

Synthèses

Production durable de biomasse

La lignocellulose des poacées

Denis Pouzet



éditions
Quæ

Production durable de biomasse

La lignocellulose des poacées

Denis Pouzet

Éditions Quæ
c/o Inra, RD 10, 78026 Versailles Cedex

Collection Synthèses

La truite arc-en-ciel. Biologie et élevage

Bernard Jalabert et Alexis Fostier

2010, 336 p.

Les maladies émergentes. Épidémiologie chez le végétal, l'animal et l'homme

Jacques Barnouin et Ivan Sache, coord.

2010, 464 p.

Le système alimentaire mondial : concepts et méthodes, analyses et dynamiques

Jean-Louis Rastoin et Gérard Ghersi

2010, 584 p.

Muscle et viande de ruminant

Dominique Bauchart et Brigitte Picard, coord.

2010, 312 p.

Gestion participative des forêts d'Afrique centrale

Daou Véronique Joiris et Patrice Bigombé Logo, coord.

2010, 248 p.

Introductions d'espèces dans les milieux aquatiques – Faut-il avoir peur des invasions biologiques ?

Jean-Nicolas Beisel et Christian Lévêque

2010, 248 p.

Table des matières

Avant propos	1
Chapitre 1. Bases physiologiques de l'élaboration de la biomasse	3
Du carbone « minéral » au carbone organique	3
Principes de base et variabilité	3
Les types photosynthétiques	7
Les facteurs du rendement photosynthétique	20
L'incorporation du CO ₂ dans le cycle de Calvin	20
L'efficacité de l'eau	24
L'efficacité minérale	26
La température	28
La lumière	30
Potentialités photosynthétiques et agricoles	34
Photosynthèse et adaptation	34
Photosynthèse et rendement	38
Chapitre 2. Bases agronomiques de la production de lignocellulose	43
Caractérisation des poacées pour la biomasse	43
Les plantes importantes	43
Quelques spécificités	46
La biomasse fibreuse de la filière sucrière	54
Les sources de lignocellulose	54
La durabilité de la production	64
Les potentialités de production de fibre	77
Stratégie de production	77
Les choix variétaux	78
La fibre dans la plante	83
La tige	83
La feuille	96
Chapitre 3. Composition et synthèse des fibres	99
Origine des fibres	99
Les composantes chimiques	100

Composition globale	100
Composition des sources de fibre	101
Évolution des constituants au cours du cycle	105
Les principaux polymères glucidiques	106
La cellulose	106
Les hémicelluloses	110
Les lignines et phénols associés	114
Introduction	114
Origine métabolique et composition	115
Principales caractéristiques	121
Modulation de la biosynthèse des lignines	128
Le dosage des lignines	133
Synthèse et agencement chimique	133
La paroi cellulaire	133
Les sites de synthèse de la lignocellulose.	134
Chronologie de la synthèse des parois	136
Organisation des polymères pariétaux	138
Quelques pistes de recherche	140
Chapitre 4. Traitements post récolte de la lignocellulose et principaux usages	143
Les filières post récolte	143
Caractérisation physico-chimique de la ressource	144
Le démoellage	148
Le stockage	154
Usages et procédés industriels	162
Principaux usages	162
Utilisation de la fibre brute	163
Le défibrage	165
Usage énergétique	173
Introduction	173
Les bases de l'évaluation énergétique	174
La valeur énergétique	175
La teneur minérale	181
L'humidité	182
Particularités des cannes fibreuses	185
Références bibliographiques	187

Avant propos

La biomasse lignocellulosique des plantes est une ressource abondante, peu onéreuse renouvelable et largement sous employée. Elle est essentiellement composée par les fibres constitutives des parois cellulaires. La biomasse est ainsi une importante ressource de fibres renouvelables, mais aussi une source d'énergie et une base de la chimie verte.

Les conditions économiques et environnementales sont aujourd'hui favorables aux usages de la lignocellulose. Sa valorisation est cependant limitée par la difficulté de séparation de ses composantes du fait, d'une grande stabilité chimique, de la multiplicité des composants et de leurs dilutions. Ces contraintes sont les objectifs actuels de nombreuses recherches.

Les poacées pérennes à cycle photosynthétique en C_4 , qui se multiplient par voie végétative sont les plantes les plus performantes pour la production de biomasse. Elles ont le rendement photosynthétique le plus élevé des plantes terrestres. Leur mode de reproduction leur octroie un avantage écologique et une meilleure tolérance aux aléas climatiques. Elles répondent, contrairement aux cultures arbustives, aux impératifs économiques de la grande majorité des systèmes de culture dont l'économie impose une commercialisation annuelle de la production. Les poacées en C_4 présentent en outre un bon niveau de tolérance aux stress biotiques et abiotiques.

L'intérêt pour la biomasse lignocellulosique des poacées n'est pas nouveau. Il a été historiquement étudié par Alexander (1973) à Puerto Rico. L'auteur fut l'un des premiers à mettre en évidence les potentialités exceptionnelles pour la production de biomasse de la canne à sucre sélectionnée pour la fibre et des *Pennisetum purpureum*. Cet intérêt est aussi démontré par l'extension actuelle de la culture de *Miscanthus* sp. dans les zones tempérées du nord de l'Europe et du continent américain.

Cette synthèse porte sur les fibres lignocellulosiques, avec la canne à sucre comme modèle type de poacées pérennes en C_4 à multiplication végétative. Les problématiques d'allocation des produits de la photosynthèse dans la plante, qui sont cruciaux dès lors que l'on s'intéresse à une partie spécifique de la production comme un organe (fruit, graine, racine, tubercule...) ou un composé métabolique particulier (sucre, amidon, huile, protéines, latex..) ne sont pas abordées.

Nous traitons dans le premier chapitre les caractéristiques d'adaptation et de productivité liées au type photosynthétique. Notre propos est d'expliquer les raisons pour lesquelles certaines cultures sont plus durables que d'autres dans un environnement donné. Les problématiques agronomiques de production de biomasse et de fibre sont ensuite traitées autour de l'exemple de la canne à sucre. L'analyse est axée sur

les qualités de durabilité des systèmes de culture dédiés à la lignocellulose. Le troisième chapitre aborde les connaissances actuelles sur la composition de fibre et les modalités de sa synthèse. Il est orienté vers l'intérêt des composantes pour la plante et sa culture et pour des usages industriels qui entrent dans le cadre de la chimie verte. Le dernier chapitre illustre les problématiques post récolte et les principaux usages de la biomasse lignocellulosique.

Les usages chimiques, qui sont souvent évoqués, n'ont pas été traités spécifiquement. Ils sont en effet très nombreux, font le plus souvent l'objet de brevets et ne peuvent être abordés que par des spécialistes de la chimie.

Chapitre 1

Bases physiologiques de l'élaboration de la biomasse

Les principes de la durabilité conduisent à organiser la production autour des cultures les plus performantes. Ces performances doivent être associées à un faible coût et une incidence environnementale minimale pour un contexte pédoclimatique et socio-économique donné.

Les performances recherchées, dépendent de l'efficacité des plantes à utiliser les ressources environnementales. La variabilité de l'efficacité des principaux facteurs trophiques que sont la lumière, la chaleur, l'eau et l'azote pour produire de la biomasse, dépend au départ du type photosynthétique de la culture.

Ce chapitre décrit les caractéristiques des systèmes photosynthétiques des plantes pour identifier les composantes qui ont un rôle clef dans l'élaboration de la biomasse. Nous recherchons ainsi, au travers d'une revue bibliographique, les critères de choix des cultures pour optimiser une production durable de lignocellulose dans un milieu donné.

La principale dimension de la durabilité abordée ici est l'environnement traité sous l'angle de la compétitivité et de l'adaptation de l'appareil photosynthétique au biotope. L'adaptation est abordée sous l'angle de l'évolution lorsque des informations sont disponibles.

» Du carbone « minéral » au carbone organique

Principes de base et variabilité

La réaction générale pour qualifier la photosynthèse correspond à la fabrication d'une molécule de glucose à partir d'eau et de gaz carbonique.



Il s'agit bien évidemment d'un schéma didactique qui cache une grande complexité largement détaillée dans les manuels de physiologie végétale, de biochimie et de

biologie moléculaire. La première molécule formée par la photosynthèse n'est pas un sucre en C₆ comme l'indique l'équation mais une molécule plus petite qui va permettre la synthèse du sucre en C₆. Il existe en effet trois types photosynthétiques principaux chez les plantes terrestres. Les types en C₃ et en C₄ qui doivent leurs noms au nombre d'atomes de carbone de la première molécule stable formée à partir du captage du CO₂ et le type CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*).

Le type C₃ est le plus fréquent dans les plantes terrestres. Sage (2001) estime que seules 7 500 des 25 000 espèces de plantes vasculaires (*higher plant species*) sont de type C₄.

Bien que peu représentées dans la biosphère, les plantes de type C₄ contribuent à 80 % de la production primaire dans les zones tropicales et subtropicales. Les plantes de type C₄ ont de plus une importance économique considérable, en zone tropicale comme tempérée. Le type C₄ regroupe en effet des espèces alimentaires majeures comme le maïs, le mil, le sorgho ou la canne à sucre, qui sont aussi des espèces remarquables par la composante biomasse ligno-cellulosique de leur production.

Les plantes en C₄ subdivisées comme nous le verrons plus loin en 3 sous-types, appartiennent en grande majorité aux monocotylédones tropicales. Les dicotylédones sont peu représentées (tableau 1). Les C₄ sont caractérisées par une faible diversité de formes. En dehors des plantes herbacées mono ou dicotylédones, le type photosynthétique ne comporte aucune espèce d'arbre (plantes de plus de 15 m) et de liane (*vine*). On ne dénombre en outre qu'environ 500 espèces d'arbustes, issues pour la plupart de zones arides (*xerophitic*) et très souvent caractérisées par une bonne résistance au sel (*halophytic*).

Tableau 1. Répartition des types C₄ dans les familles de plantes (d'après Sage, 2001).

Cotylédones	Familles	Nombre en C ₄		Proportion C ₄ (%)	
		Espèces	Genres	Espèces	Familles
Mono	<i>Poaceae</i>	4 600	372	61	46
	<i>Cyperaceae</i>	1 300	28	18	27
	Toutes	6 000	401	79	
Di	<i>Chenopodiaceae</i>	550	45	7	39
	<i>Amaranthaceae</i>	250	11	3	25
	<i>Euphorbiaceae</i>	250	1	3	5
	Toutes	1 600	86	21	

Le type CAM constitue une variante du type C₄ dont la particularité est un report nocturne des dernières étapes de la fixation du carbone. Nous n'abordons pas ce type, car il est constitué de plantes subdésertiques ou désertiques qui ont un intérêt le plus souvent marginal pour la production de biomasse cultivée (cactacées, crassulacées, euphorbiacées...). La différence essentielle entre les types C₄ et CAM est que la première molécule à 4 atomes de carbone formée (oxaloacétate) n'apparaît que la nuit pour les CAM.

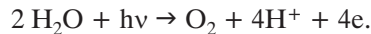
Nous verrons que la réalité est beaucoup plus complexe car il existe des plantes dont le processus photosynthétique est intermédiaire entre les C₃, les CAM et les C₄, mais aussi entre les 3 sous-types de plantes en C₄.

Aujourd'hui, les trois types sont largement distribués géographiquement, avec une tendance adaptative aux zones chaudes soumises à des régimes de mousson pour les C₄, aux zones chaudes et désertiques pour les CAM et aux zones tempérées et péri- arctiques pour les C₃.

L'énergie lumineuse

La base du fonctionnement de la photosynthèse, qui permet de fixer le carbone non organique de l'atmosphère (CO₂) pour le transformer en carbone organique, est une réduction qui puise son énergie dans les photons. Les *quanta* d'énergie lumineuse $h\nu$, où ν est la fréquence du photon en Hz et h la constante de Planck, sont captés par une antenne constituée de pigments localisés dans les chloroplastes. Ils sont transformés en énergie chimique par un jeu complexe de transfert d'électrons.

La réaction de base qui conduit à cette production d'énergie chimique correspond schématiquement à la réduction de l'eau et à la production de l'oxygène atmosphérique qui intervient dans le photosystème II (*PSII*) :



La chaîne de transfert d'électrons produit les deux molécules qui sont la source d'énergie chimique de l'ensemble du métabolisme, le NADPH et l'ATP. L'énergie lumineuse capturée permet de réduire NADP⁺ dans le photosystème I (*PSI*). Le NADPH ainsi produit sert à son tour d'agent réducteur pour le métabolisme. L'énergie est aussi utilisée pour synthétiser l'ATP. Cette synthèse photodépendante porte le nom de photophosphorylation.

Ces trois réactions : réduction de l'eau, synthèse de l'ATP et réduction du NADP⁺ sont regroupées sous le nom de réaction thylacoïde (*thylacoid reactions*) car elles se produisent au niveau des membranes thylacoïdes des chloroplastes.

L'énergie lumineuse active pour la photosynthèse (*Photosynthetic Active Radiation* ou PAR) se situe dans le visible, à des longueurs d'onde entre 400 et 700 nm. Les pigments foliaires présentent deux pics d'absorption des photons. Le pic dans le bleu à moins de 500 nm correspond à l'état excité le plus énergétique des pigments. L'autre pic, dans le rouge, entre 650 et 700 nm, conduit à niveau d'excitation intermédiaire. Ces niveaux d'excitation correspondent à un stockage de l'énergie lumineuse. La restitution par transfert d'électrons engendre les réactions thylacoïdes.

L'énergie lumineuse a un lien direct avec la production de biomasse. Si on fait exception de l'aptitude de la culture à maintenir un couvert fermé, la production de biomasse est directement liée à l'efficacité de la conversion de l'énergie PAR interceptée en biomasse. Notons que l'énergie lumineuse correspondant à la tranche UV-B, c'est-à-dire à des longueurs d'onde entre 230 et 250 nm, est nocive pour les tissus végétaux.

On estime généralement qu'un maximum de 5 % de l'énergie lumineuse incidente sert à la synthèse de carbohydrates. En effet :

- 60 % de la lumière correspond à des longueurs d'ondes non absorbées par les pigments de l'antenne réceptrice ;
- 16 % de l'énergie incidente est pour moitié réfléchi et pour moitié dissipée sous forme de chaleur ;
- et 19 % alimentent des pertes métaboliques.

Le carbone inorganique

La source de carbone du processus photosynthétique est le dioxyde de carbone atmosphérique. L'alimentation carbonée de la plante va donc être conditionnée par l'interface entre la plante et l'atmosphère.

La porte d'entrée du CO₂ dans la plante est le stomate (*stomata*), dont l'apparition chez les plantes vasculaires remonte à 400 millions d'années. Les stomates sont localisés sur les feuilles et parfois les tiges. Il existe de nombreuses formes de stomates qui peuvent être réduites à 2 groupes : les stomates des graminées (poacées) en forme d'altères (*Dumd-bell shape* aussi appelé *grasslike stoma*) et ceux des autres plantes en forme de rein (*Kidney-shaped*).

Le dispositif stomatique des poacées marque une évolution car il permet une ouverture plus large avec un coût énergétique vraisemblablement plus faible. Un très faible changement de turgescence cellulaire suffit en effet à assurer une très large ouverture. Hetherington et Woodward (2003) attribuent aux stomates de graminées un potentiel plus élevé d'adaptation à des changements environnementaux que ceux des autres plantes. Les graminées ont en outre la particularité de disposer de stomates en quantité équivalente sur les deux faces des limbes. Les autres plantes ont les stomates majoritairement ou exclusivement sur la face inférieure des feuilles. La fermeture des stomates est contrôlée par un terpène végétal, l'acide abscissique (*ABA*).

Les stomates ont une structure quasi universelle chez les plantes terrestres, avec cependant quelques exceptions. Keeley *et al.* (1984) montrent que *Stylites andicola*, plante terrestre, apparentée aux fougères (*ferns ally*) dépourvue de stomates, s'alimente en CO₂ par des prélèvements du système racinaire dans le sol. De nombreuses plantes aquatiques dont les feuilles submergées n'ont pas de stomates (*Isoetaceae*), utilisent également le CO₂ contenu dans les sédiments pour la photosynthèse. Citons également le cas d'une plante parasite disposant de stomates non fonctionnels, la cuscute (*Cuscuta reflexa*) qui fixe le CO₂ provenant de son métabolisme respiratoire.

Des plantes normalement pourvues en stomates comme le tabac et le céleri ont développé des systèmes d'alimentation carbonée, par le CO₂ du sol ou de la respiration, qui viennent compléter l'alimentation atmosphérique.

La biomasse et les fibres produites par les plantes auxquelles nous nous intéressons, sont essentiellement constituées par les tissus conducteurs. Beerlin et Frank (2010) mettent en relation l'évolution des plantes vasculaires avec l'appauvrissement de l'atmosphère en CO₂. La concentration en CO₂ a diminué régulièrement d'un facteur 5 depuis un million d'années. Les plantes se sont adaptées à la raréfaction du CO₂

grâce à une augmentation de la densité de stomate et une réduction de leur taille. Il en résulte une amélioration du captage du CO_2 par une meilleure conductance stomatique. Le corollaire est une augmentation de la transpiration et une adaptation du système vasculaire à un accroissement des flux hydriques entre le sol et les feuilles. Une des conséquences a été l'accroissement de la densité de vaisseaux (*leaf vein*) dans les feuilles et un accroissement du rapport entre le nombre de vaisseaux et le taux de photosynthèse (*photosynthetic rate*). Ces innovations énergiquement coûteuses notamment en lignine très riche en carbone, ont apporté une meilleure conductance hydraulique et une photosynthèse améliorée par unité de carbone alloué aux tissus lignifiés.

Les caractéristiques fonctionnelles des stomates sont donc des éléments à prendre en compte pour raisonner la potentialité des cultures. Ainsi, Lu *et al.* (1998) montrent que les rendements du coton (*Gossypium* sp.) ou du blé (*Triticum* sp.) sont corrélés avec la conductance stomatique maximum, mais pas avec l'assimilation photosynthétique.

Les types photosynthétiques

Les voies métaboliques (*pathway*) en C_3 et en C_4 incorporent le CO_2 de manière similaire dans le cycle de Calvin Benson et Bassham, qualifié par de nombreuses autres appellations : cycle de Calvin, cycle de Calvin-Benson, PCRC (*photosynthetic carbon reduction cycle*), ou cycle en C_3 (*C_3 cycle*). Cette dernière appellation est ambiguë puisqu'on retrouve la totalité du cycle C_3 dans le cycle C_4 .

Le cycle en C_3

Le cycle de Calvin est commun à toutes les plantes, quelque soit leur type photosynthétique. Ce cycle regroupe une série de réactions régénérées alimentées en énergie par l'ATP et le NADPH. Le CO_2 entrant dans le cycle y est réduit en sucre. Les sucres produits vont alimenter le métabolisme général et les métabolismes secondaires.

La connaissance du cycle de Calvin n'est pas essentielle pour comprendre les écarts de potentiel qui peuvent exister entre les différents types photosynthétiques en fonction des conditions environnementales. Nous n'en parlerons pas dans ce chapitre.

L'incorporation du CO_2 se fait grâce à une enzyme à double action, la rubisco (*ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygénase*) nommée parfois *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase*, qui est la porte d'entrée du cycle de Calvin.

Le CO_2 est incorporé dans le cycle de Calvin par la rubisco fonctionnant comme carboxylase. Cette enzyme est le point d'entrée du carbone dans la biosphère. On trouve la rubisco dans tous les organismes autotrophes. L'enzyme fixe le carbone dans le stroma des chloroplastes pour former une molécule instable à 6 atomes de carbone. Cette molécule se clive immédiatement en deux molécules stables d'acide 3-phosphoglycérique (*3-phosphoglyceric acid* ou *3-PGA*). C'est ce nombre d'atomes de carbone de ce premier précurseur stable qui a donné son nom au type photosynthétique en C_3 (figure 1).

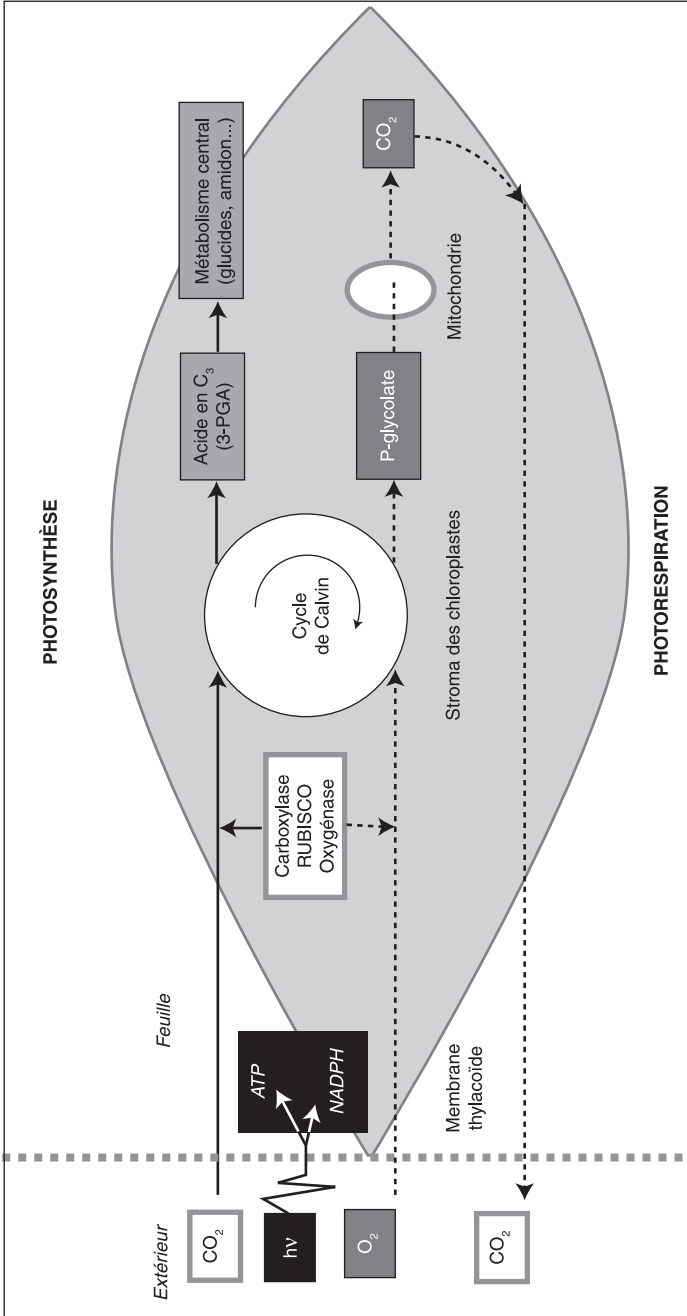


Figure 1. Représentation schématique du métabolisme photosynthétique en C_3 .

La rubisco fonctionne aussi comme oxygénase en catalysant l'absorption (*uptake*) d'une molécule d'O₂ pour produire du phosphoglycolate (*P-glycolate*). La métabolisation complexe de cette molécule, met en jeu les mitochondries. Elle va déboucher sur le rejet d'une molécule de CO₂ par la plante.

Ce processus photo dépendant, appelé photorespiration, peut entraîner dans certaines conditions une diminution de 50 % de l'efficacité photosynthétique des plantes en C₃. Les valeurs moyennes en conditions de culture sont moins importantes. Elles sont estimées entre 14 et 18 % de la photosynthèse brute (*gross photosynthesis*) pour le tournesol (*Helianthus* sp.), par Lloyd et Calvin (1977). Dans le cas du blé en condition de production, Keys et Whittingham, (1981) estiment que la photorespiration entraîne la perte de 25 % du carbone fixé par la photosynthèse.

La photorespiration, qui se traduit par une perte de CO₂, est de plus consommatrice d'énergie (ATP et NADP).

Notons que la photorespiration semble avoir un rôle positif pour la plante. Ce mécanisme qui diminue le rendement photosynthétique, permettrait d'éliminer un excès de molécules photoréductrices des chloroplastes. En effet, en l'absence de CO₂, qui est le récepteur final d'électron, l'oxygène peut se substituer comme accepteur d'électrons. Il en résulte une synthèse de peroxyde et de radicaux hydroxyles (OH⁻) très destructifs.

La perte directe de carbone par photorespiration ne doit pas être assimilée à la perte liée à la respiration nocturne (*dark respiration*). Cette dernière joue un double rôle dans les processus de synthèse de croissance et de maintien de la biomasse. Elle permet le maintien des structures et de l'organisation. Elle intervient pour 50 % de la photosynthèse nette.

Cette action directe et importante de la rubisco sur le rendement photosynthétique la met au centre des problématiques d'efficacité de l'utilisation de la lumière, de l'eau et de l'azote par les plantes.

Le cycle en C₄

Une découverte récente

La découverte des types C₄ date des années 1950 bien que les publications aient été postérieures (El-Sharkawy, 2009). La découverte de plantes dont la première molécule issue de la fixation de CO₂ inorganique possède 4 atomes de carbone provient initialement des travaux réalisés par Kortschak à Hawaii sur la canne à sucre (*Saccharum* sp.), qui ne furent publiés qu'en 1965 (Kortschak *et al.*, 1965). Les recherches ont été multipliées rapidement sur d'autres cultures, notamment par El-Sharkawy et Hesketh (1965) aux États-Unis, et développées sur canne à sucre en Australie par Hatch et Slak (1966, 1970).

Les plantes en C₄ marquent une évolution biochimique comme morphologique sur les plantes en C₃. Les ensembles de caractéristiques biochimiques, physiologiques et morphologiques, qui doivent être présents pour que la voie métabolique en C₄ fonctionne correctement, sont regroupés dans la littérature scientifique sous l'appellation syndrome C₄ (*C₄ syndrom*). Nous verrons que la complexité de ces différences conduit à des avantages et des défauts très sectoriels qu'il n'est pas possible de regrouper pour positionner les performances d'un type par rapport à l'autre.

L'anatomie de Kranz

Les plantes de type C_4 sont caractérisées par une anatomie spécifique du limbe des feuilles, dite anatomie de Kranz qualifiée parfois d'anatomie en couronne (figure 2). Les descriptions de cette anatomie (El-Sharkawy et Hesketh, 1965) portent à l'origine sur les plantes ayant les rendements photosynthétiques les plus élevés : maïs (*Zea mays*), sorgho (*Sorghum* sp.), bermudagrass (*Cynodon dactylon*) et palmer weed (*Amaranthus palmeri*). Contrairement au limbe des plantes en C_3 , qui ne dispose que d'un type de cellule chlorophyllienne, le limbe des plantes en C_4 est organisé autour de deux types de cellules. Chaque type constitue un tissu spécialisé dans une étape du processus photosynthétique. Ces tissus sont disposés de manière concentrique autour des vaisseaux de la feuille. On trouve ainsi, de l'extérieur vers les tissus vasculaires du centre :

- une couche externe de cellules aux parois fines avec de larges espaces intercellulaires, le mésophylle (*mesophylle*). Il est le lieu de captage et de concentration du gaz carbonique. Celui-ci est métabolisé sous la forme d'un acide à 4 atomes de carbone (aspartate ou malate) qui sert au stockage et à l'acheminement du carbone fixé ;
- une couche plus interne de cellules à parois épaisses, formant la gaine périvasculaire (*bundle sheath*). L'épaisseur des parois cellulaires crée une barrière à la diffusion des solutés et des gaz qui renforce les capacités de stockage du CO_2 . Elle est reliée à la couche précédente par de nombreux plasmodesmes permettant le transfert des acides à 4 atomes de carbone. Les acides en C_4 libèrent le CO_2 dans les chloroplastes au niveau de la rubisco qui va métaboliser le carbone dans le cycle de Calvin. Les chloroplastes sont localisés en grande majorité dans la partie la plus profonde des cellules de cette gaine, c'est-à-dire à proximité immédiate des tissus vasculaires.

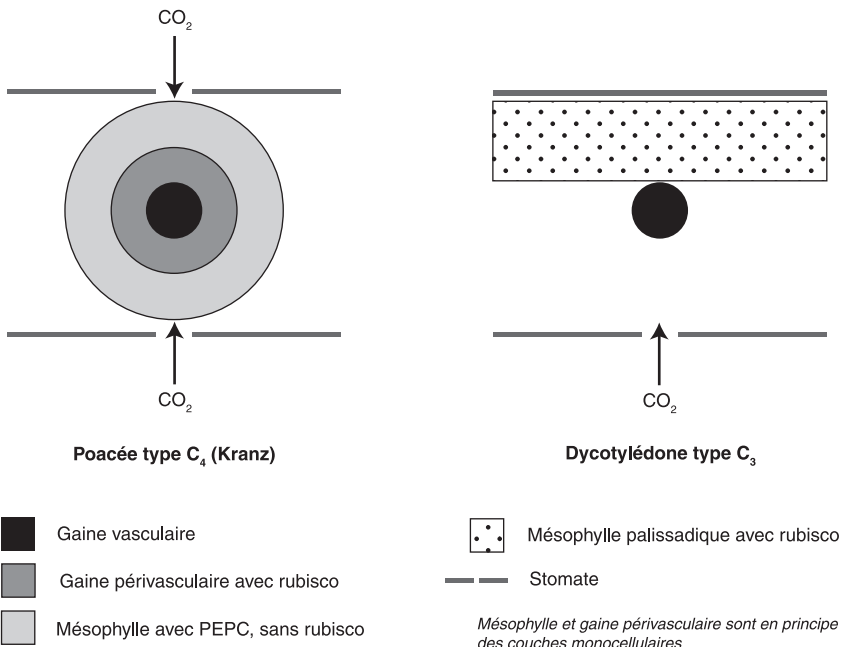


Figure 2. Schéma d'une coupe de limbe de feuille.

Les cellules de la gaine sont séparées des vaisseaux par une couche de cellules spécialisées dans le stockage de l'eau.

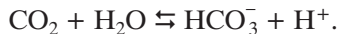
Comme pour les types C_3 , les sucres issus du cycle de Calvin sont évacués par les vaisseaux pour alimenter le métabolisme général.

L'anatomie de Kranz, qui est une caractéristique du syndrome C_4 , s'élabore au cours du développement de la plante. Ainsi, les feuilles de maïs (C_4 type NADP-me) évoluent en passant de la phase immature à la phase adulte, de caractéristiques en C_3 , puis C_3 - C_4 et enfin C_4 . Toutes les cellules jeunes sont par défaut de type C_3 avec de la rubisco. La différenciation en cellule du mésophylle sans rubisco et cellule de la gaine interviendrait en réponse à une stimulation de la lumière (Nelson et Dengler, 1992).

Le métabolisme de type C_4

Le pompage du CO_2

Le CO_2 est fixé une première fois dans le cytosol des cellules du mésophylle qui permet un stockage selon l'équilibre entre le dioxyde de carbone et l'acide carbonique en milieu aqueux. L'équilibre est favorable à l'acide carbonique. Une anhydrase carbonique (*carbonic anhydrase* ou *CA*) confinée dans le cytosol des cellules du mésophylle catalyse cette inter conversion en présence de zinc. Une carence en zinc contribue rapidement à réduire ce système de captage chimique du CO_2 .



L'acide carbonique (*Disolved Inorganic Carbon* ou *DIC*) est ensuite associé de manière transitoire à un pyruvate, le phosphoénolpyruvate ou PEP, par une PEP carboxylase (*PEPC*). Cette enzyme est présente dans toutes les plantes, mais il y en a 20 fois plus dans les plantes en C_4 et sous une forme différente, adaptée à la concentration en CO_2 .

L'affinité de la PEPC pour le dioxyde de carbone est plus importante que celle de la rubisco. De plus, sa vitesse de fonctionnement est très supérieure. Il en résulte une incorporation de la molécule de CO_2 possible à de très faibles niveaux de concentration dans le cytosol mais aussi une concentration en CO_2 plus importante dans les cellules de la gaine que dans le mésophylle.

La PEPC est confinée dans le cytosol des cellules du mésophylle. Elle est ainsi séparée physiquement de la rubisco qui est localisée dans le stroma des chloroplastes des cellules de la gaine. Cette séparation permet à la PEPC de récupérer une partie du CO_2 qui peut être perdu par fuite au niveau des cellules de la gaine.

L'association du CO_2 au PEP donne un oxaloacétate à 4 atomes de carbone qui est aussitôt converti selon les plantes, en malate ou en aspartate. Ces acides migrent vers la gaine périfasciculaire jusqu'au stroma des chloroplastes où sont localisées les réactions du cycle de Calvin. Cette migration ne consomme pas d'énergie. Elle se fait par diffusion à travers les nombreux plasmodesmes (*plasmodesma*) qui séparent les cellules du mésophylle et de la gaine.

Le transporteur, malate ou aspartate, est ensuite décarboxylé au niveau du site de la rubisco, dans les chloroplastes de la gaine. On retrouve alors le processus des plantes en C_3 avec l'incorporation dans le cycle de Calvin, du CO_2 libéré.

Ce mécanisme propre aux plantes en C_4 où la PEPC joue un rôle de pompe à CO_2 permet de maintenir un rapport CO_2/O_2 suffisamment élevé pour inhiber la fonction oxygénase de la rubisco. Pour les plantes en C_3 , la rubisco en relation directe avec l'atmosphère par les stomates du mésophylle n'est pas saturée en CO_2 . La rubisco des types C_3 , opère avec une pression partielle de CO_2 de l'ordre de 200 μ bar.

En revanche, pour les plantes en C_4 , les mesures directes du pool carbone non organique font apparaître des concentrations 3 à 6 fois plus élevées que la concentration atmosphérique (Von Caemmerer et Furbank, 2003). De nombreux auteurs citent des études plus anciennes, qui font référence à des concentrations de 10 à 20 fois plus importantes (Furbank *et al.*, 1989 ; Hatch, 1999). D'autres études limitent la concentration à des niveaux plus acceptables. Dai *et al.* (1993) trouvent dans les cellules de la gaine périvasculaire des feuilles de maïs une concentration en CO_2 de 1 000 μ mol/mol, ce qui correspond à environ 2,5 fois la teneur atmosphérique actuelle. Osmond *et al.* (1982) estiment que la concentration du CO_2 est multipliée par un facteur compris entre 20 et 30 entre le mésophylle et les cellules de la gaine. Le mésophylle est fonctionnel dès 100 μ bar de pression partielle en CO_2 . Cette pression partielle est comprise entre 2 000 et 3 000 μ bar au niveau des cellules de la gaine où se localise la rubisco. De telles différences de concentrations entre les cellules de la gaine périvasculaire et l'atmosphère, impliquent des fuites. L'épaisseur des parois cellulaires et parfois leurs subérisations ne font que limiter les fuites.

La photorespiration des plantes en C_4 est donc négligeable et indépendante de la concentration en O_2 dans une large plage allant de 2 à 21 kPa. Irvine (1970) a cependant apporté la preuve qu'il y avait bien une photorespiration pour des plantes comme la canne à sucre, le maïs, ou le sorgho. Le niveau moyen de photorespiration des plantes en C_4 est très faible et se situerait entre 2 et 5 % (Kanai et Edwards, 1999). L'absence de perte en CO_2 des C_4 est aussi liée à leur très faible point de compensation en CO_2 (cf. tableau 4) et au recyclage dans le mésophylle du CO_2 photorespiré dans la gaine.

La minimisation, pour les types C_4 , de l'activité oxygénase de la rubisco améliore l'assimilation du carbone ainsi que l'utilisation liée de l'eau et de l'azote.

Les sous-types

Les transporteurs décarboxylés retournent vers le mésophylle où le pyruvate va se régénérer pour s'associer à une nouvelle molécule d'acide carbonique. La voie chimique de cette fin de cycle dépend de la nature du transporteur et des modalités de sa décarboxylation. Les biologistes distinguent ainsi trois sous-types de C_4 :

- lorsque qu'il s'agit du malate, la décarboxylation donne directement un pyruvate. C'est le cas du maïs, du sorgho ou de la canne à sucre :
- et lorsque qu'il s'agit de l'aspartate la décarboxylation conduit ;
 - soit à l'alamine qui donnera un pyruvate dans le mésophylle. C'est le cas du mil ou *pearl millet* (*Pennisetum glaucum*),
 - soit directement au pyruvate. C'est le cas de l'herbe de Guinée ou fataque (*Panicum maximum*).

Ces trois variantes se distinguent donc par la nature chimique de la molécule transporteuse et par les mécanismes de décarboxylation dans les cellules de la gaine péri-

fasciculaire. Quelque soit le sous-type, la décarboxylation libère du gaz carbonique au niveau de la rubisco et non pas du bicarbonate (HCO_3^-).

Les trois sous-types de cycles en C_4 , sont définis à partir des enzymes de décarboxylation. On distingue ainsi :

– le type NADP^+ malique (NADP-me) qui correspond à la séquence malate, pyruvate (figure 3). Il ne fait pas intervenir les mitochondries et le CO_2 substrat de la rubisco est libéré dans les chloroplastes des cellules de la gaine. Il regroupe les plantes utilisant une enzyme malique dépendant du NADP^+ ;



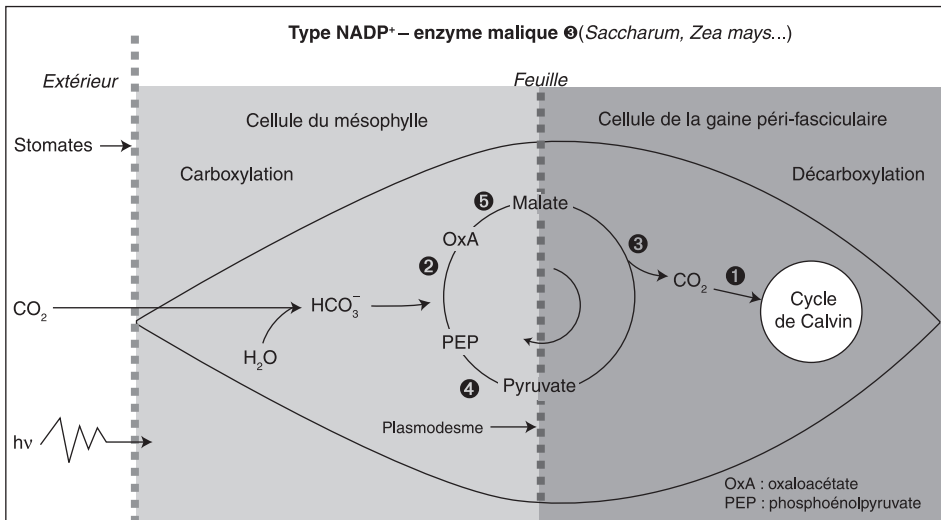
– le type NAD^+ malique (NAD-me) qui présente la particularité de décarboxyler l'aspartate dans les mitochondries des cellules de la gaine (figure 4). L'enzyme de décarboxylation est aussi une enzyme malique mais NAD^+ dépendante. La régénération se fait par migration d'alamine puis du pyruvate vers le mésophylle ;



– le type PEP carboxykinase (PEP-ck ou PCK selon les auteurs) qui produit directement du pyruvate. Il libère le CO_2 dans le cytosol des cellules de la gaine.



Dans les trois cas, la restauration du système, qui conduit à la régénération du PEP à partir du pyruvate, fait intervenir la PPDK (*pyruvate orthophosphate dikinase*). La PPDK est régulée par une protéine photosensible qui évite l'accumulation de CO_2 la nuit. Le PEP va capter une nouvelle molécule de CO_2 dans le mésophylle pour



Principales enzymes impliquées :

- ① RUBISCO (Ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase-oxygénase)
- ② PEPcase (Phosphoénolpyruvate carboxylase)
- ③ NADP-ME (NADP⁺ – enzyme malique)
- ④ PPDK (Pyruvate-orthophosphate dikinase)
- ⑤ NADP⁺ – malate déshydrogénase

Figure 3. Représentation schématique du type NADP-me du cycle en C_4 .

donner naissance à une nouvelle molécule à 4 atomes de carbone. Les plantes en C₄, tous sous-types confondus, disposent donc d'une véritable pompe à CO₂, avec une entrée de la molécule par les stomates, un captage dans le mésophylle, un transport vers la gaine périvasculaire et une concentration dans la gaine où il est libéré en fonction des besoins de la rubisco.

Les principales différences entre sous-types

Les organites cellulaires comme les mitochondries, n'interviennent pas dans tous les sous-types. Ils diffèrent en localisation, en contenu et en nombre entre les cellules

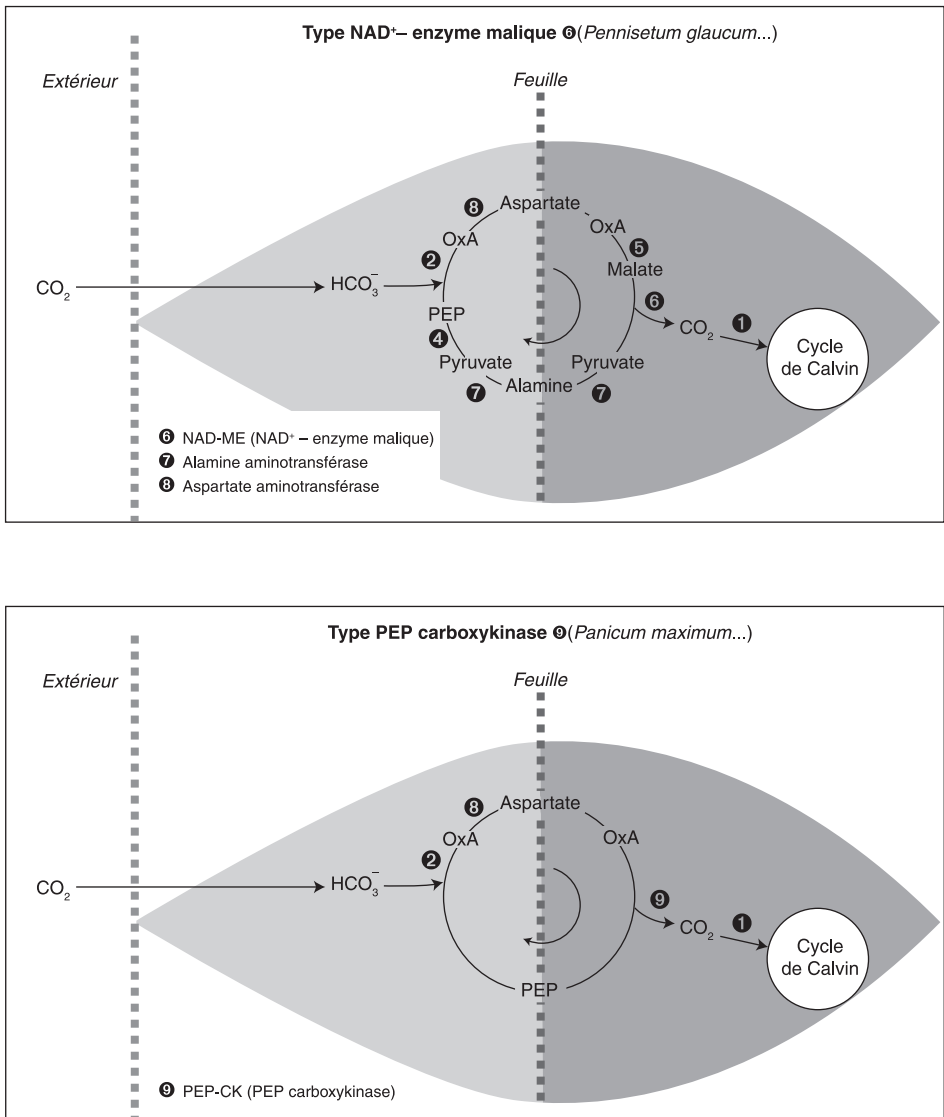


Figure 4. Représentation schématique des variantes NAD-me et PEP-ck du cycle en C₄.