonell, R; Gonzalez, P; Perea, F (2007). Dynamics of residue decomposition in the field in a dryland rotation under Mediterranean climate conditions in southern Spain. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 79:243-253.
- Pandey, R. R; Sharma, G; Tripathi, S. K; Singh, A. K (2007). Litterfall, litter decomposition and nutrient dynamics in a subtropical natural oak forest and managed plantation in northeastern India. *Forest Ecology and Management* 240:96-104.
- Pastorelli, R; Piccolo, R; Landi, S (2009). Changes in active microbial soil communities in agricultural managements: from anthropic to natural. *Agrochimica* 53:386-397.
- Payne, W.J (1970). Energy yields and growth of heterotrophs. *Annual Review of microbiology* 24:17-52.
- Pelosi, C; Bertrand, M; Roger-Estrade, J (2009). Earthworm community in conventional, organic and direct seeding with living mulch cropping systems. *Agronomy for Sustainable Development* 29:287-295.
- Peyraud, J. L; Le Gall, A; Luscher, A (2009). Potential food production from forage legume-based-systems in Europe: an overview. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48:115-135.
- Pinck, L. A; Allison, F. E (1951). Resistance of a Protein-Montmorillonite Complex to

- Decomposition by Soil Microorganisms. *Science* 114:130-131.
- Poirier, N; Derenne, S; Balesdent, J; Rouzaud, J. N; Mariotti, A; Largeau, C (2002). Abundance and composition of the refractory organic fraction of an ancient, tropical soil (Pointe Noire, Congo). *Organic Geochemistry* 33:383-391.
- Poll, C; Marhan, S; Ingwersen, J; Kandeler, E (2008). Dynamics of litter carbon turnover and microbial abundance in a rye detritusphere. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1306-1321.
- Postma-Blaauw, M. B; de Goede, R. G. M; Bloem, J; Faber, J. H; Brussaard, L (2010). Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification. *Ecology* 91:460-473.
- Prasad, S; Singh, A; Joshi, H. C (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling* 50:1-39.
- Prechtel, A; von Lutzow, M; Schneider, B. U; Bens, O; Bannick, C. G; Kogel-Knabner, I; Huttl, R. F (2009). Organic carbon in soils of Germany: Status quo and the need for new data to evaluate potentials and trends of soil carbon sequestration. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 172:601-614.
- Puget, P; Drinkwater, L. E (2001). Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous manure. *Soil Science Society of America Journal* 65:771-779
- Qin, S. P; He, X. H; Hu, C. S; Zhang, Y. M; Dong, W. X (2010). Responses of soil chemical and microbial indicators to conservational tillage versus traditional tillage in the North China Plain. *European Journal of Soil Biology* 46:243-247.
- Rabary, B; Sall, S; Letourmy, P; Husson, O; Ralambofetra, E; Moussa, N; Chotte, J. L (2008). Effects of living mulches or residue amendments on soil microbial properties in direct seeded cropping systems of Madagascar. *Applied Soil Ecology* 39:236-243.
- Raghu, S; Anderson, R. C; Daehler, C. C; Davis, A. S; Wiedenmann, R. N; Simberloff, D;

- Mack, R. N (2006). Adding biofuels to the invasive species fire? *Science* 313:1742-1742.
- Ranases, A; Hanson, K; Shapouri, H (1998). Economic impacts from shifting cropland use from food to fuel. *Biomass and Bioenergy* 15:417-422.
- Rasse, D. P; Rumpel, C; Dignac, M. F (2005). Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilization. *Soil Biology and Biochemistry* 269:341-356
- Recous, S; Robin, D; Darwis, D; Mary, B (1995). Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1529-1538.
- Riche, A. B; Christian, D. G (2001). Estimates of rhizome weight of Miscanthus with time and rooting depth compared to switchgrass. *Aspects of Applied Biology* 65:147-152.
- Riche, A. B; Yates, N. E; Christian, D. G (2008). Performance of 15 different Miscanthus species and genotypes over 11 years. *Aspects of Applied Biology* 90:207-212.
- Rodriguez-Lizana, A;, Carbonell, R; Gonzalez, P; Ordonez, R. N (2010). P and K released by the field decomposition of residues of a pea-wheat-sunflower rotation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 87:199-208.
- Roldan, A; Caravaca, F; Hernandez, M. T; Garcia, C; Sanchez-Brito, C; Velasquez, M; Tiscareno, M (2003). No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). *Soil and Tillage Research* 72:65-73.
- Rousk, J; Baath, E (2007). Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology* 62:258-267.
- Rutigliano, F. A; Castaldi, S; D'Ascoli, R; Papa, S; Carfora, A; Marzaioli, R; Fioretto, A (2009). Soil activities related to nitrogen cycle under three plant cover types in Mediterranean environment. *Applied Soil Ecology* 43:40-46.
- Saffih-Hdadi, K; Mary, B (2008). Modeling consequences of straw residues export on soil

- organic carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 40:594-607
- Sall, S; Bertrand, I; Chotte, J. L; Recous, S (2007). Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biology and Fertility of Soils* 43:797-804.
- Sanderson, M. A; Adler, P. R (2008). Perennial forages as second generation bioenergy crops. *International Journal of Molecular Sciences* 9:768-788.
- Scheller, E; Joergensen, R. G (2008). Decomposition of wheat straw differing in nitrogen content in soils under conventional and organic farming management. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 171:886-892.
- Schimel, J. P; Weintraub, M. N (2003). The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35:549-563.
- Schneckenberger, K; Kuzyakov, Y (2007). Carbon sequestration under Miscanthus in sandy and loamy soils estimated by natural C-13 abundance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 170:538-542.
- Schöning, I; Kogel-Knabner, I (2006). Chemical composition of young and old carbon pools throughout Cambisol and Luvisol profiles under forests. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2411-2424.
- Schulze, K; Borken, W; Muhr, J; Matzner, E (2009). Stock, turnover time and accumulation of organic matter in bulk and density fractions of a Podzol soil. *European Journal of Soil Science* 60:567-577.
- Schwarz, K. U; Murphy, D. P. L; Schnug, E (1994). Studies of the growth and yield of Miscanthus x giganteus in Germany. *Aspects Applied Biology* 40:533-540
- Semwal, R. L; Maikhuri, R. K; Rao, K. S; Sen, K. K; Saxena, K. G (2003). Leaf litter

- decomposition and nutrient release patterns of six multipurpose tree species of central Himalaya, India. *Biomass and Bioenergy* 24:3-11.
- Simon, D; Tyner, W. E; Jacquet, F (2010). Economic analysis of the potential of cellulosic biomass available in France from agricultural residue and energy crops. *Bioenergy Research* 3:183-193.
- Singh, K. P; Singh, P. K; Tripathi, S. K (1999). Litterfall, litter decomposition and nutrient release patterns in four native tree species raised on coal mine spoil at Singrauli, India. *Biology and Fertility of Soils* 29:371-378.
- Sinsabaugh, R. L (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:391-404.
- Smukler, S. M; Sanchez-Moreno, S; Fonte, S. J; Ferris, H; Klonsky, K; O'Geen, A. T; Scow, K. M; Steenwerth, K. L; Jackson, L. E (2010). Biodiversity and multiple ecosystem functions in an organic farmscape. *Agriculture Ecosystems and Environment* 139:80-97.
- Snajdr, J; Valaskova, V; Merhautova, V; Herinkova, J; Cajthaml, T; Baldrian, P (2008). Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2068-2075.
- Sorensen, A; Teller, P. J; Hilstrom, T; Ahring, B. K (2008). Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresource and Technology* 99:6602-6607.
- Sparrow, S. D; Lewis, C. E; Knight, C. W (2006). Soil quality response to tillage and crop residue removal under subarctic conditions. *Soil and Tillage Research* 91:15-21.
- St Clair, S; Hillier, J; Smith, P (2008). Estimating the pre-harvest greenhouse gas costs of energy crop production. *Biomass and Bioenergy* 32:442-452.
- Stone, L. R; Schlegel, A. J (2010). Tillage and Crop Rotation Phase Effects on Soil Physical Properties in the West-Central Great Plains. *Agronomy Journal* 102:483-491.

- Styles, D; Jones, M. B (2007). Energy crops in Ireland: Quantifying the potential life-cycle greenhouse gas reductions of energy-crop electricity. *Biomass and Bioenergy* 31:759-772.
- Swift, M.J; Heal, O. W; Anderson, J. M (1979). Decomposition in terrestrial ecosystems. *Studies in Ecology Vol 5. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK*, pp. 372.
- Taherzadeh, M. J; Niklasson, C; Liden, G (1999). Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Bioresource and Technology* 69:59-66.
- Tian, G; Kang, B. T; Brussaard, L (1992). Biological effects of plant residues with contrasting chemical-compositions under humid tropical conditions: decomposition and nutrient release. *Soil Biology and Biochemistry* 24:1051-1060.
- Tian, G; Brussaard, L; Kang, B.T (1995). An index for assessing the quality of plant residues and evaluating their effects on soil and crop in the (sub-)humid tropics. *Applied Soil Ecology* 2:25-32.
- Tilman, D; Hill, J; Lehman, C (2006). Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. *Science* 314:1598-1600.
- Trinsoutrot, I; Recous, S; Bentz, B; Linères, M; Chèneby, D; Nicolardot, B (2000). Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64:918-926
- Tripathi, S. K; Singh, K. P (1992). Abiotic and litter quality control during the decomposition of different plant parts in dry tropical bamboo savanna in India. *Pedobiologia* 36:241-256.
- Tripathi, S. K; Sumida, A; Shibata, H; Ono, K; Uemura, S; Kodama, Y; Hara, T (2006). Leaf litterfall and decomposition of different above- and belowground parts of birch (*Betula*

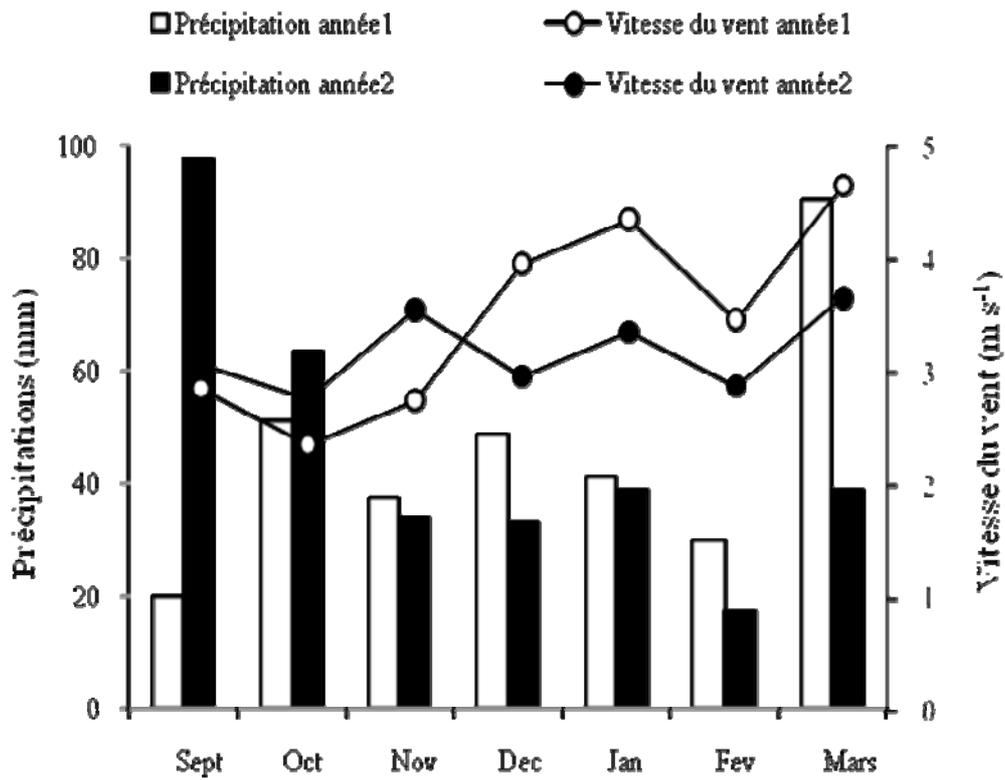
- ermanii) trees and dwarf bamboo (*Sasa kurilensis*) shrubs in a young secondary forest in Northern Japan. *Biology and Fertility of Soils* 43:237-246.
- Trofymow, J. A; Moore, T. R; Titus, B; Prescott, C; Morrison, I; Siltanen, M; Smith, S; Fyles, J; Wein, R; CamirT, C; Duschene, L; Kozak, L; Kranabetter, M; Visser, S (2002). Rates of litter decomposition over 6 years in Canadian forests: influence of litter quality and climate. *Canadian Journal of Forest Research* 32:789-804.
- Tuck, G; Glendining, M. J; Smith, P; House, J. I; Wattenbach, M (2006). The potential distribution of bioenergy crops in Europe under present and future climate. *Biomass and Bioenergy* 30:183-197.
- Valagkova, V; Baldrian, P (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology* 157:119-124.
- Verkler, T. L; Brye, K. R; Gur, E. E; Popp, J. H; Amuri, N (2008). Residue management and water delivery effects on season-long surface soil water dynamics in soybean. *Soil Science* 173:444-455.
- Volk, T. A; Verwijst, T; Tharakan, P. J; Abrahamson, L. P; White, E. H (2004). Growing fuel: a sustainability assessment of willow biomass crops. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2:411-418.
- Vymazal, J; Kropfelova, L; Svehla, J; Stichova, J (2010). Can multiple harvest of aboveground biomass enhance removal of trace elements in constructed wetlands receiving municipal sewage? *Ecological Engineering* 36:939-945.
- Waldrop, M. P; Zak, D. R; Sinsabaugh, R. L (2004). Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1443-1451.
- Wallis, P. D; Haynes, R. J; Hunter, C. H; Morris, C. D (2010). Effect of land use and

- management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology* 46:147-150.
- Walter, A; Rosillo-Calle, F; Dolzan, P; Piacente, E; da Cunha, K. B (2008). Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass and Bioenergy* 32:730-748.
- Wang, W. J; Baldock, J. A; Dalala, R. C; Moody, P. W (2004). Decomposition dynamics of plant materials in relation to nitrogen availability and biochemistry determined by NMR and wet-chemical analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 36:2045-2058.
- Wardle, D. A (2002). Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components. *Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components*: vii + 392 pp.
- Wilson, G. V; McGregor, K. C; Boykin, D (2008). Residue impacts on runoff and soil erosion for different corn plant populations. *Soil and Tillage Research* 99:300-307.
- Wilson, J.R; Hatfield, R.D (1997). Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research* 48:165-180.
- Wise, M; Calvin, K; Thomson, A; Clarke, L; Bond-Lamberty, B; Sands, R; Smith, S. J; Janetos, A; Edmonds, J (2009). Implications of limiting CO₂ concentrations for land use and energy. *Science* 324:1183-1186.
- Woli, K. P; David, M. B; Darmody, R. G; Mitchell, C. A; Smith, C. M (2010). Assessing the nitrous oxide mole fraction of soils from perennial biofuel and corn-soybean fields. *Agriculture Ecosystems and Environment* 138:299-305.
- Yadvinder, S; Gupta, R. K; Jagmohan, S; Gurpreet, S; Gobinder, S; Ladha, J. K (2010). Placement effects on rice residue decomposition and nutrient dynamics on two soil types during wheat cropping in rice-wheat system in northwestern India. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 88:471-480.

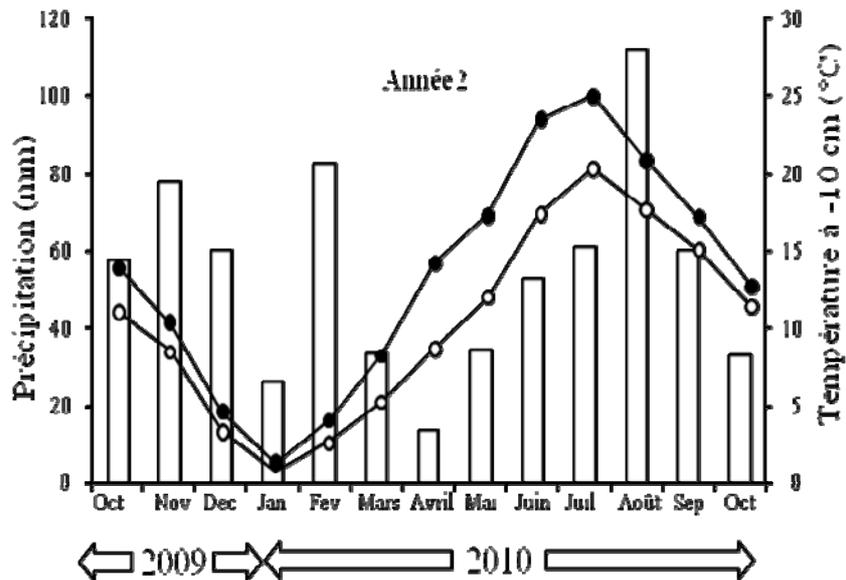
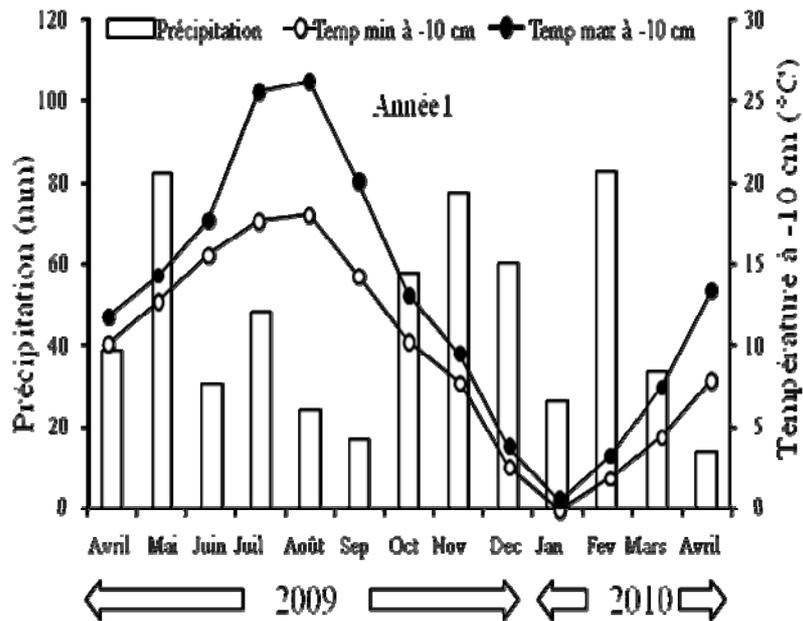
- Zeglin, L. H; Stursova, M; Sinsabaugh, R. L; Collins, S. L (2007). Microbial responses to nitrogen addition in three contrasting grassland ecosystems. *Oecologia* 154:349-359.
- Zhang, C. F; Meng, F. R; Bhatti, J. S; Trofymow, J. A; Arp, P. A (2008). Modeling forest leaf-litter decomposition and n mineralization in litterbags, placed across Canada: a 5-model comparison. *Ecological Modelling* 219:342-360.
- Zhao, X; Rignall, T. R; McCabe, C; Adney, W. S; Himmel, M. E (2008). Molecular simulation evidence for processive motion of *Trichoderma reesei* Cel7A during cellulose depolymerization. *Chemical Physics Letters* 460:284-288.
- Zinn, Y. L; Lal, R; Resck, D. V. S (2005). Changes in soil organic carbon stocks under agriculture in Brazil. *Soil and Tillage Research* 84:28-40.

Annexes

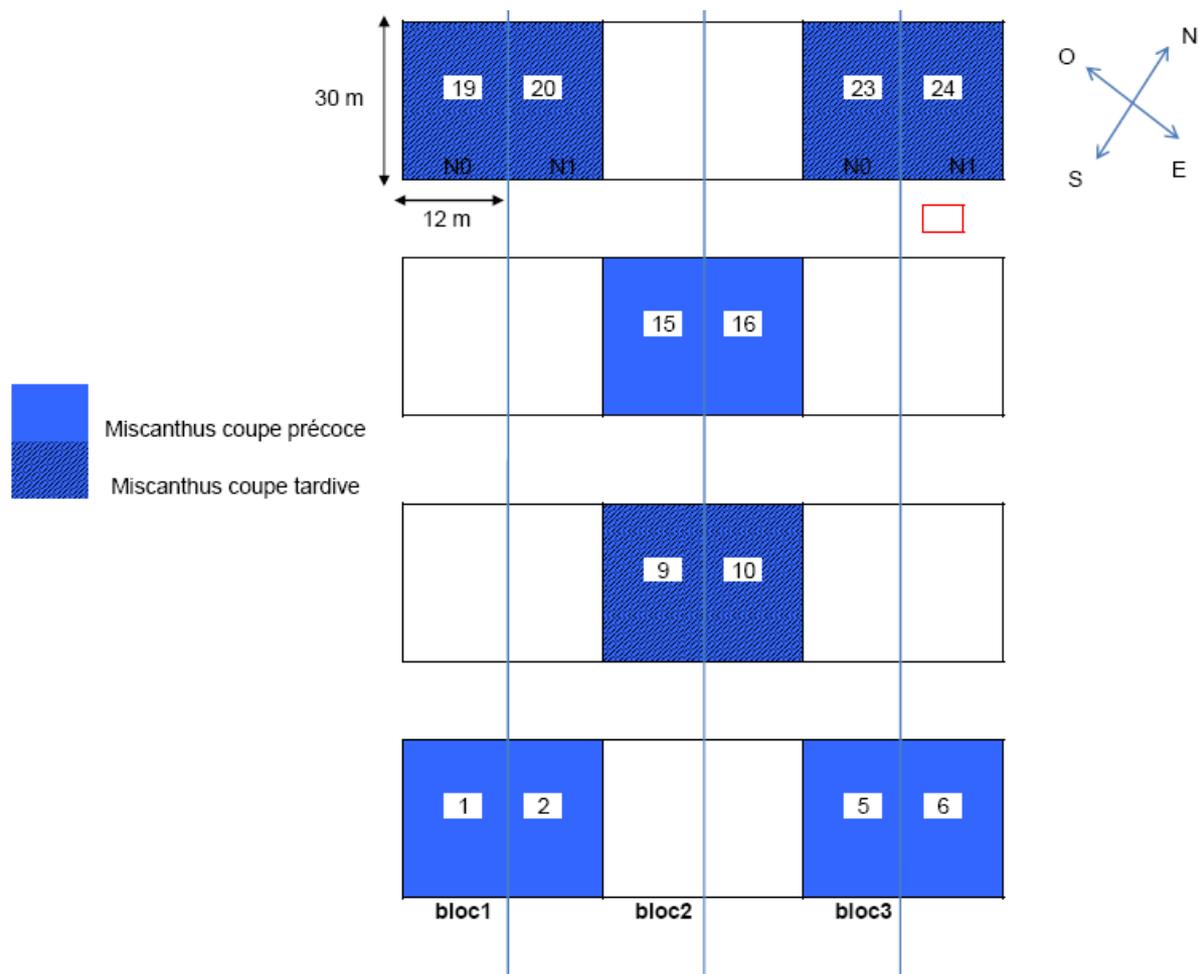
Annexes



Annexe 1 : Variations mensuelles des hauteurs de précipitations et des vitesses du vent. Les variables ont été enregistrées de septembre 2007 à mars 2008 (année 1), et de septembre 2008 à mars 2009 (année 2).



Annexe 2 : Variations mensuelles des hauteurs de précipitations et des températures minimales et maximales du sol à -10 cm. Les variables ont été enregistrées d'avril 2009 à avril 2010 (année 1) et d'octobre 2009 à octobre 2010 (année 2) sur le site d'étude (Estrées Mons, Nord de la France).



Annexe 3 : Parcelles de *Miscanthus giganteus* sur le dispositif 'biomasse énergie' (Estrées-Mons, Région Picardie, 49°80'N, 3°60'E). La taille d'une parcelle élémentaire est 30m×12m. Les plantes reçoivent début avril 0 (N0) ou 120 kg N ha⁻¹ (N1) sous la forme d'une solution ammonium nitrate urée. Les *Miscanthus* coupe précoce sont toujours récoltés en automne (maximum de biomasse), alors que ceux coupe tardive sont récoltés en hiver à la sénescence de la plante.

Quality and decomposition in soil of rhizome, root and senescent leaf from *Miscanthus x giganteus*, as affected by harvest date and N fertilization

Norbert Amougou · Isabelle Bertrand ·
Jean-Marie Machet · Sylvie Recous

Received: 31 October 2009 / Accepted: 18 May 2010 / Published online: 4 June 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract To predict the environmental benefits of energy crop production and use, the nature and fate of biomass residues in the soil need to be quantified. Our objective was to quantify *Miscanthus x giganteus* biomass recycling to soil and to assess how harvesting time and N fertilization affect their characteristics and subsequent biodegradability. The quantification of aerial and belowground biomass and their sampling were performed on 2- and 3-year-old *Miscanthus* stands, either fertilized with 120 kg N ha⁻¹ year⁻¹ or not fertilized, in autumn (maximal biomass production) and winter (maturity). Plant biomass was chemically characterized (total sugars, Klason lignin, C/N) and incubated in optimum decomposition conditions (15°C, -80 kPa) for 263 days, for C and N

mineralization. Accumulation of carbon in rhizomes and roots was 7.5 to 10 t C ha⁻¹ and represented about 50% of total plant biomass C. Senescent leaves represented about 1.5 t C ha⁻¹ year⁻¹. All residues, especially the roots, had high lignin contents, while the rhizomes also had a high soluble content due to their nutrient storage function. The C mineralization rates were closely related to the chemical characteristics of the residue, higher sugar and lower lignin contents leading to faster decomposition, as observed for rhizomes.

Keywords Carbon · Energy crop · Litter quality · *Miscanthus* · Mineralization · Nitrogen

Responsible Editor: M. Francesca Cotrufo.

N. Amougou · I. Bertrand · S. Recous (✉)
INRA, UMR614 FARE,
2 Esplanade Roland Garros,
51100 Reims, France
e-mail: sylvie.recous@reims.inra.fr

N. Amougou · I. Bertrand · S. Recous
URCA, UMR614 FARE,
2 Esplanade Roland Garros,
51100 Reims, France

J.-M. Machet
INRA, US1158 Agro-Impact,
rue F. Christ,
02000 Laon, France

Introduction

Increased concern for the negative impact of fossil fuels on the environment, particularly greenhouse gas emissions, has put pressure to find energy alternatives such as the use of plant biomass. To replace fossil carbon with biomass carbon, the most suitable plant species and the most appropriate agricultural management systems must be selected to meet both industrial and environmental constraints. However, removing crop residues or plant litter from fields for industrial uses is controversial, and studies have demonstrated the negative impact of litter and residue removal on soil carbon stocks and fertility (Lal 2005, 2009; Saffih-Hdadi and Mary 2008).

Abstract

To control emissions of greenhouse gases (CO₂, NO), fossil fuels scarcity and their rising prices lead to consider the substitution of fossil C by the "renewable" C from plant biomass. This alternative strategy must be sustainable. In particular the massive export of plant biomass depriving soil of plant residues (eg cereal straws), and the growing of new crops specially perennial crops (eg miscanthus) questioned the cultural practices (dates and frequency of biomass export) essential for maintaining soil fertility and good management of biogeochemical cycles. *Miscanthus × giganteus*, a rhizomatous perennial grass is dedicated to second-generation fuels production, because of its high potential biomass production.

In this context the main objective of this work was to quantify and characterize *Miscanthus* plant litter recycled to soil, more precisely senescent leaves, roots and rhizomes of *Miscanthus*, and to study the C and N mineralization during decomposition of these litters. This work was performed on 3 to 5 years old *Miscanthus* stands established since 2006 in Northern France (Estrées Mons), either fertilized with 120 kg N ha⁻¹ year⁻¹ or unfertilized. The sampling of litters was performed in autumn (maximal biomass production) and winter (maturity). Firstly we quantified and biochemically characterized *Miscanthus* senescent leaves, rhizomes and roots. Then we studied their decomposition in soil under controlled conditions (15°C, -80 kPa) during 263 days. We also investigated in the field for two years the dynamics of leaf fall during senescence, their accumulation in the form of mulch on soil surface and the kinetics of decomposition. Finally we investigated under controlled conditions the effects of nitrogen availability on C and N dynamics, microbial dynamics and enzymatic functions during the decomposition of these leaves. N availability was modulated either by adding inorganic nitrogen, or by adding increasing amounts of leaves for a given amount of nitrogen in soil.

Our results showed that the C stored in the three "compartments" recycled to soil is potentially considerable: senescent leaves (1 to 3 t C ha⁻¹ year), roots (1 to 2 t C ha⁻¹) and rhizomes (7 to 10 t C ha⁻¹). The rhizomes had a high NDS soluble content (25 to 35%), a high N content (0.7 to 1.5%) and low lignin content (11 to 15%) depending on early or late harvest dates. We observed after 263 days of decomposition at 15°C a higher carbon mineralization from rhizomes 61 ± 8%, than that observed for roots (36 ± 8%) and senescent leaves (53 ± 4%). We also showed the importance of senescent leaves in the recycling of organic matter in the soil: the early harvest scenario deprives the soil of an annual leaves of 1-3 t C ha⁻¹. Qualitatively, the low degradability observed in the laboratory experiment for the leaves was confirmed in the field. This leads to the formation of an important thick layer of mulch (2 to 4cm) and quantitatively (6-7 t C ha⁻¹). Finally, a high N availability increases the C mineralization rate in the short term which was reflected by an increase in microbial C, fungal ergosterol, and enzymatic activities related to C and N degradation of (xylanase, leucine aminopeptidase). However, this high N availability suppresses laccase activity. We also showed that decreasing N availability for decomposers by adding increasing amounts of leaves in the soil leads to slow microbial and fungal growth. However, this situation favors an early installation of fungal biomass (increased ergosterol / microbial C ratio) and their activity (laccase).

This work showed that the cultivation of *Miscanthus* potentially allows a large accumulation of organic C which is favorable to the maintenance of soil fertility in the long term. It is now essential to predict the fate of underground C parts of *Miscanthus*, in the perspective of change in land use, i.e. when the *Miscanthus* stands is to be replaced in field by another crop.

Keywords: *Miscanthus giganteus*, carbon, nitrogen, organic matter, mineralization, chemical quality

Résumé

La nécessité de maîtriser les émissions de GES (CO₂, NO), la raréfaction et la hausse du prix des carburants fossiles conduisent à envisager la substitution du C fossile par du C « renouvelable » c'est-à-dire issu de la biomasse végétale. Cette stratégie de substitution doit être durable. En particulier l'exportation massive de biomasse végétale privant le sol des restitutions de résidus végétaux (par exemple pour les pailles de céréales) ; et l'implantation de nouvelles cultures notamment des plantes pérennes (par exemple le miscanthus) interrogent sur les pratiques culturales, notamment les dates et les fréquences d'exportation, indispensables pour le maintien de la fertilité des sols et une bonne gestion des cycles biogéochimiques. *Miscanthus × giganteus*, plante pérenne à rhizome est une des plantes « candidate » pour la production des carburants de seconde génération, en raison de son fort potentiel de production de biomasse, y compris en conditions tempérées.

Dans ce contexte l'objectif principal de ce travail de thèse était de quantifier et caractériser les litières végétales recyclées vers le sol sous culture de *Miscanthus*, plus précisément les feuilles sénescents, les racines et rhizomes de *Miscanthus* et d'étudier la minéralisation du C et N au cours de leur décomposition. Ce travail s'est appuyé sur un essai au champ de *Miscanthus × giganteus*, âgé de 3 à 5 ans, implanté depuis 2006 à Estrées-Mons (Nord de la France), et croisant 2 dates de récolte (une récolte précoce avant l'hiver et une récolte tardive après l'hiver en fin de cycle annuel) et 2 niveaux de fertilisation azotée (0 kg N ha⁻¹ et 120 kg N ha⁻¹). Tout d'abord sur les litières prélevées sur cet essai, nous avons quantifié, caractérisé biochimiquement et étudié la minéralisation en conditions contrôlées des feuilles sénescents, rhizomes et racines. Ensuite la dynamique de chute des feuilles au cours de la sénescence, leur accumulation sous forme de mulch à la surface du sol et les cinétiques de décomposition ont été étudiées au champ pendant deux années. Enfin nous avons étudié les effets de la disponibilité de l'azote sur la dynamique du C et N, la dynamique microbienne et des fonctions enzymatiques au cours de la décomposition de ces feuilles, en conditions contrôlées. La disponibilité en N a été modulée soit en apportant de l'azote minéral, soit en apportant des quantités croissantes de feuilles pour une quantité d'azote donnée.

Nous montrons que le C stocké dans les trois « compartiments » recyclés potentiellement au sol est considérable: feuilles sénescents (1 à 3 t C ha⁻¹ par an), racines (1 à 2 t C ha⁻¹) et rhizomes (7 à 10 t C ha⁻¹). Les rhizomes, ont une teneur en soluble-NDS de 25 à 35% et une teneur en lignine de 11 à 15% selon les prélèvements précoces ou tardifs, et une teneur en N élevée (0.7-1.5%). On observe en 263 jours à 15 °C, une minéralisation des rhizomes représentant 61±8% du C apporté, supérieure à celle observée pour les racines (36±8%) et les feuilles sénescents (53±4%). Nous montrons l'importance des feuilles sénescents de *Miscanthus* dans le recyclage de matière organique vers le sol : le scénario de récolte précoce prive le sol d'un recyclage annuel de 1-3 t C ha⁻¹ ; d'autre part qualitativement, la faible dégradabilité observée au laboratoire pour les feuilles est confirmée au champ, ce qui conduit à la formation d'un mulch important en épaisseur (2 à 4cm) et en quantité (équivalent à 6 à 7 t C ha⁻¹). Enfin, une forte disponibilité en N accélère la vitesse de minéralisation du C à court terme. Ceci se traduit aussi par une augmentation du C microbien et de l'ergostérol, marqueur fongique, ainsi que des activités enzymatiques liées à la dégradation du C et N (xylanase, leucine aminopeptidase). En revanche cette disponibilité forte en N réprime l'activité laccase. Nous montrons aussi que diminuer la disponibilité relative en N pour les décomposeurs, par ajout de quantités croissantes de feuilles dans le sol conduit à ralentir la croissance microbienne et fongique. Cette situation favorise très tôt l'installation de la biomasse fongique (augmentation du rapport ergostérol/C microbien) et son activité (laccase).

Ce travail montre que la culture de *Miscanthus* permet potentiellement une forte accumulation de C organique ce qui est favorable au maintien de la fertilité des sols à long terme. Il est maintenant essentiel de pouvoir prédire le devenir du C des parties souterraines de *Miscanthus*, dans la perspective de changement dans l'utilisation des terres.

Mots clés : *Miscanthus giganteus*, carbone, azote, matières organiques, minéralisation, qualité chimique