

Du prélèvement au dosage : réflexions sur les problèmes posés par la mesure des glucides non structuraux chez les végétaux ligneux

Laurent Gomez
Marie-Odile Jordan
Stéphane Adamowicz
Hugues Leiser
Loïc Pagès

Unité de recherche des plantes et systèmes
de culture horticoles INRA,
Domaine de St Paul
Site Agroparc
84914 Avignon cedex 9
<Gomez@avignon.inra.fr>

Résumé

Il y a 10 ans, lorsque l'étude des réserves végétatives carbonées chez les plantes ligneuses a nécessité le choix d'une méthode de dosage des glucides non structuraux, nous avons été confrontés à une grande diversité de protocoles ainsi qu'à une description et à une justification des procédures souvent insuffisantes. C'est encore le cas aujourd'hui, même si les démarches actuelles vers « l'assurance qualité » et l'exigence croissante des revues scientifiques incitent les auteurs à mieux considérer les conditions expérimentales et les performances analytiques en fonction des objectifs. Il nous a donc paru opportun non seulement de rappeler l'intérêt agronomique et les informations physiologiques procurés par les composantes glucidiques mesurées mais également d'énoncer les contraintes inhérentes au matériel végétal, aux propriétés physico-chimiques des sucres recherchés et aux techniques d'analyse employées. Sans être exhaustif, ce rapport s'appuie néanmoins sur une bibliographie conséquente, en particulier pour l'analyse des sucres, et sur quelques observations expérimentales, essentiellement pour souligner l'influence de la préparation des échantillons sur le résultat analytique. Il s'adresse en priorité à tous les expérimentateurs désireux de faire doser les glucides non structuraux sur des échantillons de plantes ligneuses et qui souhaitent adopter un protocole cohérent avec des dosages souvent décalés en temps et en lieux. Il les aidera à mettre en adéquation leurs moyens humains et techniques avec les possibilités analytiques.

Mots clés : Méthodologie ; Techniques d'analyses ; Production végétale.

Summary

From sampling to measurement: a few thoughts about non structural carbohydrates analysis in woody plants.

The carbon budget of woody plants has recently become a main goal for plant physiologists. Many studies deal with the way it is affected by climate (temperature or CO₂ levels) or culture conditions (fertilization or water availability). Therefore, the needs for the chemical determination of non structural carbohydrates (NSC) in all the plant organs have strongly increased during the last decade. We intend here to assess the existing methods and analytical procedures currently available with regard to the biochemical and size specificities of woody plants and to the diversity of experimental goals and constraints. Non structural carbohydrates are defined as the sum of starch and sugars soluble in the water present in the cell (hereafter SS). They appear to be very sensitive to degradation by heating or enzymatic transformation, and therefore request important precautions throughout the analytical pathway. Each step of the procedure is detailed and evaluated. The preparation of the sample has to be precisely described since parameters such as sample size, sampling hour and duration, delay before refrigeration affect the final results. Sampling induces a stress which modifies the metabolism of the plant. These perturbations can be limited by cooling, or by freezing (sample immersion) in liquid nitrogen. It must be followed by drying, which is the only way of completely stopping the metabolism of the cell and of avoiding the further degradation of the biochemical

compounds. Indeed, some enzymes like invertase are active at -20°C . The most used, and less damaging, method is freeze-drying as the combination of vacuum and of low temperature avoids irreversible biochemical changes. Conversely, during hot-drying, NSC composition can be modified by enzymatic catabolism, starch or sucrose hydrolysis and by browning which occurs above 50°C . Thawing increases those risks since the cell walls have previously been broken by freezing. However, freeze-drying does not perform a complete water extraction, even when the temperature is increased to 40°C at the end of the process. The accuracy of the chemical determinations depends on the fineness of grinding. For good results in starch analysis, particles have to be smaller than $45\ \mu\text{m}$. Using a ball grinder which allows the temperature to be kept low by immersing the plant material and bowls in liquid nitrogen is a good method. If the sample could not be dried before grinding, special attention must be given to this last point to avoid thawing and subsequent sample degradation. During storage, the plant material is rehumidified. For instance, peach tree powder, stored during 3 months at -80°C in airtight pillboxes, took in 1% water. Therefore storage duration before analysis should be limited. Soluble sugar determination is rather sophisticated in woody plants since the different organs exhibit highly variable concentrations and matrix effects. The diversity of the existing methods reflects the diversity of the problems which have to be solved during SS extraction. This first step, leading to supernatant (SS)/residue (starch) separation, is achieved through decantation after soaking, rarely after percolation. Complete SS extraction is generally obtained by repeatedly soaking dried aliquots ($\leq 200\ \text{mg}$) in a volume of solvent which varies from 2 to 35 mL. Accurate and reproducible results may be obtained with only 50 mg of dried aliquot. The extraction medium is sometimes pure water, but it often contains alcohol which avoids biochemical contamination and furthurs the solubilisation of oligosides whose molecular weight is lower than 2,000. Alcohol concentration ranges from 40 to 90% (70-80%, most usual). Extraction methods also differ by temperature ($+4^{\circ}\text{C}$ to 100°C), duration (10 min to 20h) and number (2 to 5) of soaking periods. Next, the supernatant is purified, according to the needs of the chemical determination process. Phenols and pigments are usually eliminated either by chloroform extraction, trapping by polyvinylpyrrolidon (PVP) or animal charcoal. Exchanging ion resin is also used, especially when compounds other than sugars are also determined. Several determination methods are available: enzymatic methods are sensitive and adapted to selective sugar determination and do not request a strong purification of the supernatant. Their use is in constant increase due to their automation and miniaturization; liquid and gas chromatography require a previous preparation of the supernatant. In GC, sugars are transformed into volatile components by derivatization. In HPLC, a severe purification of the supernatant is requested since additional compounds could interfere with chromatogram resolution. These constraints are however compensated by the complete and concomitant quantification of each sugar; colorimetric methods usually allow soluble sugars to be globally determined. But their use tends to decrease in spite of their easy use, complete automation and lower costs. The elimination of phenols in the supernatants before colorimetric resolution is essential. The anthrone method which can be used on alcoholic extracts, is the most currently implemented, in spite of the fact that polyols are not accounted for and although its sensibility depends on the nature of the soluble sugar mixture concerned. Starch determination is usually obtained by glucose determination following starch hydrolysis. Generally, it has to be performed on the residues remaining after soluble sugar extraction even if this step is not indispensable. Starch solubilization is preferably done by autoclaving (1 h, 1 bar, 120°C) as it is softer and more respectful of sample structure than a chemical attack (acid or basic) which could release glucose from the cellulose or hemicellulose chains. For depolymerization, the enzymatic method, which is specific to starch, has to be preferred to an acid or an alcalin hydrolysis. Amyloglucosidase, for which well purified extracts are now available, is often used on its own as a depolymerisation enzyme. The resulting glucose can then be quantified by an enzymatic method. Thus, the results are more accurate than those of colorimetric methods, or those of more expensive and time-consuming chromatographic methods.

Key words: Methodology; Analysis techniques; Vegetal production.

La réalisation de bilans nutritionnels, l'étude des mécanismes de la régulation, de l'absorption, du transport et de l'allocation des assimilats carbonés, ou encore de la gestion des réserves glucidiques, nécessitent le dosage des glucides non structuraux (GNS). Dans le cadre de nos recherches écophysiologicals, nous réalisons ainsi chaque année plus d'un millier de bilans glucidiques. Ces analyses portent sur tout ou partie de la plante à différents stades phénologiques (états de développements visuel d'un organe) et concernent plusieurs espèces ligneuses fruitières (pêcher, prunier, tomate, kiwi, goyavier fraisier, caféier, etc.). On distingue d'une part les sucres solubles dans l'eau (SS), présents dans la cellule au niveau du cytoplasme et des vacuoles, dans la sève élaborée, et participant au métabolisme intermédiaire et, d'autre part, les sucres dit de réserve, généralement assimilés à l'amidon chez les ligneux. Bien que couramment pratiqué, leur dosage reste souvent problématique. Nous y voyons deux raisons essentielles :

- Les analyses des GNS concernent l'ensemble des parties ligneuses de la plante. La diversité biochimique, intra- et *a fortiori* inter-espèces végétales, confère à la structure des échantillons un effet matriciel aléatoire, interférant avec la détermination des sucres. Les chercheurs ont multiplié les méthodologies propres à résoudre ponctuellement leur problématique en considérant notamment la taille, la variabilité phénotypique et la nature des constituants biochimiques des échantillons. Les procédures ainsi élaborées sont généralement longues et complexes. La lourdeur des moyens mis en œuvre impose souvent un compromis entre les attendus scientifiques de l'expérimentation et les disponibilités humaines, techniques ou financières. Ainsi les méthodes de dosage, sont choisies en fonction des objectifs scientifiques mais également des possibilités humaine et matérielle, et de l'histoire scientifique du laboratoire.

- Les sucres sont des composés relativement instables dans un milieu biochimique actif (influences enzymatique et hormonale). La fragilité de l'état glucidique d'un échantillon ligneux génère des contraintes expérimentales destinées à préserver son intégrité.

Par conséquent, la fréquente complexité des méthodes de dosages des GNS chez les ligneux est en grande partie liée à la préparation d'extraits glucidiques et à

l'élimination des interférences matricielles sans altérer l'intégrité des sucres. La volonté d'établir un bilan qualitatif et quantitatif des GNS conduit à considérer la procédure expérimentale dans son ensemble, de la collecte des échantillons au dosage, en passant par le broyage et le stockage.

Après une présentation rapide des notions de SS, de sucres de réserves mobilisables à court ou à long terme, nous proposons donc de faire un bilan comparatif, exhaustif, des procédures de dosages des GNS, disponibles chez les ligneux.

Caractérisation des glucides non structuraux

Les sucres constituent à la fois la principale réserve d'énergie et la plus importante source de carbone pour la construction des tissus végétaux. La plante s'assure une disponibilité permanente en constituants de réserve plus ou moins labiles.

Notions de sucres de réserve et de sucres solubles

Le terme de réserves est employé par opposition à structure, transport ou métabolisme. L'importance physiologique des réserves est attestée par le fait que leur masse constitue un excellent indicateur de l'état sanitaire et de la vigueur de l'arbre : chez le noyer, la croissance d'un organe donné est quasiment synchronisée avec la reconstitution de son stock d'amidon [1].

Seul l'amidon est une forme exclusive de stockage qui répond parfaitement à la définition de réserve. C'est un glucosane (uniquement formé de glucose) rencontré sous forme de grains dont la morphologie varie selon les espèces. Il est constitué en proportion variable d'amylose (chaînes linéaires à liaisons α 1-4, PM 150 à 600 Kda) et d'amylopectine (chaînes linéaires liaisons α 1-4 et latérales α 1-6, PM de plusieurs millions). On exclut de ces réserves potentielles les constituants pariétaux dont la remobilisation est controversée : cellulose et hémicellulose pourraient être hydrolysées en hiver pour couvrir des dépenses de respiration [1-3]. Les sucres solubles dans l'eau constituent une source glucidique rapidement métabolisable et couvrent les besoins immédiats de la plante. Ce sont des intermédiaires métaboliques qui sont également une forme de transport et qui peuvent être, dans certains cas, considérés comme une forme de stockage. Ainsi, le saccharose, sucre soluble majoritaire de la plupart des espèces, contribue largement au stockage hivernal en s'accumulant dans les vacuoles. Son accumulation est initiée par une baisse des températures hivernales et contribue à augmenter la résistance au froid [4] : la température de congélation s'abaisse suite à l'augmentation de la pression osmotique sur robinier [5], sur peuplier [6] donnant au sorbitol un rôle cryoprotecteur des membranes et des protéines cellulaires.

En dépit de leur importance pondérale chez certaines espèces, le rôle des alditoles en tant que réserve apparaît négligeable. Les rosacées fruitières notamment, se distinguent par leur haute teneur en sorbitol [7, 8] qui semble être principalement une forme de transport. En effet sa concentration, importante dans les feuilles exportatrices et dans le phloème (environ 50 % des sucres solubles [8-10]), est inférieure à 1 % dans les puits trophiques : bois, racines, fruits et pousses feuillées ([11] sur pêcher, [12] sur abricotier, [13] sur pommier, [14] sur pêcher). Les autres sucres (glucose, fructose et maltose) peuvent être considérés comme des métabolites intermédiaires à durée de vie relativement courte. Chez des arbres jeunes (sans fruit), leur importance pondérale est négligeable, à l'exception du maltose, produit en quantité assez importante par l'hydrolyse des dextranes [15-17] en période pré-hivernale d'interconversion amidon-saccharose. Ce composé peut, dans ce cas précis, être assimilé à une forme de réserve dans la mesure où sa formation résulte du mécanisme d'interconversion.

Les compartiments de GNS

Chez les végétaux pérennes, les réserves glucidiques peuvent être considérées à plusieurs échelles de temps. Les variations de l'activité photosynthétique au cours du nyctémère génèrent la constitution de réserves à court terme. Etant donné les délais d'acheminement vers les puits trophiques (24 h pour 50 % des assimilats, 5 jours pour la totalité d'entre eux [1]) la majorité du carbone remobilisé dans les 5 jours suivant l'assimilation photosynthétique fait partie de ce « pool ». Les réserves à long terme permettent de gérer les écarts entre l'offre et la demande

propres à chaque stade phénologique. Une accumulation de sucres permet d'assurer la survie de la plante pendant la période où le bilan énergétique est négatif, lorsque les rameaux ne portent pas de feuilles fonctionnelles. Ce stockage démarre très tôt, soit environ 6 semaines après l'apparition des premières feuilles [1].

Kajji évoque également l'existence d'un troisième « pool » de réserves dit de « sécurité ». Composé exclusivement d'amidon âgé de plus d'un an, et inerte en conditions de cultures normales, il serait uniquement mobilisé en cas de stress trophique important.

Il est difficile de quantifier précisément chacun de ces « pools » de réserve car les sites de stockage ne sont ni cloisonnés ni spécifiques (organes, tissus ou organites cellulaires). On peut néanmoins mentionner le cas des chloroplastes dont l'amidon est rapidement mobilisé et, à l'opposé, celui des cernes de bois de plus de 2 ans (tissu) où seraient stockées des réserves dites « de sécurité » [1].

L'existence d'un seuil de réserve carbonée minimal, nécessaire à la survie de l'arbre, en dessous duquel la croissance s'arrête, n'a pas été établie. Néanmoins, nous connaissons chez le pêcher l'importance des glucides de réserve, notamment pour pallier le déficit nutritionnel constaté lors du débourrement (Jordan, non publié).

Préparation de l'échantillon

La préparation des échantillons est réalisée suivant divers protocoles pas toujours justifiés au regard des attendus scientifiques de l'expérimentation chez les ligneux. De plus, elle n'est pas toujours complètement décrite. Les rares études méthodologiques réalisées dès 1973 par Smith [18] et, plus récemment, par Hendrix et Peelen [19] montrent pourtant que le prélèvement, le transport, la conservation et la préparation de l'échantillon affectent le résultat. Nous considérons donc toutes ces étapes comme des points critiques, particulièrement sensibles et devant être maîtrisés.

Prélèvement

Les nombreuses stratégies d'échantillonnage dans l'arbre qui relèvent plus du

projet expérimental et du traitement statistique des données, de même que les conditions environnementales du prélèvement (température, hygrométrie, période jour-nuit, etc.), sont habituellement bien décrites et ne seront pas évoquées ici. Cependant, d'autres paramètres influents, sont souvent mal considérés.

Il est essentiel de respecter un horaire de prélèvement précis, notamment lors de répétitions sur des pas de temps courts (jour, semaine). On observe en effet des variations importantes, au cours du nyctémère, du bilan glucidique d'un organe comme les feuilles ou les racines de salade [Adamowicz, non publié]. Rares sont pourtant les auteurs qui mentionnent un horaire de prélèvement, à l'image de Roper, *et al.* [20] (prélèvement réalisé 2 heures après le lever du soleil) ou Wullschlegel, *et al.* [21] (trois prélèvements sur 24 h).

La masse d'échantillon à traiter est également un paramètre de variabilité. Ainsi, l'échantillonnage d'un arbre entier adulte peut nécessiter une journée et mobiliser une grande diversité de moyens humains et techniques. C'est une variable expérimentale importante que seul peut minimiser un respect strict de la procédure de manipulation de l'échantillon. Il est essentiel de standardiser l'ordre et l'heure de collecte des différents organes afin de minimiser l'impact de ces variables sur la composition biochimique d'échantillons de même nature.

Le prélèvement d'un échantillon s'accompagne d'une phase de stress aux conséquences mal évaluées. Les enzymes, voire les hormones libérées à proximité de la blessure, peuvent occasionner un catabolisme glucidique dont l'incidence est inversement proportionnelle à la masse de l'échantillon. Ce phénomène peut être ralenti par refroidissement du végétal prélevé. L'immersion dans l'azote liquide est la solution la plus performante. La congélation de tous les tissus, même les plus internes du végétal, est instantanée. Elle provoque en outre un éclatement cellulaire qui favorise le séchage et ultérieurement l'homogénéité du broyat ; *a contrario*, il faut craindre une dégradation rapide après décongélation [18]. L'immersion dans l'azote permet également d'allonger sans risque le temps de prélèvement et de transport au laboratoire. En absence d'azote liquide, la neige carbonique offre un pouvoir refroidissant plus lent. La glacière réfrigérée est encore préférable à la conservation à température ambiante, mais la procédure de rapatriement

des échantillons au laboratoire pour y être congelés, doit être rapide. Dans tous les cas, il est souhaitable d'éliminer au moment du broyage, les zones proches des blessures afin d'atténuer l'impact du catabolisme occasionné.

Outre le refroidissement, il existe d'autres façons de fixer l'échantillon après prélèvement : Holligan et Drew [22] proposent, par exemple, d'immerger immédiatement les organes prélevés dans l'éthanol froid 95 % (V/V). Si ce procédé a le mérite d'arrêter le métabolisme cellulaire, il engage l'étape d'extraction des sucres solubles sur du matériel frais non broyé (voir ci-après) et hypothèque des analyses autres que glucidiques (acides aminés libres, par exemple).

Bien qu'avérés, ces risques métaboliques ne suscitent pas toujours les précautions qui s'imposent lors du prélèvement et du transport des échantillons. La lourdeur expérimentale, difficile à assumer et dont les avantages sont mal estimés, en est probablement la raison majeure, mais leur mise en œuvre est également parfois impossible. Ainsi, le travail sur des arbres entiers adultes nécessite souvent des prélèvements volumineux, incompatibles avec une immersion dans l'azote liquide (chez le pêcher [23,24]). Paradoxalement, alors que l'intégrité de l'échantillon est difficilement maintenue, les manipulations susceptibles de le dégrader sont plus nombreuses. Les quantités de biomasse sont telles qu'il est indispensable de ne conserver qu'une fraction représentative de chaque organe, ce qui implique souvent un broyage grossier, dans la neige carbonique, des échantillons frais dès ce stade expérimental.

Cette charge expérimentale liée à la masse végétale prélevée a pour autre conséquence de limiter le nombre de répétitions par traitement (entre 2 pour Kajji [1] et 6 pour Yoshioka *et al.* [25]), et ce, malgré la variabilité individuelle rencontrée chez les ligneux.

Dans tous les cas, il est important de bien évaluer les moyens disponibles et de convenir des limites à respecter dans l'interprétation des résultats.

Séchage

Destiné à faciliter la conservation et la manipulation d'un échantillon à doser, le séchage permet également de mesurer la teneur en matière sèche (MS), en fonction de laquelle les teneurs en GNS sont habituellement exprimées. Un séchage inapproprié peut affecter l'intégrité biochimique de l'échantillon, à savoir

entraîner des modifications irréversibles [19]. Pour les GNS, les risques encourus sont la réaction de Maillard (caramélisation), le catabolisme et l'interconversion. Pour y contrevenir, il faut considérer plusieurs paramètres qui tiennent à la fois de l'échantillon (volume, poids, nature) et des conditions de séchage (principe, température, durée).

Excepté la dessiccation à température ambiante, deux méthodes de séchage se pratiquent au laboratoire : à chaud (étuve ventilée ou non, avec ou sans vide), à froid et sous vide (lyophilisation). Considérée depuis longtemps comme la plus performante (sur la luzerne [18]), la lyophilisation est utilisée de préférence pour sécher les échantillons ligneux (*tableau 1*). Son emploi n'est pas systématique, probablement par manque d'équipement (coûts d'investissement et d'entretien élevés), du fait de la moindre capacité des lyophilisateurs, voire de la longueur du séchage (3 à 8 jours selon la taille, la densité et la teneur en eau des échantillons).

Le séchage à l'étuve d'échantillons congelés (*cf. infra*, le paragraphe *Stockage*) démarre par une phase de décongélation et par la reprise potentielle d'une activité métabolique propice à la transformation significative de certains sucres. Si la congélation est le meilleur moyen de préserver l'intégrité d'un échantillon frais, le dégel est le moyen le plus sûr de la perdre, comme en témoignent nos données expérimentales (*figure 1*). Un dégel de quelques heures au-dessus de 0 °C provoque la quasi-disparition du saccharose et l'augmentation du glucose et fructose. Selon Hendrix et Peelen [19] une altération de la composition en SS serait effective après seulement 15 minutes de dégel et d'autant plus importante que la teneur en saccharose des végétaux (coton, melon) est basse. La rupture de la structure cellulaire et la mise en contact des solutés des différents compartiments cellulaires (invertase et saccharose vacuolaires, entre autres), provoquées par l'enchaînement congélation-décongélation, expliquent la rapidité et l'importance du catabolisme. Ce phénomène peut être favorisé par la rupture des parois cellulaires lors de l'immersion des échantillons prélevés dans l'azote liquide, ce qui n'est donc pas souhaitable dans l'hypothèse d'un séchage à l'étuve.

La ventilation de l'étuve et l'étalement « monocouche » des échantillons facilitent le séchage et évitent des phénomènes d'échauffement particulièrement redou-

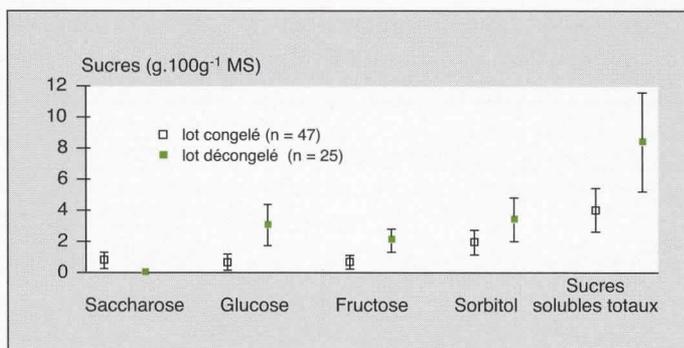


Figure 1. Conséquence d'une décongélation accidentelle d'échantillons frais de racines et d'écorces de pêcher sur la composition en sucres solubles (glucides non structuraux autres que l'amidon).

Les échantillons prélevés ont été plongés, dès leur constitution, dans l'azote liquide puis stockés à -20 °C. Une partie de ces échantillons a subi une remontée progressive en température jusqu'à 18 °C avant d'être recongelée. Tous les échantillons ont ensuite été lyophilisés, broyés et analysés pour leur composition en sucres solubles selon la méthode de Gomez, *et al.* [53]. Les traits verticaux représentent l'écart type.

Figure 1. Unfortunate thawing result on soluble sugar contents of peach root and bark fresh samples.

tés avec des lots de feuilles. Une étude expérimentale classique sur plante entière, génère une grande diversité d'échantillons qui doit être prise en compte. L'étuvage d'échantillons de même nature devrait permettre d'optimiser ces conditions de séchage. La multiplication incidente des procédures explique cependant que cette démarche ne soit pas adoptée dans la pratique.

Les conditions de séchage sont très variables : les échantillons destinés à l'analyse des sucres peuvent être soumis plusieurs heures à des températures égales ou supérieures à 80 °C (48 h chez le prunier [26]). Néanmoins, le risque de caraméliser des sucres incite en général à travailler à des températures plus basses, voisines de 60-65 °C pendant 72 h et plus (*tableau 1*). La durée d'étuvage peut s'allonger pour des températures encore plus basses : Blunden et Wilson [27] préconisent 5 jours à 50 °C, pour sécher des graines de patience, de ronce et d'ortie. Sécher à ces températures évite la caramélisation mais reste propice aux métabolismes enzymatiques, également favorisés par la présence prolongée de l'eau. Travailler à 65-70 °C sous vide en présence d'un dessiccant (P2O5) semble un bon compromis, même si on ne peut éviter des conditions défavorables en début de séchage, lorsque l'échantillon frais est introduit dans l'étuve. La crainte d'une disparition de sucres simples par catabolisme oxydatif [18] ou d'une simple interconversion des SS (*i.e.* transformation d'un sucre en un autre par voie enzymatique) conduit à n'exploiter que la somme totale des SS [28]. Une évaluation globale des teneurs en GNS serait même préférable dans la mesure où Smith [18] note la disparition

de l'amidon de luzerne lors d'un séchage à l'étuve. L'hydrolyse de l'amidon serait d'autant plus élevée que la température d'étuvage est basse (de 0 % pour un séchage à 100 °C à 50 % à 25 °C). Selon Smith (1969) cité par Worley [29], un premier séchage d'échantillons ligneux de 90 min à 100 °C suivi d'un second à 70 °C pendant une nuit limiterait les pertes en CHO à ce qu'elles sont lors d'une lyophilisation.

La lyophilisation, éventuellement après broyage à froid de matériel frais volumineux [28], paraît être la meilleure technique de séchage. Elle garantit, *a priori*, l'intégrité des glucides et s'avère le passage idéal entre l'étape de stockage d'un échantillon frais, biochimiquement très instable, et le stockage à l'état déshydraté inerte. L'immersion préalable des échantillons dans l'azote liquide limite les risques de dégel et entraîne la rupture des parois cellulaires, ce qui facilite l'extraction des molécules d'eau lors de la lyophilisation et augmente la porosité du matériel végétal [30]. Une autre solution pratique consiste à ne lyophiliser qu'une partie de l'échantillon, constituée au hasard [23], ce qui pose cependant des problèmes de représentativité quand on sait que le dépôt de sucre n'est pas uniforme dans un organe donné.

La durée nécessaire au séchage est variable selon les organes (2 jours pour des feuilles, 6 pour du bois) et généralement supérieure à ce qu'elle serait à l'étuve. La lyophilisation ne permet pas une déshydratation aussi complète que le passage à l'étuve, et ce malgré une remontée en température à 40 °C usuellement pratiquée en fin de séchage.

Tableau 1. Principales procédures de préparation des échantillons ligneux et d'analyse des sucres solubles.

Table 1. Main procedures for sample preparation and soluble sugar measurement in ligneous plants.

Réf.	Année	Plante	Organe	Traitement des échantillons		Extraction des SS		Purification	Dosage
				Séchage *	Broyage + PE	Solvant	Durée, T°		
[35]	1993	cotonnier	feuille	lyoph	Disques tissus	E	15 à 30 min	charbon	enzymes
[64]	1991	pêcher	feuille		500 mg congelés broyés dans N liq	20 mL MCW (6 :3 :1) puis 8 mL W	2 h		enzymes (kits)
[21]	1992	peuplier, chêne blanc	feuille		morceaux frais	E80 %		charbon	enzymes
[121]	1998	peuplier	tige feuille, racine	48 h, 70 °C	50 mg broyés	5 mL tampon acétate 0,1 M	40 min		enzymes
[122]	1985	pommier	tige, feuille, racine	lyoph	200 mg broyés (40 mesh)	5 mL E80 % bouillant	5 min	résine	enzymes
[27]	1985	poirier	bourgeon	5 j, 50 °C	50 mg broyés moulins	5 mL M62,5 %	agitation, 1 nuit, T° ambiante	a. perchlorique charbon	enzymes
[12]	1985	abricotier	feuille			MCWF (12 :5 :2 :1)	- 25 °C	résine	CPG
[123]	1987	pêcher	écorce, phloème	lyoph	100 mg broyés	4 mL a. perchlorique 1,2 M	30 min, 0 °C		CPG
[124]	1999	pêcher	tige, fruit	lyoph	100 mg (tiges) 75 mg (fruit)	M80 %			CPG
[25]	1988	pommier	bois, écorce, racine		broyés dans E80 %	E80 % bouillant	15 min, 80 °C		CPG
[66]	1973	prunier	feuille, tige, racine	lyoph	100 mg broyés (40 mesh)	E80 %-E50 %-E80 %		résine	CPG
[19]	1987	cotonnier	feuille		Feuilles broyées dans E	E bouillant (1) + hexane (3)	30 min	résine + C18 ou charbon	CLHP ou enzymes
[125]	1987	épicea	bois	24 h, 60 °C	broyage, 5 min	E80 % (1,5mL/h)			CLHP
[69]	1985	<i>Eunonimus japonica</i>	feuille	lyoph	50 mg broyés au mortier	MCW (percolation)		résine	CLHP
[4]	1999	framboisier	tige, bourgeon	lyoph	10 mg broyés	4 mL E80 %	40 min		CLHP
[53]	2002	pêcher	feuille, écorce, bois, racine	lyoph	broyage (< 45 µm)	MCW (5 :5 :3)	agitation, 20 min, 4 °C	C18	CLHP
[54]	1993	pin	aiguille, tige, racine	lyoph	500 mg broyés	30 mL W + résines	agitation, 1 h, T° ambiante	résine	CLHP
[50]	1996	pin	racine		35 à 150 mg frais	0,5 mL E80 %	30 min, 80 °C	résine	CLHP
[47]	1973	pommier	branche, tronc, racine		10 à 20 g de morceaux frais broyés dans M	M80 %	ébullition puis 4- 6 h		CP + ¹⁴ C
[44]	1979	pommier	feuille, tige, racine	non	morceaux frais broyés dans M80	M80 %			CM
[75]	1964	hêtre	racine			E80 % bouillant sous reflux	30 min	hydroxyde de Ba résine	anthrone Cu ⁺⁺
[29]	1979	pécanier	feuille, tige, tronc, racine, écorce, bois	10 min, 100 °C + 1 nuit, 70 °C	broyés (60 mesh)	E80 % puis E60 %			anthrone
[126]	1982	abricotier	tige		500 mg broyés	E80 %	20 min		Anthrone Cu ⁺⁺
[127]	1988	ailante glanduleux	tige, bourgeon		2 g frais broyés dans E80 %	E bouillant			anthrone
[28]	1996	pêcher	feuille, tige, racine	lyoph	100 mg broyés (< 40 µm)	4 mL MCW (12 :5 :3)	30 min, T° ambiante	PVP	anthrone
[128]	1997	pêcher	feuille		Disques feuille frais (1 g)	E80 % (SS) ou 5mL W 4 °C (sorbitol + saccharose)			anthrone CLHP
[52]	1977	pêcher	feuille, bourgeon,	lyoph	250 mg broyés	25 mL H3BO3 0,1M pH8 E80 %		Acétate de Na Oxalate de K résine	orcinol phénols CM + ¹⁴ C phénols
[45]	1986	conifères	aiguille, tige, racine						phénols CM + ¹⁴ C phénols
[129]	1990	pêcher	tige	90 °C	3 g du mélange (100 g sec broyés + 100 mLW)	40mL E95 % puis E60 %	10 min, 60 °C		
[120]	1970	pêcher	bourgeon de fruit	lyoph	200 mg broyés (< 60 mesh)	0,2 % a. benzoïque			ferricyanure
[3]	1981	pêcher	tige, racine, écorce, bois	lyoph	500 mg broyés	E80 %	T° ambiante		ferricyanure
[99]	1981	peuplier	tige	lyoph	50 mg broyés (40 mesh)	3 mL MC (1 :2) puis 3 mL MC (2 :1) + sol CaCl2		résine	DNSA, CM
[56]	1993	conifère	aiguille, tige, racine	100 °C 1 h puis 70 °C	broyage (< 5 mm)	35 mL W	48 h, 55 °C, agitation	dialyse	PAHBAH
[78]	1977	<i>Bryophyllum</i>	feuille		frais broyé dans M80 %	M80 %	20 min, ébullition	résine	¹³ C par spectrométrie
[63]	1979	peuplier	feuille		3 à 50 mg broyés	2 mL MCW (12 :5 :3)		résine	¹⁴ C

Classement selon la méthode de dosage des sucres.

Travaux sélectionnés parmi 55 articles recensés, non redondants quant aux auteurs, matériel végétal et méthodologie.

* séchage par défaut à l'étuve sauf quand lyophilisation précisée (lyoph).

Purif : purification ; T : température ; N : azote ; lyoph : lyophilisation ; congel : congélation ; E : éthanol ; M : méthanol ; C : chloroforme ; W : eau ; F : acide formique ; CPG : chromatographie phase gazeuse ; CLHP : chromatographie liquide haute performance ; CP : chromatographie sur papier ; CM : chromatographie sur couche mince ; PAHBAH : acide p-hydroxybenzoïque hydrazine ; DNSA : acide dinitrosalicylique ; PVP : polyvinylpyrrolidone.

D'après nos mesures, des échantillons de tomate conservent, après lyophilisation, une humidité résiduelle qui disparaît progressivement à l'étuve lorsque la température augmente (figure 2). C'est particulièrement vrai avec les tiges et pétioles pour lesquelles on mesure une erreur relative de 6,1 % de la MS mesurée à la sortie du lyophilisateur (valeur de référence mesurée à 105 °C).

Il est nécessaire de limiter cette présence résiduelle d'eau qui contribue probablement au métabolisme glucidique observé

à l'issue du stockage d'échantillons lyophilisés (dans des broyats de feuilles de blé [18], et chez le pommier [31]).

Le calcul de la MS est nécessaire afin d'exprimer les teneurs en GNS en fonction de la matière fraîche. Pour les échantillons ligneux, il est habituellement réalisé sur une aliquote, par étuvage à 103 °C pendant 48 h [32], et ce, malgré les pertes éventuelles de matière organique évoquées précédemment. Pour des échantillons tel que les fruits, riches en GNS, 72 h à 96 h d'étuve à 70 °C nous semblent

préférables, l'emploi d'une étuve sous vide permettant cependant de baisser la durée de ce séchage à 6 h.

Dans la mesure où l'on doit lyophiliser intégralement un échantillon, sa teneur en MS peut être établie comme suit :

– pesée de l'échantillon avant et après lyophilisation pour déterminer sa biomasse apparente (MSa) ;

– mesure de son humidité résiduelle (Hr) sur une aliquote (24 h, 103 °C). La biomasse sèche s'obtient en appliquant la formule suivante :

$$MS = MSa (\% MF) / (100 - Hr (\% Msa)) \times 100.$$

Le calcul de l'humidité résiduelle est de toute façon nécessaire avant chaque dosage. Dans l'hypothèse où la masse d'échantillon est trop faible, un facteur de correction moyen propre à chaque tissu (écorce, bois, racine...) peut être appliqué. Dans le cas d'échantillons de salade, l'erreur relative moyenne pour les MS établie après lyophilisation est de 2,15 % pour des limbes, de 3,7 % pour les racines et enfin de 6,1 % pour les tiges et pétioles (figure 2).

Broyage

C'est une étape fastidieuse, mais de première importance. Hautement répétitive, sa réalisation doit être minutieuse et non dénaturante, pour permettre l'obtention d'une poudre végétale (PV) homogène dont dépendent la précision et la justesse des analyses. On utilise essentiellement des broyeurs à couteaux et des broyeurs à billes, ces derniers permettant, selon nous, une meilleure adaptabilité des conditions de broyage (capacité et nature des bols, nombre de billes, vitesse, durée, réfrigération) à la nature ligneuse de l'échantillon et aux analyses glucidiques programmées.

Il est rare, car plus difficile, de broyer correctement du matériel frais [33, 34]. C'est une procédure à risque compte tenu de la fragilité d'un matériel riche en eau (décongélation) et de la difficulté d'homogénéisation et de récupération intégrale du broyat. Elle permet néanmoins de s'affranchir des contraintes liées au séchage et au stockage de grands volumes de matériel végétal. Son choix est souvent dicté par des contraintes expérimentales, liées à la taille et à la nature des organes prélevés (pré-broyage de bois [28], limbe de feuille [35], pulpe de fruit [36]) ou encore à la spécificité des dosages (risques de dénaturation par chauffage).

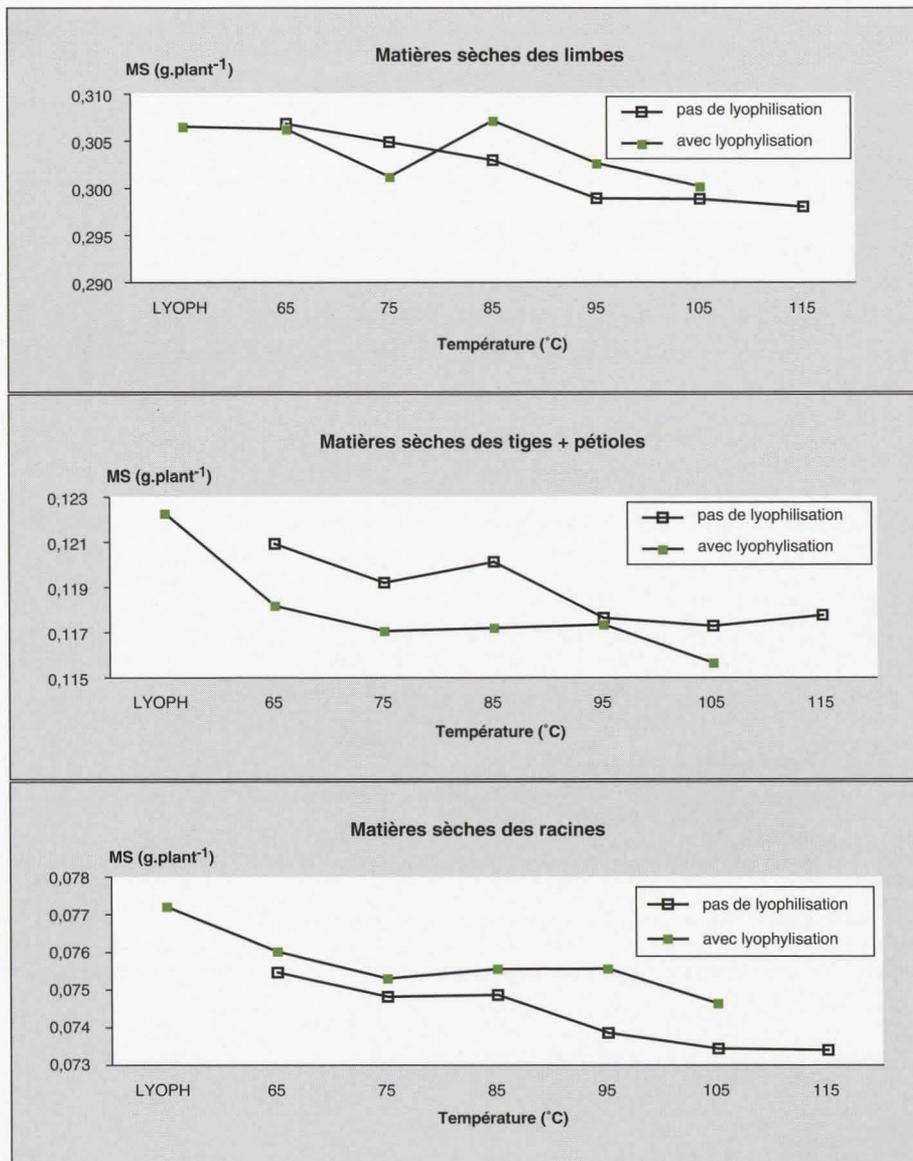


Figure 2. Évaluation par mesures thermogravimétriques à l'étuve, de la capacité déshydratante du séchage par lyophilisation d'échantillons de tomates (Adamowicz, non publié).

Les teneurs en MS ont été mesurées par pesée après étuvage à des températures croissantes (24 h pour chaque pallier de température) de lots de huit échantillons de limbes, de tiges + pétioles et de racines, lyophilisés (96 h) ou non (étuve, 72 h à 65 °C).

Figure 2. Dessication capacity of freeze-drying on tomato samples, determined by thermogravimetric measurements (Adamowicz, unpublished data).

Le broyage concerne généralement des végétaux secs. La granulométrie de la PV conditionne la représentativité de la prise d'essai (PE) d'échantillon pour analyses, et l'efficacité de l'extraction des GNS. Nos données expérimentales (figure 3) montrent que, dans la mesure où la prise d'essai (PE) est suffisante (50 mg), le broyage fin (taille des particules < 50 µm) améliore le recouvrement de l'amidon dans une racine primaire de pêcher. En absence de broyage, jusqu'à 50 % de l'amidon présent n'est pas libéré par autoclavage et échappe ainsi au dosage. Cette inaccessibilité de l'amidon est particulièrement évidente lorsqu'on travaille sur un seul morceau de racine de 100 mg. Les SS, en revanche, sont correctement mis en solution après un broyage grossier.

Pendant le broyage, il doit y avoir conservation des caractéristiques chimiques de l'échantillon sans perte (sucres, protéines, etc.) ni enrichissement (contamination par un autre échantillon, hydratation). Le risque principal est le brunissement (lié au catabolisme des sucres réducteurs) par échauffement de la poudre végétale (PV), dû aux forces de frottement. Il est d'autant plus élevé que la vitesse et/ou la durée du broyage est grande et la réfrigération insuffisante. L'emploi de neige carbonique et surtout d'azote liquide pour refroidir les échantillons et les bols de broyage est intéressant, bien qu'il induise parfois une rétraction thermique des masses métalliques gênant les montages et démontages du broyeur.

Le broyage à froid doit être privilégié pour assurer l'intégrité glucidique d'échantillons ligneux dont la durée de broyage est souvent supérieure à 3 minutes. Pour optimiser cette durée, le choix du matériel (modèle de broyeur, taille des bols, nombre de billes, etc.) doit être effectué en fonction du volume, de la densité et de la dureté des échantillons. Certains appareils permettent en outre d'adapter la vitesse de broyage.

Stockage

Il concerne des échantillons frais ou secs, broyés ou non. Ses conditions sont d'autant plus importantes que la présence d'eau favorise l'activité cellulaire et que la composition glucidique est sensible à la température de stockage. Sauter [17] constate que l'amidon se dégrade rapidement au voisinage de 0 °C et change peu à 5 et 10 °C tandis que la teneur en saccharose augmente quand la température baisse. Une conservation à température négative

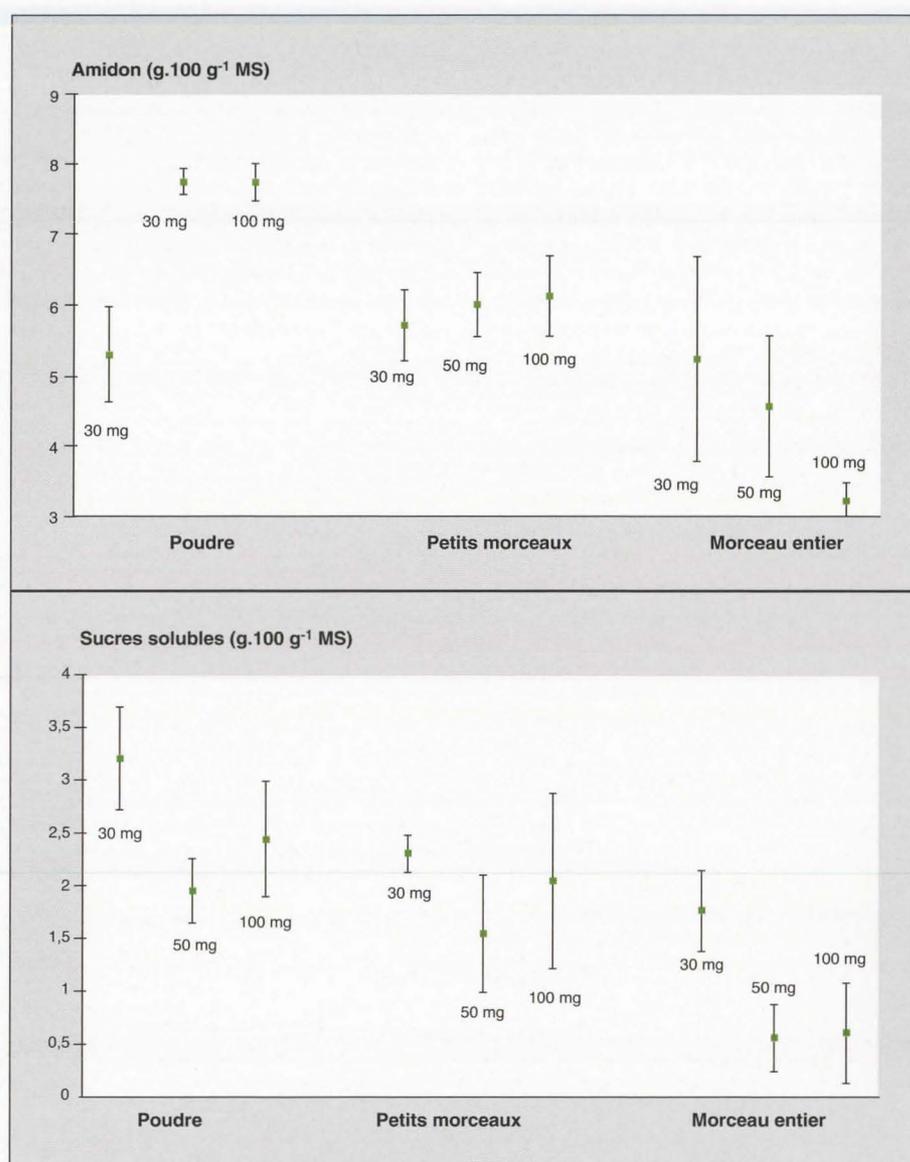


Figure 3. Influence de la prise d'essai (masse et finesse de broyage) sur la teneur en glucides non structuraux d'un échantillon de pêcher.

Trois fractions d'un même échantillon lyophilisé de racine primaire ont été broyées plus ou moins finement (poudre végétale ≤ 50 µm, petits morceaux ≤ 3 mm, gros morceaux ≤ 10 mm). Le dosage des glucides non structuraux (n = 5) a été réalisé selon Gomez, *et al.* [53, 90] après extraction dans un mélange ternaire (10 mL d'un mélange V/V eau-méthanol + 3 mL de chloroforme) à partir de différentes prises d'essai d'échantillon (30, 50 et 100 mg). Les traits verticaux représentent l'écart type.

Figure 3. Effect of test portion (weight and fineness of grinding) on non-structural carbohydrates contents from peach samples.

(- 20 °C) est préférable car certains enzymes comme l'invertase sont actifs à 0 °C [37]. L'interconversion des sucres peut cependant se produire quelle que soit la température de stockage [18, 19]. Smith souligne l'existence d'une variation importante des concentrations en glucose, saccharose et fructose au cours du temps (12 mois) dans des broyats de feuilles de blé lyophilisées, conservés en flacons scellés à température ambiante

[18]. Ces concentrations peuvent doubler en 6 mois pour le fructose. Comme Abusrewil, *et al.* [31] chez le pommier, il mentionne une baisse de l'amidon (- 25 %) après stockage, compensée par une élévation concomitante de la teneur en sucres solubles, la quantité totale des GNS n'étant pas modifiée de plus de 5 %. Selon Brown et Summers, le métabolisme glucidique se poursuit en dessous de - 20 °C : 8 % du saccharose présent dans

du jus de melon serait hydrolysé en fructose et glucose après 37 jours à -30°C [38]. Quelles que soient les températures de stockage, il est en effet très difficile de limiter la réhydratation de PV fortement hydrophiles. Comme Gurakan, *et al.* [32] sur des extraits secs de champignons, nous constatons en sortie d'étuve une réhydratation immédiate de PV, rarement supérieure à 2 % et se stabilisant rapidement (figure 4). Même si c'est surtout un phénomène précoce après séchage, la reprise d'humidité se poursuit lors du stockage. Gary et Vandame [non publié] notent que des échantillons secs de tomates conservés un an à température ambiante en flacons plastiques scellés, reprennent entre 4 et 6 % d'humidité pour les feuilles et tiges et jusqu'à 11 % pour les fruits. De notre côté, nous observons que des PV lyophilisées de différents organes de pêcheurs, conservées 3 mois en flacons plastiques scellés à -80°C , reprennent en moyenne 1 % d'humidité (figure 4). Même si la réhydratation des échantillons paraît inévitable, ce phénomène semble d'autant plus lent que la température de stockage est basse.

Pour un stockage prolongé (plusieurs mois), la congélation à -80°C est un moyen efficace de freiner le métabolisme glucidique. Toutefois, compte tenu de l'incapacité à stabiliser durablement la composition glucidique, il est souhaitable de réaliser les dosages glucidiques à court ou moyen terme et de limiter, si possible, les prélèvements répétés d'aliqotes, synonymes de contamination potentielle et de phases « congélation-décongélation » qui nuisent à l'intégrité biochimique d'une PV.

Fractionnement et purification des glucides non structuraux

Sans être exhaustifs, les tableaux 1 et 2 donnent des exemples d'application de techniques de fractionnement, de purifi-

cation et de dosage des GNS chez les ligneux. Ne sont pas répertoriés les nombreux travaux sur les céréales et les grains (*cf.* pour exemple, les travaux en France des équipes de Mercier [39-41] et Cerning-Beroard [42, 43]), qui ont pu inspirer les procédures utilisées pour les ligneux. Si le choix d'un dosage individuel ou global des GNS est lié aux objectifs expérimentaux, les possibilités analytiques et plus particulièrement la préparation des extraits glucidiques peuvent limiter le nombre d'analyses. Cette préparation s'avère en général plus longue et plus complexe qu'elle ne l'est pour les fourrages et les céréales, sous l'effet combiné d'une concentration en GNS très variable et souvent très faible (0 à 50 % de la MS selon les organes), et d'une grande diversité biochimique des échantillons ligneux (effet matrice). Comme nous allons le voir, elle consiste le plus souvent à fractionner, puis à purifier, les GNS. Plutôt que de décrire chaque technique de dosage disponible et les procédures de fractionnement et de purification associées, nous avons préféré faire une présentation chronologique de ces étapes, plus claire et moins redondante. Les différentes options expérimentales possibles, compte tenu des objectifs et des contraintes seront schématisées en conclusion (figure 5).

Extraction des sucres solubles

Principe

L'extraction des SS est généralement obtenue par macération répétée dans un solvant, d'une PE réduite ($< 200\text{ mg}$) d'échantillon. La qualité d'une extraction s'estime sur sa capacité de séparation et de maintien de l'intégrité des fractions, en évitant la perte ou l'interconversion des sucres. Les caractéristiques de l'échantillon analysé (structure, composition biochimique, granulométrie, PE) contribuent à diversifier les procédures utilisées.

Échantillon

Le travail sur produit frais non broyé [44, 45] fait l'hypothèse, d'une part, que la PE est représentative de l'échantillon prélevé et, d'autre part, que l'extraction des sucres solubles d'un ligneux non broyé est complète, ce qui n'est pas souvent le cas. Aussi, la grande majorité des auteurs préfèrent-ils travailler sur du matériel sec et broyé (tableau 1). Cinquante à 100 mg d'échantillon constituent des PE convenables. À l'extrême, on rencontre des procé-

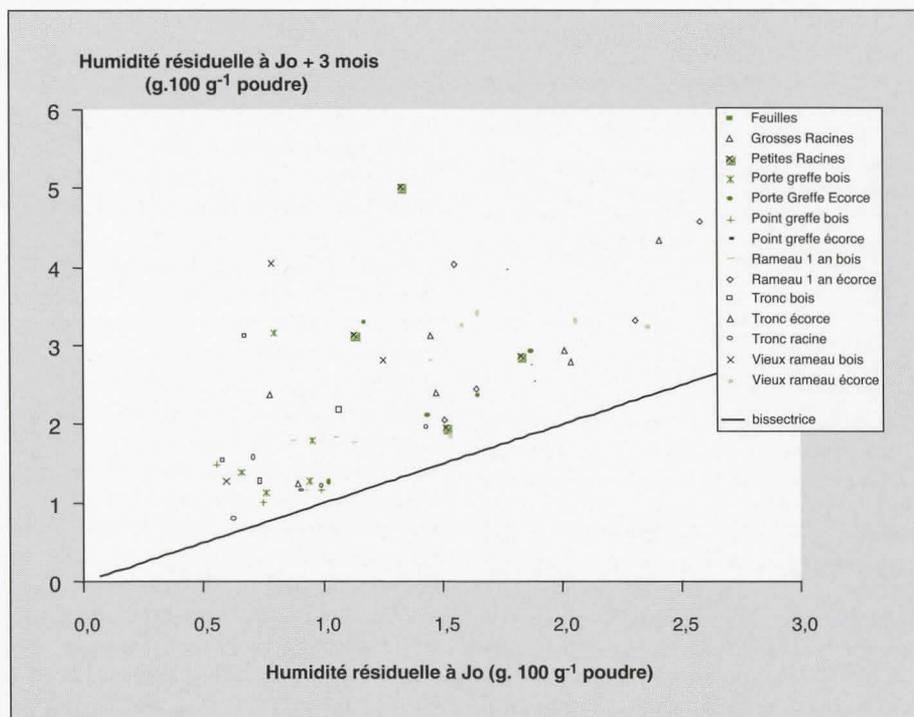


Figure 4. Reprise d'humidité de poudres lyophilisées de pêcheur, au cours d'un stockage de 3 mois à -80°C en flacons fermés.

L'humidité résiduelle a été mesurée (étuve, 48 h à 100°C) sur des poudres de différents organes après lyophilisation et 6 heures de stockage en flacons fermés à température ambiante (Jo), puis après 3 mois de conservation à -80°C (Jo + 3 mois).

Figure 4. Moisture regain of freeze-drying peach tree powders during a 3-month storage at -80°C in bottles with stopper.

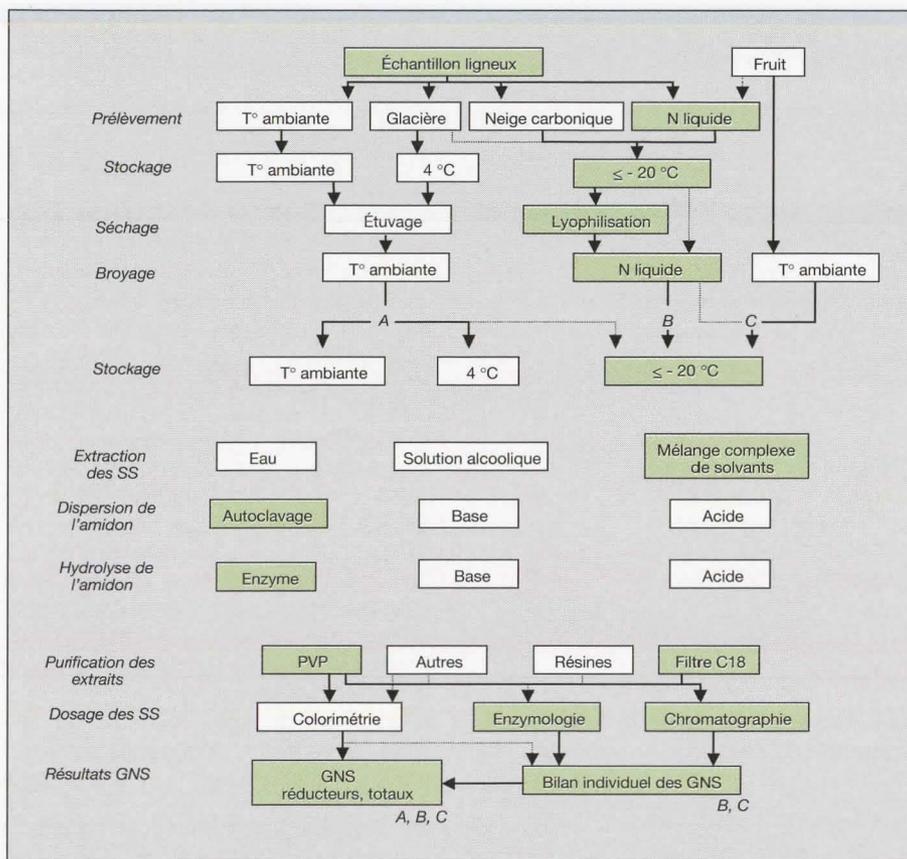


Figure 5. Synthèse des options méthodologiques disponibles pour le dosage des glucides non structuraux chez les ligneux.

Les flèches indiquent les enchaînements d'étapes recommandés (trait plein), voire possibles (pointillés), compte tenu de l'exploitation analytique programmée. Les options de stockage et de broyage sont caractérisées par la température de réalisation. Les cellules sur fond vert indiquent notre préférence pour la réalisation d'un bilan détaillé des GNS.

A : poudre végétale séchée à l'étuve ; B : poudre végétale lyophilisée ; C : échantillon frais broyé ; SS : sucres solubles ; GNS : glucides non structuraux ; PVP : polyvinylpyrrolidone.

Figure 5. Current procedures for measuring non-structural carbohydrates in lignified plants.

dés de macération de quantité importante de tissus (jusqu'à 30 g) [33, 46, 47] et des extractions sur des PE très faibles, inférieure à 10 mg [17, 48-50]. Même si les volumes de solvants employés paraissent adaptés à ces PE, le rapport PE/VS (avec PE en g sec et VS la somme des volumes de solvants aqueux en mL) reste très variable d'une étude à l'autre (à titre d'exemples : $0,133 \cdot 10^{-2}$ pour MacRae [51], $0,714 \cdot 10^{-2}$ pour Roper, *et al.* [20], $1 \cdot 10^{-2}$ pour Lasheen et Chaplin [52]). Sa valeur peut traduire une extraction insuffisante (rapport trop grand), une perte de végétal (PE trop faible), une dilution trop importante et un traitement difficile d'extraits trop volumineux (rapport trop petit). Selon nos observations, un rapport PE/VS voisin de $0,5 \cdot 10^{-2}$ permet l'extraction complète et homogène des SS au bout de 20 min de contact, sous agitation permanente, seule une aliquote représentative

de l'extrait VS étant ensuite conservée pour le dosage des SS [53].

Solvants

Les mélanges alcool-eau sont des solvants à choisir en fonction du PM des oligosides à extraire [41]. Ainsi, l'éthanol bouillant à 80 °, le plus utilisé chez les céréales, permet d'extraire 98 % des oligosides de PM inférieur à 2 000, soit un degré de polymérisation de 1 à 12 hexoses (chaînes courtes à l'exception des dextrans), sans altérer les polysides (amidon, constituants pariétaux) du résidu. L'eau est le solvant utilisé le plus simple pour extraire les SS à partir d'une PV sèche [54-56] ou d'un échantillon frais [17, 57]. Généralement pratiquée à chaud l'extraction peut durer de quelques minutes [58] à plusieurs heures [56] et s'avérer tout aussi efficace que l'extraction à l'aide d'un mélange de solvant [59]. L'eau est

cependant moins employée qu'une solution alcoolique qui a l'avantage de bloquer en partie l'activité métabolique (même si certains enzymes comme l'invertase restent fonctionnels en milieu hydro-alcoolique) et de favoriser la conservation de l'échantillon (tableau 1). Chez les ligneux, la littérature fait état d'une grande diversité d'utilisation des solutions alcooliques, selon des finalités parfois contradictoires : Yoshioka, *et al.* [25] extraient les SS dans l'éthanol bouillant à 80 % pendant 15 min avant dosage de l'amidon résiduel, alors que Claire, *et al.* [60] utilisent des conditions pratiquement analogues (méthanol bouillant à 40 % pendant 15 min) pour extraire l'amidon résiduel après extraction des SS (méthanol à 40 % pendant 20 h à 4 °C). Par ailleurs, l'emploi préférentiel de solutions alcooliques à 70-80 % peut paraître injustifiée dans la mesure où une solution de méthanol 50 % permet une extraction complète et rapide des SS [53].

Les extractions en milieu non alcoolique sont rares : on peut citer l'emploi d'une solution d'acide borique 0,1M à pH 8 par Lasheen et Chaplin [52] ou encore l'extraction en milieu non aqueux (tétrahydrofur et heptane) de Gerhard et Held [61] pour qui l'absence d'eau prévient les risques d'interconversion enzymatiques des sucres. Enfin, dans l'optique d'un dosage global des GNS, on peut réaliser une extraction en milieu acide [18], mais le risque d'hydrolyse des constituants pariétaux existe.

Les procédures d'extraction chez les ligneux sont souvent rendues complexes par une purification concomitante des extraits pour éliminer des composés indésirables (tanins, pigments, etc.) [19, 53, 62], et/ou pour préparer d'autres analyses (constitution d'extraits protéiques et lipidiques) [63]. Le cas le plus fréquent est l'utilisation d'un mélange chloroforme, eau et méthanol [12, 63-65]. Nous avons récemment confirmé, pour différents organes de pêcher (travaux non publiés sur abricotier, tomate, kiwi, manguier, goyavier et caféier), l'efficacité de cette extraction et son adaptation à l'analyse chromatographique [53], et enzymatique [non publié]. Dans l'état actuel des connaissances, compte tenu de la grande diversité matricielle des végétaux ligneux et des contraintes liées aux différentes techniques de dosage disponibles, la proposition d'une méthode d'extraction universelle des sucres solubles coïnciderait

assurément avec ce type d'extraction complexe, associant plusieurs solvants.

Autres variables expérimentales

Il existe un consensus sur la nécessité de répéter l'extraction afin d'épuiser totalement le résidu de ses SS. Le nombre de lavages peut varier de deux à cinq selon les organes étudiés [35]. MacRae [51] considère que la majorité des sucres solubles sont extraits après deux bains ; cependant, comme d'autres [38, 66], il pratique trois extractions par sécurité. La durée très variable des trempages (10 min jusqu'à 5 h et plus pour Hansen et Grauslund [47] ou Yamada, *et al.* [33], et même 20 h pour Claire, *et al.* [60]), soumis ou non à une agitation, contribue aussi à multiplier les procédures.

Les conditions d'extraction peuvent favoriser certains métabolismes pénalisants pour l'analyse des sucres. En s'oxydant en quinones, les tanins libèrent par exemple des dérivés glucidiques courts [67] qui faussent l'estimation globale des GNS. L'ajout d'anti-oxydant au mélange d'extraction permet d'éviter ce métabolisme.

Purification des sucres solubles

La purification des extraits complète, le plus souvent, une procédure d'extraction déjà sélective. Son rôle est d'optimiser les conditions de l'analyse en éliminant des sources d'inférences au dosage des SS, associées à la matrice végétale ou à un solvant. En cela, elle dépend directement des techniques de dosage et de leur spécificité, les options enzymatiques paraissant les moins exigeantes. La plupart des procédures intègrent cependant l'élimination des phénols qui, avec les pigments et les protéines, sont les composés les plus indésirables.

En 1949, Bevenue [68] est le premier à souligner la nécessité de clarifier les extraits et préconise l'emploi du charbon d'origine animale qui, contrairement au charbon végétal, n'absorbe pas les SS (taux de recouvrement du saccharose variable de 47 à 87 %). Ce traitement améliore le taux de recouvrement des SS des tissus riches en phénols [19]. Comme le PVP [69] ou encore l'acétate de plomb et l'oxalate de potassium [52], le charbon permet en effet l'élimination de composés phénoliques, solubles en milieu alcool-eau et capables en se complexant avec les oses de perturber leur dosage [27, 70]. Ainsi, les tanins, souvent présents en quantités très importantes chez les ligneux, sont des composés polyphénoli-

ques complexes pouvant s'associer au glucose et aux alditols [71]. Cette propriété complexante peut d'ailleurs être exploitée pour doser les sucres totaux dans les échantillons débarrassés de leurs phénols d'origine [70].

La présence importante de protéines est susceptible de fausser les mesures d'absorbance lors d'un dosage colorimétrique des SS [41]. Leur élimination est obtenue par dialyse [56], par précipitation au froid (dans l'acétone), ou par défécation selon différentes façons : précipitation par le tétrachlorure de carbone [72], par acide perchlorique [27], par l'agent Carrez [73] ou encore, selon la méthode de Somo-gyi [74], par le sulfate de zinc associé à l'hydroxyde de barium [75] ou à la soude [51].

Lipides et pigments peuvent être également éliminés à l'aide de chloroforme [53, 62-64] ou d'hexane [19] lors de l'étape d'extraction des SS, ou par chromatographie sur résine (*tableau 1*). Cette technique reste lourde et onéreuse, malgré la commercialisation de filtres spécifiques. Les résines échangeuses d'ions de type Dowex sont souvent employées pour fractionner l'ensemble des solutés organiques (SS, acides aminés, acides organiques, lipides) en prévision d'une analyse détaillée [66, 76-78].

Bien que plusieurs dosages soient praticables en milieu hydro-alcoolique (dosage à l'antrone, dosage enzymatique du glucose, etc.), les solvants d'extraction (alcool, chloroforme) sont le plus souvent éliminés par évaporation sous vide [53] ou sous flux d'azote [19], et le résidu est resolubilisé dans l'eau. Il n'y a pas de données bibliographiques concernant une éventuelle interconversion des sucres lors de cette manipulation pratiquée à température ambiante.

La nécessité de purifier les extraits peut se discuter. Cependant, d'une façon générale, l'élimination des phénols et des solvants d'extraction, voire des chaînes apolaires (passage sur pré-colonne C18) dans le cas d'une analyse par CLHP [19, 53], nous paraît souhaitable pour le dosage des SS chez les ligneux (meilleure résolution des chromatogrammes).

Solubilisation et hydrolyse de l'amidon

L'amidon est généralement extrait du résidu ligneux pour être dosé. Il est possi-

ble de le mesurer directement par gravimétrie, polarimétrie ou colorimétrie, bien que la précision de ces méthodes ne soit pas satisfaisante pour les échantillons ligneux : en effet, le pouvoir rotatoire n'est correctement mesurable que sur des échantillons concentrés en amidon (grains, tubercules) et certaines méthodes d'hydrolyse utilisées, notamment en milieu acide, ont la propriété de le modifier [79]. La réaction colorée de l'amidon, ou plus exactement de sa composante « amylose », avec une solution I₂-KI (formation d'un complexe polyiodine bleu foncé) est parfois utilisée pour estimer la concentration relative en amidon du fruit [80]. La méthode classiquement employée pour mesurer précisément l'amidon des ligneux consiste à doser la quantité de glucose libéré par hydrolyse de l'amidon dispersé. Dispersion et hydrolyse de l'amidon sont étroitement liées et peuvent ne constituer qu'une seule étape dans certains cas d'attaque acide ou basique. La dispersion demeure indispensable avant une hydrolyse enzymatique, même si elle n'est pas toujours mentionnée dans la procédure expérimentale [81].

Dispersion

Que les granules d'amidon soient libres (sève cellulaire des racines riches en eau et des tubercules) ou liés à d'autres composants (graine, feuilles, bois), l'amidon est inclus dans une masse insoluble dans l'eau, composée pour l'essentiel de protéines et de polysides [82]. En cassant cette structure cellulaire et en rompant les liens avec cette matrice environnante, l'amidon libéré devient accessible aux substances hydrolysantes. C'est le but de la dispersion que l'on peut décomposer en 2 phases : a) la gélatinisation qui s'apparente au gonflement du granule d'amidon obtenu par l'hydratation du polymère à l'aide, par exemple, d'eau bouillante ou d'alcool chaud [83] ; b) l'hydrolyse en petits morceaux d'amylose ou d'amylopectine [84].

Depuis la mise en évidence par Fluckinger au XIX^e siècle, de la dissolution de l'amidon par le chlorure de calcium, les procédures d'extraction se sont diversifiées selon le matériel végétal traité. La technique peut être aussi simple qu'une extraction dans l'eau bouillante pendant 3 min [66], mais les procédures sont généralement plus complexes afin d'optimiser l'extraction et de prévenir les interférences lors du dosage. Suite aux travaux de Ewers [85], des substances corrosives, acides ou basiques, sont

utilisées pour la dispersion de l'amidon. Elles constituent près de 50 % des conditions de dispersion chez les ligneux (*tableau 2*) : sont surtout utilisés les acides perchlorique (HClO₃) et chlorhydrique (HCl), puis la potasse (KOH) et enfin le diméthylsulfoxyde (DMSO) seul ou associé à HCl. Pour la plupart, ces attaques chimiques ont été initialement élaborées pour doser l'amidon résistant de certaines céréales et légumineuses (proportion importante d'amylose), avant d'être utilisées chez les ligneux, où la structure de l'échantillon et sa préparation (séchage, broyage) influencent leur efficacité. Comparativement aux grains de céréales, les teneurs en amidon sont en effet plus faibles chez les ligneux où l'amidon est réparti de manière très hétérogène selon les tissus, au sein d'une structure cellulo-

ligneuse souvent importante (bois). Il est nécessaire de trouver une adéquation entre nature et présentation de l'échantillon, molarité de l'acide ou de la base, durée et température de la réaction. Cette recherche explique la diversité des conditions expérimentales à l'image d'une durée de réaction variant de 30 min à 24 h. La concentration des solutions utilisées est importante, tant pour l'intégrité des glucides pariétaux que pour la bonne réalisation de l'étape suivante (hydrolyse de l'amidon). Une attaque chimique trop forte peut hydrolyser des constituants pariétaux comme la pectine [86] et libérer des glucides de structure. Cela explique l'usage préférentiel de solutions acides ou basiques à une normalité inférieure à 1 (*tableau 1*), même si des concentrations plus élevées sont parfois utilisées :

Lerman, *et al.* [57] solubilisent l'amidon de feuilles de *Briophyllum* après extraction des solubles à l'aide d'une solution de soude à 17,5 % tandis que l'acide perchlorique peut s'employer à des concentrations supérieures à 30 % [87]. Par ailleurs, des conditions de dispersion efficaces, en particulier le pH, s'avèrent souvent incompatibles avec une hydrolyse enzymatique optimale de l'amidon et nécessitent une correction (retour à un pH voisin de 4,6). À noter qu'une concentration trop élevée de DMSO inhibe partiellement l'action de l'amyloglucosidase [88].

Près du tiers des dispersions sont réalisées dans des conditions plus douces, à chaud avec de l'eau, voire un tampon acétate (*tableau 2*). Comme pour les attaques chimiques, ces conditions sont très

Tableau 2. Principales procédures de dosage de l'amidon chez les végétaux ligneux.

Table 2. Main procedure for starch measurement in ligneous plants.

Réf.	Année	Plante	Organe	Empesage ou dispersion	Hydrolyse	Dosage du glucose
[35]	1993	cotonnier	feuille	1 mL potasse 0,1M, bouillant, 1 h	amylase + AMG	HK + G6PDH + INT
[90]	2003	pêcher	feuille, écorce, bois, racine	autoclave, 120 °C, 2 bar 1 h ou KOH 4M	AMG	HK + G6PDH
[121]	1988	peuplier	feuille, tige, racine		amylase	HK + G6PDH
[130]	1998	peuplier	bois	5 mL HCl 1N, 60 °C, 1 h	AMG	HK + G6PDH
[21]	1992	peuplier, chêne blanc	feuille	1 mL potasse 0,2M bouillante, 1 h	amylase, 85 °C, 30 min + AMG	HK + G6PDH + INT
[54]	1993	pin	aiguilles, tige, racine	a. chlorhydrique - DMSO 60 °C, 30 min	AMG	HK + G6PDH
[131]	1999	pin	tige	1,5 mL a. chlorhydrique 30 mM puis potasse 30 mM (retour pH 4,6)	AMG, 55 °C, 1 h	HK + G6PDH
[122]	1985	pommier	feuille, tige, racine	3 mL potasse 0,2N, bouillante, 30 min	AMG + glucohydrolase, 55 °C, 1 h	HK + G6PDH
[20]	1988	cerisier	feuille, tige, racine	tampon acétate de sodium bouillant, 1 h	AMG, 55 °C, 16 h	GOD
[4]	1999	framboisier	tige, bourgeon	1 mL tampon acétate, bouillant, 15 min	AMG, 55 °C, 20 h	GOD-POD
[60]	1988	ipomoea purpura	tige	méthanol 40 % bouillant 10-15 min sous reflux (x 2)	AMG	GODPOD
[132]	1990	mandarinier, mangouier, ...	feuille, tige, tronc, racine		amylase + AMG, 60 °C, 1 nuit	GOD
[64]	1991	pêcher	feuille	potasse 0,2N bouillante, 30 min	AMG, 45 °C, 4 à 6 h	enzyme (kit Boehringer)
[26]	1975	prunier, pêcher	feuille, écorce	W, bouillante, 3 min	AMG, 18 h	CPG
[124]	1999	pêcher	tige, fruit	10 mL W, 100 °C, 1 h	AMG, 55 °C, 48 h	CPG
[133]	1992	pêcher	feuille	W, bouillante, 135 °C 1 h (gélatinisation)	AMG	CLHP
[134]	2001	Glyricidia sepium	tige	18 mL NaOH 0,5M	AMG	CLHP
[126]	1982	abricotier	tige	a. perchlorique froid		anthrone
[127]	1988	aillante glanduleux	tige, bourgeon	W bouillante, 30 min (5 fois)	a. perchlorique 35 %	anthrone
[125]	1987	épicéa	bois	percolation d'acide perchlorique 35 %		anthrone
[135]	1966	pêcher	feuille, tige, tronc	a. perchlorique 4,8N, 100 °C, 24 h		anthrone
[128]	1997	pêcher	feuille	ébullition	AMG, 2 h	anthrone
[33]	1994	pommier	pomme	a. perchlorique 4,6N	a perchlorique 0,56N, bouillant, 2 h	anthrone
[45]	1986	conifère	aiguille, tige, racine		Diastase, 43 °C, 24 h	phénols
[99]	1980	peuplier	tige		clarase + diazyme	o-toluidine
[58]	1985	pêcher	feuille, tige, racine		takadiastase	ferricyanure
[56]	1993	conifère	aiguille, tige, racine	15 mL W, bouillante, 2 min	AMG, 55 °C, 48 h, agitation	PAHBAH
[119]	1995	rosier	feuille, bourgeon, fleur, tige, racine	autoclave, 130 °C, 2 bar, 1 h	AMG, 55 °C, 2 h	PAHBAH
[66]	1973	prunier	feuille, tige, racine	W, bouillante, 3 min	AMG	a.phénolsulfurique
[5]	1953	robinier	écorce	a perchlorique 4,7N		iodine
[25]	1988	pommier	bois, écorce, racine	a. perchlorique 30 %, 25 °C	Précipitation par solution de I ₂ -KI puis HCl	Photométrie
[47]	1973	pommier	racine, tronc, branche	a. sulfurique 1N, bouillant, 7 h		¹⁴ C
[63]	1979	peuplier	feuille	W, bouillante, 30 min	Clarase ou diazyme	¹⁴ C
[77]	1988	peuplier	feuille	a. chlorhydrique 20 %		¹³ C

Classement selon la méthode de dosage du glucose.

Travaux sélectionnés parmi 45 articles recensés, non redondants quant aux auteurs, matériel végétal et méthodologie.

W : eau ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; AMG : amyloglucosidase ; HK : hexokinase ; G6PDH : glucose 6P-déshydrogénase ; GOD : glucose oxydase ; POD : peroxydase ; IK : iodure de potassium ; PAHBAH : acide p-hydroxybenzoïque hydrazine ; INT : iodinitrotétrazolium.

variables, eu égard à la durée de la réaction (quelques min à 2 h). L'autoclavage (1 h à 120 °C et 2 bars), initialement proposé par Thivend, *et al.* [89] pour doser l'amidon en milieu complexe (céréales et légumineuses), constitue le moyen le plus élaboré et le plus fiable pour réaliser ce mode de dispersion. Cette technique enchaîne une phase d'ébullition à 100 °C permettant l'éclatement des grains d'amidon, puis une phase sous pression (2 bars) favorisant la libération et la mise en solution de ce polysaccharide de réserve. La comparaison avec une hydrolyse par KOH [90] nous a permis de confirmer son efficacité (précision, justesse) à disperser l'amidon de PV ligneuses. Réalisée en milieu aqueux, elle permet en outre un réajustement au pH optimal de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon, plus aisé qu'il ne l'est après une attaque chimique. Cependant, la nature de l'échantillon et l'accessibilité de l'amidon parfois encapsulé dans un réseau protéique serré, peuvent limiter les performances de l'autoclavage et justifier le choix d'une attaque plus corrosive [88]. La préparation de l'échantillon (*cf. supra*, le paragraphe *Broyage*) a une grande influence sur l'efficacité de cette phase de dispersion en favorisant l'accessibilité et la libération de l'amidon stocké.

Hydrolyse

La nature de l'amidon se caractérise en particulier par la proportion d'amylose (chaînes linéaires) et d'amylopectine (chaînes ramifiées). Cette caractéristique structurale conditionne l'efficacité de l'hydrolyse, l'amidon étant d'autant plus résistant qu'il est riche en amylose.

La dégradation de l'amidon dispersé s'effectue classiquement par voie enzymatique ou chimique. De par sa spécificité, la voie enzymatique est préférable à une attaque chimique, capable d'une hydrolyse partielle des glucides pariétaux [19, 91] à l'origine d'une surestimation de la teneur en amidon [55]. En outre, l'efficacité d'une attaque chimique varie selon la nature de l'amidon [79]. Le taux de recouvrement de l'amidon après une hydrolyse acide serait d'autant plus faible que le chaînon d'amidon est long : 91,7 % pour un taux de polymérisation de 6 contre 90 % s'il est supérieur à 24. La dégradation partielle par l'acide du glucose libéré est également envisageable pour expliquer une sous-estimation de la teneur en amidon.

L'utilisation d'enzymes, d'une spécificité bien établie [92], paraît moins problématique

et plus fiable. Des critiques portent néanmoins sur la qualité des extraits enzymatiques commercialisés [18, 93-96] ou sur la contamination glucidique par le biais des supports de ces enzymes [97]. Malgré tout, Rose, *et al.* [84] considèrent négligeable la surestimation de l'amidon imputable à l'emploi d'enzymes non purifiés. Contrairement à Denison, *et al.* [96], Hendrix [35] ne retrouve pas, dans plusieurs préparations d'amyloglucosidase, d'activité cellulolytique importante. Il note toutefois que ces enzymes possèdent une légère activité glucanase et la capacité d'hydrolyser la cellobiose. Pour minimiser ces dégradations, Hendrix recommande de limiter le temps d'exposition aux enzymes, ce qui est en contradiction avec d'autres procédures (*tableau 2*). Une purification préalable de l'enzyme autorise une conception plus libre et plus sûre de cette étape d'hydrolyse [51].

Alors que la température réactionnelle est assez constante (voisine des 55 °C requis pour une activité optimale de l'enzyme), la durée d'hydrolyse est très variable (de 1 à 48 h). La préparation de l'échantillon, la technique d'extraction de l'amidon, le type d'amidon et la quantité d'unités enzymatiques employée peuvent expliquer cette diversité. Chez le pêcheur, nos conditions expérimentales (50 mg PV autoclavé, 30 UI d'amyloglucosidase en solution, pH 4,6, agitation permanente à 56 °C) garantissent, en moins de 2 h, une hydrolyse complète de l'amidon dispersé [90].

Outre l'amyloglucosidase, d'autres enzymes sont employés, tels que la diastase de malt [45, 98], la diazyme 325 et la clarase [99, 100] ou encore la takadiastase [58, 101, 102], dont la préparation commerciale s'avère être un mélange d'enzymes comprenant l' α -amylase et la maltase [79]. L' α -amylase est également utilisée seule [31, 103, 104], bien qu'elle n'attaque que les liaisons 1-6 présentes dans l'amylopectine. Cela conduit à la formation de dextrines et par conséquent à sous-estimer la teneur en amidon [55]. De plus, elle possède une activité β -glucanase pénalisante [94], car susceptible de libérer du glucose. L'action de l' α -amylase pourrait être optimisée par la gélatinisation préalable de l'amidon [105].

Le plus souvent employée seule, l'amyloglucosidase peut néanmoins être associée à un autre enzyme. L'utilité de cette association, destinée à optimiser les performances de l'amyloglucosidase, est controversée. L'ajout d' α -amylase semble améliorer le taux de récupération de

l'amidon pur [55] et augmente la teneur en amidon mesurée dans les racines [106]. Cependant, cet effet positif pourrait être temporaire et disparaître avec l'allongement du temps de la réaction enzymatique, comme nous le constatons chez des échantillons de pêcheur tant aériens que racinaires, après 2 heures d'activité enzymatique [données non publiées]. Ces observations corroborent celles d'Hendrix sur des feuilles de cotonnier [35] qui montre que l'ajout d'un second enzyme n'a pour seul intérêt que de raccourcir la durée de la procédure expérimentale.

Dosage des sucres

Au-delà de la nécessaire adéquation avec les objectifs expérimentaux, plusieurs contraintes telles que le budget, l'équipement et la compétence humaine du laboratoire, guident le choix d'une technique de dosage des sucres. Nos statistiques portent sur 55 (dosage des sucres solubles) et 45 articles scientifiques (dosage de l'amidon), non redondants quant aux auteurs, matériel végétal et méthodologie. Une partie représentative de ces articles, pour la plupart cités dans le texte, constitue les *tableaux 1* et *2*. Il apparaît que les SS des ligneux sont majoritairement dosés par chromatographie (50 % des études répertoriées) et par colorimétrie ou volumétrie (34 %). Les techniques colorimétriques, plus faciles à mettre en œuvre, sont préférées pour réaliser la détermination globale des sucres alors que les options enzymatiques et chromatographiques, plus contraignantes dans leur réalisation, offrent des bilans détaillés. La proportion étonnamment faible des dosages enzymatiques (11 %) peut s'expliquer par l'absence d'automatisation et par une analyse individuelle des sucres, longue et coûteuse. Ils sont cependant privilégiés (33 % des cas), comme les dosages colorimétriques (48 %), pour l'analyse du glucose après hydrolyse de l'amidon, alors que le dosage d'un sucre seul ne justifie pas une analyse chromatographique (12 % des études, cependant).

Certaines études sont difficiles à répertorier dans la mesure où elles combinent plusieurs techniques pour les différents fractions glucidiques analysées. À titre d'exemple, Lewis et Harvey [75] utilisent d'abord la chromatographie sur papier et l'hydrolyse enzymatique des disaccharides pour identifier les SS, puis le dosage à l'anthrone et la réduction du Cu^{++} pour

quantifier respectivement les SS totaux et les sucres réducteurs.

Cet inventaire fait également apparaître la possibilité de quantifier les GNS par mesure isotopique du carbone (^{13}C et ^{14}C), après fractionnement des composants organiques sur résines [63, 66, 77], et montre surtout l'utilisation de techniques de mesures dans le proche infrarouge (SPIR) [107]. Cette technologie non destructive du végétal repose sur l'absorption différentielle des longueurs d'onde dans le proche infrarouge selon les constituants de la matière. Le développement pour les ligneux de cette technologie, depuis longtemps utilisée pour les céréales et les fourrages [108, 109] offre des perspectives dans le domaine de l'analyse biochimique de matériel végétal vivant. L'analyse d'un spectre recueilli à la surface d'une pêche permet déjà une estimation acceptable de ses teneurs en SS [110]. Cependant, la grande diversité matricielle observée entre organes ou tissus d'un même végétal ligneux, constitue actuellement un obstacle majeur à l'utilisation généralisée de la méthode SPIR, l'analyse s'effectuant par rapport à une gamme d'au moins 50 échantillons d'origine botanique identique. En outre, il est encore impossible d'effectuer une mesure non destructrice au niveau d'un tissu non superficiel (bois de tronc, par exemple).

Dosages enzymatiques

Ce sont à la fois les dosages les plus sensibles et les plus spécifiques [27, 35, 111, 112]. Une première étape enzymatique à l'aide d'invertase, isomérase et autres déshydrogénases [112] permet généralement de transformer les sucres en glucose, la forme glucidique la plus analysée. La glucose 6-phosphate déshydrogénase (estérification du sucre) associée à l'hexokinase est statistiquement la méthode enzymatique la plus courante pour doser le glucose, en particulier dans le cadre du dosage indirect de l'amidon des ligneux (*tableau 2*). La réaction enzymatique s'accompagne de la formation de NADH dont la production, mesurée à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de sucre présent [112]. Le dosage à la glucose oxydase associée à une peroxydase (méthode GODPOD) est la seconde option enzymatique pour doser le glucose [113]. Cette fois-ci, l'eau oxygénée produite par l'oxydation du glucose réagit avec un donneur d'hydrogène en donnant une coloration verte (mesurée à 560 nm), proportionnelle à la quantité de glucose présent.

La purification des extraits glucidiques ne permet pas l'élimination d'une absorbance, d'importance aléatoire, imputable à la matrice végétale soluble. Cette interférence au dosage doit être prise en compte par la réalisation de blancs, à savoir des mesures d'absorbance effectuées avant l'ajout d'enzyme [90].

Contrairement à la chromatographie, le dosage enzymatique ne révèle que les sucres recherchés, ce qui peut constituer un inconvénient majeur lorsque le profil glucidique est mal établi ou variable selon les conditions expérimentales. Si ce n'est pas le cas, et dans l'hypothèse où les enzymes sont commercialement disponibles, la principale contrainte analytique réside dans la nécessité de doser successivement les différents sucres. Les déterminations réalisées sur un même extrait, après ajouts successifs d'enzymes, restent délicates malgré des efforts de simplification [27]. L'utilisation d'automates (auto-analyseur ou lecteur de microplaques) [35, 114] ouvre cependant de nouvelles perspectives avec des rendements très performants du fait de la miniaturisation des méthodes (économie de réactifs). Enfin, en l'absence d'équipement, la disponibilité de kit d'analyses facilite la mise en œuvre de dosages bien que le coût en soit souvent élevé.

Analyses chromatographiques

Après que les premières analyses chromatographique des glucides chez les ligneux ont été réalisées sur papier ou sur couche mince dans les années 1960 [75, 115], l'emploi des techniques hautement résolutive que sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est devenu fréquent depuis une vingtaine d'années (*tableau 1*). La CPG est une méthode très sensible qui nécessite cependant la dérivation des sucres (dérivés silylés ou acétate d'alditols) pour les rendre volatils et l'emploi d'un étalon interne pour évaluer et corriger les pertes en sucres occasionnées par cette préparation. Après une phase séparatrice sur colonne, les sucres sont détectés de façon non spécifique en fonction de leur caractéristique physico-chimique, le plus souvent par réfractométrie (CLHP) ou ionisation de flamme après dérivation (CPG). L'ampérométrie pulsée, la spectrométrie de masse (après marquage isotopique) et la fluorimétrie sont des techniques de détection également utilisées.

La séparation des sucres par CLHP est fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. Il existe plusieurs mécanismes de séparation comme la formation de liaisons hydrogènes avec les groupements silanols d'une silice vierge, la rétention sur gel de silice greffée amine, ou encore la séparation de complexes borate-sucres anioniques sur résine échangeuse d'anions. Cependant la méthode la plus performante utilise des résines échangeuses de cations comme celle de la colonne Sugar Pack de Waters [53]. La séparation s'effectue selon un mécanisme complexe faisant intervenir l'échange d'ions et l'exclusion sur tamis moléculaire (séparation des composés selon l'encombrement stérique, les grosses molécules étant éluées en premier). L'identification des sucres s'effectue sur leur temps d'élu-tion (délais d'apparition au niveau du détecteur après injection), par similitude avec l'élu-tion d'un sucre étalon. Une erreur d'identification, ou pour le moins d'estimation, de la concentration d'un sucre est cependant possible par superposition totale ou partielle de plusieurs pics d'élu-tion (deux sucres peuvent avoir le même temps d'élu-tion). La détermination complète et concomitante de la composition glucidique d'un mélange demeure néanmoins l'attrait essentiel de méthodes par ailleurs moins sensibles et moins spécifiques qu'une méthode enzymatique.

Quel que soit le milieu (liquide ou gazeux) la préparation des extraits est lourde, même si une purification en ligne est possible à l'aide de pré-colonnes. En CPG, la dérivation des sucres pour les transformer en composés volatils est nécessaire, alors qu'en CLHP une purification insuffisante ou inappropriée affecte la résolution des chromatogrammes et la durée de vie des colonnes. Boersig et Negm [69] évoquent l'interconversion des sucres au cours d'une phase de purification complexe lorsque la quantité de résine utilisée est trop importante, le flux d'élu-tion trop lent ou encore que le pH de la phase éluate est trop bas. La diversité des échantillons ligneux explique en partie l'efficacité aléatoire d'une préparation [19]. En complément d'une purification élaborée des extraits (élimination des lipides par le chloroforme, des phénols par PVP, des chaînes apolaires par colonne C18), l'utilisation d'un standard interne (maltotriose) garantit une mesure fiable de la composition glucidique d'un échantillon ligneux par CLHP [53].

Analyses colorimétriques

Les techniques colorimétriques sont aujourd'hui moins utilisées du fait de leur moindre spécificité (quantification précise du glucose impossible selon Haissig et Dickson [100]), de leur faible précision (mauvaise reproductibilité nécessitant, de fait, la réalisation d'une gamme étalon à chaque série de dosage [41]) et des améliorations dont ont bénéficié les méthodes alternatives, notamment pour l'obtention d'un bilan glucidique détaillé. Cependant, leur facilité de mise en œuvre, leur complète automatisation et leur faible coût font qu'elles demeurent compétitives pour le dosage indirect de l'amidon ou pour une quantification globale des réserves glucidiques, particulièrement lorsque des interconversions entre

sucres ne peuvent être évitées lors des étapes préparatoires. Quoique rarement utilisé, le dosage colorimétrique individuel des SS est néanmoins possible, comme le proposent Lasheen et Chaplin [52], après séparation des sucres sur résine (dosage à l'orcinol sulfurique). La combinaison de plusieurs méthodes colorimétriques permet également d'établir un bilan glucidique détaillé [62].

Il existe deux grandes familles de techniques colorimétriques permettant la mesure des sucres totaux ou des sucres réducteurs. Toutes nécessitent une purification des extraits glucidiques plus ou moins poussée selon leur spécificité. La mesure des sucres totaux (2/3 des dosages colorimétriques chez les ligneux) repose sur la capacité des SS, à se

complexer en milieu sulfurique, avec un composé (anthrone, o-toluidine, phénols tels que l'orcinol) pour former un chromophore absorbant dans le visible. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de SS présent. Ce dosage n'intègre pas les alditoles comme le sorbitol ou l'inositol dont la prise en compte nécessiterait une oxydation préalable. Que ce soit pour le dosage colorimétrique des sucres totaux (tableau 1) ou celui du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon (tableau 2), la méthode à l'anthrone est la plus courante chez les ligneux. Cette méthode présente l'avantage d'être utilisable sur des extraits éthanoliques [116]. Selon la température réactionnelle, il est possible de mesurer séparément le glucose (95 °C) et le fructose (25 °C) [117]. Cependant, sa sensibilité varie selon la nature des sucres et l'expression des résultats en équivalents glucose (*i.e.* par comparaison à une gamme glucose) s'avère imparfaite [118]. Plus précise que la méthode à l'anthrone, la méthode à l'orcinol sulfurique [52] affiche néanmoins une faible spécificité à 420 nm qui nécessite l'élimination préalable des protéides [41]. La réaction colorée des aldo-hexoses avec l'o-toluidine en milieu acide [72] peut être employée pour mesurer le glucose après hydrolyse de l'amidon [99].

La mesure des sucres réducteurs repose sur leur capacité à s'oxyder au niveau de leur fonction aldéhyde (aldose comme le glucose) ou cétonique (cétose comme le fructose) : ils peuvent réduire des formes cationiques (Cu^{++} , bleu de tétrazolium, etc.) et les rendre absorbantes dans le visible, ou réactionnelles avec un composé devenant lui-même coloré (absorbance proportionnelle à la quantité de sucres réducteurs en solution).

La réduction de l'acide dinitrosalicylique (DNSA) et celle de l'hydrazide de l'acide parahydroxybenzoïque (PABA) en milieu alcalin [56, 99, 119] sont moins utilisées chez les ligneux que la réduction d'un ion métallique [3, 5, 58, 120]. En l'occurrence, les auteurs préfèrent la réduction du ferricyanure en ferrocyanure (méthode FCN), à celle de l'ion métallique Cu^{++} (sel cuivrique) en 2Cu^+ , plutôt utilisée pour l'analyse des fourrages et des céréales [41]. La spécificité de la méthode FCN est affectée par la présence de substances colorées comme les pigments. Leur élimination (*cf. supra*, le paragraphe *Purification*) ou la prise en compte de l'absorbance qui leur est imputable, comme le suggère Hoogenboom [34], est nécessaire.

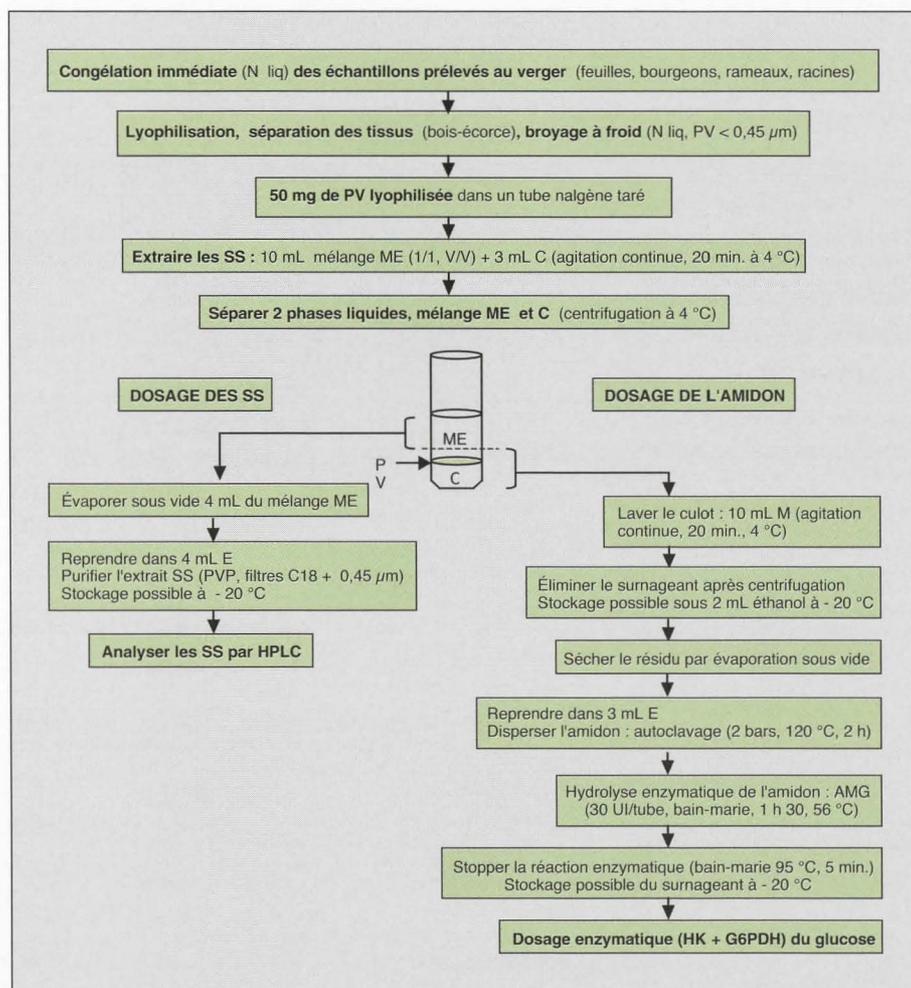


Figure 6. Proposition d'une procédure d'extraction, de purification et de dosage des glucides non structuraux chez les ligneux, d'après les travaux sur pêcher de Gomez, *et al.* [53, 90].

N liq : azote liquide ; PV : poudre végétale ; M : méthanol ; C : chloroforme ; E : eau ; SS : sucres solubles ; PVP : polyvinylpyrrolidone ; AMG : amyloglucosidase ; HK : hexokinase ; G6PDH : glucose 6 phosphate déshydrogénase.

Figure 6. Procedure designed by Gomez, *et al.* [53, 80] for extracting, purifying and measuring non-structural carbohydrates in ligneous plants.

Le dosage des sucres réducteurs ne concerne pas les polyalcools comme le sorbitol ou l'inositol, ni les diholosides non-réducteurs comme le saccharose. Le dosage de ce dernier nécessite au préalable une hydrolyse enzymatique (invertase) ou chimique (acide chlorhydrique) [34, 62] alors que celui des polyalcools implique l'oxydation d'une fonction alcool.

La présence importante d'alditols chez les ligneux fruitiers comme le pêcher, justifie leur analyse par voie enzymatique [28] ou éventuellement chromatographique.

Conclusion et perspectives

Objectifs scientifiques et contraintes expérimentales doivent justifier le choix d'une procédure parmi les options offertes aux expérimentateurs pour l'analyse des GNS chez les ligneux (figure 5). Il apparaît nettement que l'objectif analytique conditionne l'obtention et la conservation d'une PV tandis que le niveau de purification des extraits dépend de la technique de dosage retenue. *A priori*, le choix des solvants d'extraction des SS comme le moyen de dispersion et d'hydrolyse de l'amidon ne conditionne pas la réalisation d'une analyse qualitative des GNS. Néanmoins, au terme de cette étude bibliographique, les cellules sur fond vert traduisent nos préférences pour l'obtention d'un bilan détaillé des GNS. En accord avec cette sélection, nos travaux méthodologiques [53, 90] ont permis d'établir, étape par étape, la fiabilité d'une procédure utilisant les options analytiques les plus performantes pour réaliser ce type de bilan (figure 6). Originale par son étape d'extraction des SS à partir d'une PV lyophilisée, elle associe les performances de l'analyse chromatographique pour le dosage des SS (analyse exhaustive d'un mélange glucidique) à celles du dosage enzymatique du glucose libéré après dispersion par autoclavage et hydrolyse enzymatique de l'amidon (sensibilité et spécificité). La validation en cours d'une méthode de dosage des GNS par voie enzymatique sur « microplaque » devrait prochainement nous permettre non seulement de proposer une étape de purification simplifiée (moins exigeante que pour un dosage chromatographique) mais également de valider une méthode miniaturisée (PE de quelques mg d'échan-

tilon), mieux adaptée à des expérimentations générant de nombreux échantillons de petites tailles.

Dans les années à venir, le développement méthodologique des techniques SPIR pourrait nous permettre d'établir la composition en sucres des différentes parties ligneuses de l'arbre par l'analyse de mesures spectrales effectuées au verger (travaux en cours). Un tel progrès aurait des conséquences évidentes sur l'analyse biochimique, mais également sur la conduite expérimentale du fait de l'aspect non destructif des mesures ■

Remerciements

Les auteurs remercient Gilles Vercambre pour son assistance scientifique, Doriane Bancel, Josiane Hostalery, Safia Médiène et Emilie Rubio pour leur assistance technique

Références

1. Kajji A. *Gestion du carbone chez le jeune noyer*. Thèse d'université, université Blaise Pascal-Clermont Fd (France), 1992, 77 p.
2. Priestley CA. *Carbohydrates resources within the perennial plant*. Technical Communication N° 27. East Malling; Maidstone (Great Britain): Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops, 1962; 116 p.
3. Stassen PJC, Strydom DK, Stindt HW. Seasonal changes in carbohydrate fractions of young Kakamas peach trees. *Agroplanta* 1981 ; 13 : 47-53.
4. Palonen P. Relationship of seasonal changes in carbohydrates and cold hardness in canes and buds of three red raspberry cultivars. *J Am Soc Hort Sci* 1999 ; 124 : 507-13.
5. Siminovitch D, Wilson CM, Briggs DR. Studies of the chemistry of the living black locust in relation of its frost hardness. V. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates: Starch-glucose interconversions. *Plant Physiol* 1953 ; 28 : 383-400.
6. Sauter JJ, Kloth S. Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of populus in response to chilling. *Protoplasma* 1987 ; 137 : 45-55.
7. Hansen P. ¹⁴C-Studies on apple trees. I. The effect of the fruit on the translocation and distribution of photosynthates. *Physiol Plant* 1967 ; 20 : 720-5.
8. Wallart RAM. Distribution of sorbitol in rosaceae. *Phytochemistry* 1980 ; 19 : 2603-10.
9. Anderson JD, Andrews P, Hough L. The biosynthesis and metabolism of polyols. *Biochem J* 1961 ; 81 : 149-54.
10. Moing A, Gaudillère JP. Carbon and nitrogen partitioning in peach/plum grafts. *Tree Physiology* 1992 ; 10 : 81-92.
11. Ishida M, Inaba A, Sobajima Y. Seasonal changes in the concentration of sugars and organic acids in peach fruits. *Scientific Reports Kyoto University of Agric* 1971 ; 23 : 18-23.

12. Bielecki RL, Redgwell RJ. Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation product in developing apricot leaves. *Aust J Plant Physiol* 1985 ; 12 : 657-68.

13. Yoshida S, Sakai A. Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem. *Plant Cell Physiol* 1972 ; 14 : 353-9.

14. Liverani A, Cangini A. Ethylene evolution and changes in carbohydrates and organic acids during maturation of two white and two yellow fleshed peach cultivars. *Adv Hort Sci* 1991 ; 5 : 59-63.

15. Bailey RW, Barker SA, Bourne EJ, Stacey M, Theander O. Significance of oligosaccharide intermediates in dextran synthesis. *Nature* 1957 ; 179 : 179-310.

16. Weil JH. *Biochimie générale*. Paris : Masson, 1990 ; 546 p.

17. Sauter JJ. Temperature-induced changes in starch and sugars in the stem of populus x canadensis "robusta". *J Plant Physiol* 1988 ; 132 : 608-12.

18. Smith D. Influence of drying and storage conditions on nonstructural carbohydrate analysis of herbage tissue – A review. *J Br Grassl Soc* 1973 ; 28 : 129-34.

19. Hendrix DL, Peelen KK. Artifacts in the analysis of plant tissues for soluble carbohydrates. *Crop Sci* 1987 ; 27 : 710-5.

20. Roper TR, Keller JD, Loescher WH, Rom CR. Photosynthesis and carbohydrate partitioning in sweet cherry: fruiting effects. *Physiol Plant* 1988 ; 72 : 42-7.

21. Wullschlegler SD, Norby RJ, Hendrix DL. Carbon exchange rates, chlorophyll content, and carbohydrate status of two forest tree species exposed to carbon dioxide enrichment. *Tree Physiol* 1992 ; 10 : 21-31.

22. Holligan PM, Drew EA. Routine analysis by gas-liquid chromatography of soluble carbohydrates in extracts of plant tissues. *New Phytol* 1971 ; 70 : 271-97.

23. Gaudillère JP, Moing A, Carbonne F. Vigour and non-structural carbohydrates in young prune trees. *Scientia Hort* 1992 ; 51 : 197-211.

24. Jordan MO. *Cahier des charges pour la conception d'un logiciel de supervision pour la chambre climatique de l'UR-ECHO*. Avignon : Inra UR-ECHO, 1996 ; 27 p.

25. Yoshioka H, Nagai K, Aoba K, Fukumoto M. Seasonal changes of carbohydrates metabolism in apple trees. *Scient Hort* 1988 ; 36 : 219-27.

26. Breen PJ. Effect of peach/plum graft incompatibility on seasonal carbohydrate changes. *J Am Soc Hort Sci* 1975 ; 100 : 253-9.

27. Blunden C, Wilson MF. A specific method for the determination of soluble sugars in plant extracts using enzymatic analysis and its application to the sugar content of developing pear fruit buds. *Anal Biochem* 1985 ; 151 : 403-8.

28. Jordan MO, Habib R. Mobilizable carbon reserves in young peach trees as evidenced by trunk girdling experiments. *J Exp Bot* 1996 ; 294 : 79-87.

29. Worley RE. Fall Defoliation date and seasonal carbohydrate concentration of pecan wood tissue. *J Am Soc Hort Sci* 1979 ; 104 : 195-9.

30. Raguse CA, Smith D. Carbohydrates content in alfalfa herbage as influenced by methods of drying. *J Agric Food Chem* 1965 ; 13 : 306-9.

31. Abusrewil GS, Larsen FE, Fritts RJ. Prestorage and poststorage starch levels in chemically and hand-defoliated "delicious" apple nursery stock. *J Am Soc Hort Sci* 1983 ; 108 : 20-3.
32. Gurakan T, Marison IW, von Stockar U, Gustaffson L, Gnaiger E. Proposals for a standardized sample handling procedure for the determination of elemental composition and enthalpy of biological material. *Thermochem Acta* 1990 ; 172 : 251-66.
33. Yamada H, Ohmura H, Arai C, Terui M. Effect of preharvest fruit temperature on ripening, sugars, and wathercore occurrence in apples. *J Am Soc Hort Sci* 1994 ; 119 : 1208-14.
34. Hoogenboom G. Automated microanalysis for reducing sugars, sucrose, and starch in single soybean leaflets. *Plants* 1988 ; 71 : 844-8.
35. Hendrix DL. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci* 1993 ; 33 : 1306-11.
36. Génard M, Souty M, Reich M, Laurent R. Modelling the carbon use for sugar accumulation and synthesis in peach fruit. *Acta Horti* 1996 ; 416 : 121-8.
37. Kurssanov ALv. Enquiry into enzymatic processes in the living plant. *Adv Enzymology* 1941 ; 1 : 363.
38. Brown AC, Jr., Summers WL. Change in carbohydrate concentration during watermelon (*Citrullus lanatus*) juice storage. *Hort Sci* 1985 ; 20 : 896-7.
39. Mercier C. Conservation des céréales : aspects biochimiques. In : 4^e Journée du « Grenier de Theix ». *L'utilisation des céréales (grains) dans l'alimentation des ruminants*. Theix-St Genes Champanelle : Inra, 1974 : 33-44.
40. Quemener B, Mercier C. Rapid determination of ethanol-soluble carbohydrates in leguminous seeds by high pressure liquid chromatography. *Lebensmittel-Wissenschaft Technol* 1980 ; 13 : 7-12.
41. Mercier C, Tollier MT. Séparation et dosage des glucides et amylases. In : *Agro-alimentaires Set, éd. Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales*. Paris : Lavoisier, 1984 : 273-327.
42. Cerning-Beroard J. The use of invertase for determination of sucrose. Application to cereals, cereal products, and other plant materials. *Cereal Chem* 1975 ; 52 : 431-8.
43. Cerning-Beroard J, Filiatre A. Characterization and distribution of soluble and insoluble carbohydrates in legume seeds: horse beans, peas, lupines. In: CEE, éd. *Protein quality from leguminous crops*. Luxembourg : OOPEC, 1977 : 65-79.
44. Kandiah S. Turnover of carbohydrates in relation to growth in apple trees. I. Seasonal variation of growth and carbohydrate reserves. *Ann Bot* 1979 ; 44 : 175-83.
45. Kozina. Outflow and storage of assimilates in plants of *Picea jezoensis* and *Pinus koraiensis*. *Plant Physiol* 1986 ; 33 : 42-9.
46. Conrad EC, Palmer JK. Rapid analysis of carbohydrates by high-pressure liquid chromatography. *Food Technology* 1976 ; 30 : 84-92.
47. Hansen P, Grauslund J. ¹⁴C-studies on apple trees. VIII. The seasonal variation and nature of reserves. *Physiol Plant* 1973 ; 28 : 24-32.
48. Muller B, Stosser M, Tardieu F. Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant Cell Environment* 1998 ; 21 : 149-58.
49. Sharp RE, Hsiao TC, Silk WK. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiol* 1990 ; 93 : 1337-46.
50. Triboulot MB. *Effets du stress osmotique et de la carence en potassium sur la croissance racinaire du pin maritime. Etude biomécanique du grandissement cellulaire*. Thèse d'université, université Henry Poincaré-Nancy I, 1996, 87 p.
51. MacRae JC. Quantitative measurement of starch in very small amount of leaf tissues. *Planta* 1971 ; 96 : 101-8.
52. Lasheen AM, Chaplin CE. Seasonal sugar concentration in two peach cultivars differing in cold hardiness. *J Am Soc Hort Sci* 1977 ; 102 : 171-4.
53. Gomez L, Rubio E, Augé M. A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *J Sci Food Agric* 2002 ; 82 : 360-9.
54. Guehl JM, Clément A, Kaushal P, Aussenac G. Planting stress, water status and non-structural carbohydrate concentrations in corsican pine seedlings. *Tree Physiol* 1993 ; 12 : 173-83.
55. Kahaleeluddin K, Bradford L. Dual enzyme method for determination of total nonstructural carbohydrates. *J Assoc Off Anal Chem* 1986 ; 69 : 162-6.
56. Ward E, Deans JD. A simple method for the routine extraction and quantification of non-structural sugars in tree tissues. *Forestry* 1993 ; 66 : 171-9.
57. Lerman JC, Deleens E, Nato A, Moyse A. Variation in the carbon isotopes composition of a plant with crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* 1974 ; 53 : 581-4.
58. Rom CR, Ferree DC. Time and severity of summer pruning influences on young peach tree net photosynthesis, transpiration, and dry weight distribution. *J Am Soc Hort Sci* 1985 ; 110 : 455-61.
59. McKee JMT. A simple method for the extraction of reducing and non-reducing sugars from carrot and other storage root vegetables. *J Sci Food Agric* 1985 ; 36 : 55-8.
60. Claire A, Verrier E, Ntonga Mimbe J. Analyse par chromatographie HPLC des principaux glucides solubles répartis dans le flagelle des tiges volubiles d'*Ipomoea purpurea*. Détermination des teneurs en glucose, fructose, saccharose et amidon. *CR Acad Sci Ser 3, Sciences de la Vie* 1988 ; 307 : 735-40.
61. Gerhardt R, Heldt HW. Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in non-aqueous media. *Plant Physiol* 1984 ; 75 : 542-7.
62. Hosfield GL, Sieppel SA, Curtin DD. A direct and analytical method for determining waters-soluble sugars from a single extract of carrot root tissue. *J Am Soc Hort Sci* 1982 ; 107 : 101-6.
63. Dickson RE. Analytical procedures for the sequential extraction of ¹⁴C labelled constituents from leaves, bark and wood of cotton plants. *Physiol Plant* 1979 ; 5 : 480-8.
64. Merlo L, Passera C. Changes in carbohydrate and enzyme levels during development of leaves of *Prunus persica*, a sorbitol synthesizing species. *Physiol Plant* 1991 ; 83 : 621-6.
65. Lapointe L. Fruit Development in Trillium. Dependence on stem carbohydrate reserves. *Plant Physiol* 1998 ; 117 : 183-8.
66. Breen PJ, Muraoka T. Effect of indolebutyric acid on distribution of ¹⁴C-photosynthate in softwood cuttings of "Marianna 2624" plum. *J Am Soc Hort Sc* 1973 ; 98 : 436-9.
67. Anderson JW. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry* 1968 ; 7 : 1973-88.
68. Bevenue A. Determination of sugars in plant material, use of decolorizing carbon in the ferricyanide method. *Anal Chem* 1949 ; 21 : 586-7.
69. Boersig MR, Negm FB. Prevention of sucrose inversion during preparation of HPLC samples. *Hort Sci* 1985 ; 20 : 1054-6.
70. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt Chem* 1956 ; 3 : 350-60.
71. Peng. S, Jay-Allemand C. Use of antioxidants in extraction of tannins from walnut plants. *J Chem Ecol* 1991 ; 17 : 887-96.
72. Cooper GR, McDaniel V. The determination of glucose by ortho-toluidine method. *Standard Methods of Clin Chem* 1970 ; 6 : 159-70.
73. Mitchell GA. Methods of starch analysis. *Starch* 1990 ; 42 : 131-4.
74. Somogyi M. Determination of blood sugar. *J Biol Chem* 1945 ; 160 : 69-73.
75. Lewis DH, Harley JL. Carbohydrates physiology of mycorrhizal roots of beech. 1. Identity of endogeneous sugars and utilization of exogeneous sugars. *New Phytol* 1964 ; 64 : 224-37.
76. Redgwell RJ. Fractionation of plants extracts using ion-exchange Sephadex. *Anal Biochem* 1980 ; 107 : 44-50.
77. Brugnoli E, Hubick KT, Caemmerer Sv, Chin Wong S, Farquhar GD. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiol* 1988 ; 88 : 1418-24.
78. Deleens E, Garnier-Dardart J. Carbon isotope composition of biochemical fractions isolated from leaves of Bryophyllum daigremontianum Berger, a plant with grassulacean acid metabolism: some physiological aspects related to CO2 dark fixation. *Planta* 1977 ; 134 : 241-8.
79. Sullivan JT. The estimation of starch. *Ind Eng Chem Anal Ed* 1935 ; 7 : 311-4.
80. Fan X, Mattheis JP, Patterson ME, Fellman JK. Changes in amylose and total starch content in "Fuji" apples during maturation. *Hort Sci* 1995 ; 30 : 104-5.
81. Nii N. Fruiting effects on leaf characteristics, photosynthesis, and root growth in peach trees. *J Japan Soc Hort Sci* 1993 ; 62 : 519-26.
82. Meuser F, Wittig J, Huster H, Holley W. Recent developments in extraction of starch from various raw materials. In: Morton ID. *Cereals in a european context*. Chichester (Great Britain); Weinheim (Germany) : Ellis Horwood Ltd; VCH, 1987 : 285-99.
83. Manners D. Starch. In: Dey P and Dixon R, eds. *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. London: Academic Press, 1985 : 149-203.

84. Rose R, Rose CL, Omi SK, Forry KR, Durall DM, Bigg WL. Starch determination by perchloric acid vs enzymes: Evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J Agric Food Chem* 1991 ; 39 : 2-11.
85. Ewers E. Über die bestimmung des stärkegehaltes auf polarimetrischem wege. *Z. Öfent Chem* 1908 ; 14 : 150-7.
86. Marshall RB. *Physiological control of fine root turnover in Douglas fir*. Ph. D., Oregon State University, 1985, 98 p.
87. Gur A, A. C, Bravdo BA. Colorimetric method for starch determination. *J Agric Food Chem* 1969 ; 17 : 347-51.
88. Kozłowski F. L'amidon, quel dosage pour quel échantillon ? *Cah Techn Inra* 1994 ; 35 : 5-22.
89. Thivend P, Mercier C, Guilbot A. Dosage de l'amidon dans les milieux complexes. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1965 ; 5 : 513-26.
90. Gomez L, Rubio E, Lescouret F. Critical study of a procedure for the assay of starch in ligneous plants. *J Sci Food Agric* 2003 ; 83 : 1114-23.
91. Dekker RFH, Richards GN. Determination of starch in plant materiel. *J Sci Food Agric* 1971 ; 22 : 441-4.
92. Mercier C, Colonna P. Starch and enzymes: Innovations in the products, process and uses. *Biofutur* 1988 ; 73 : 55-60.
93. Smith D. Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue. Madison: University of Wisconsin (États-Unis), 1969 ; 11 p.
94. Huber SC, Nevins DJ. Preparation and properties of a beta-D-glucanase for the specific hydrolysis of beta-D-glucans. *Plant Physiol* 1977 ; 60 : 300-4.
95. Jones MGK, Outlaw WH, Lowry OH. Enzymatic assay of 10^{-7} to 10^{-14} moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol* 1977 ; 60 : 379-83.
96. Denison RF, Fedders JM, Tong CBS. Amyloglucosidase hydrolysis can overestimate starch concentration of plants. *Agronomy Journal* 1990 ; 82 : 361-4.
97. Kerr PS, Huber SC, Israel DW. Effect of N-source on soybean leaf sucrose phosphate synthase, starch formation, and whole plant growth. *Plant Physiol* 1984 ; 75 : 483-8.
98. Ryugo K, Davis LD. The effect of time ripening on the starch content of bearing peach branches. *Proc Am Soc Hort Sci* 1959 ; 74 : 130-3.
99. Nelson EA, Dickson RE. Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. *Can J For Res* 1981 ; 11 : 145-54.
100. Haissig BE, Dickson RE. Glucose measurement errors in enzymatic starch hydrolysates at high enzyme-glucose weight ratios. *Physiol Plant* 1982 ; 54 : 244-8.
101. Smith D. Classification of several native North American grasses as starch or fructosan accumulators in relation to taxonomy. *J Br Grass Soc* 1968 ; 23 : 306-9.
102. Volonec JJ, Nelson CJ. Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. II. Relationship to leaf elongation rates modified by nitrogen fertilization. *Plant Physiol* 1984 ; 74 : 595-600.
103. Karkalas J. An improved enzymatic method for the determination of native and modified starch. *J Sci Food Agric* 1985 ; 36 : 1019-27.
104. Scholefield PB, Sedgley M, Alexander DM. Carbohydrate cycling in relation to shoot growth, floral initiation and development and yield in the avocado. *Scient Hort* 1985 ; 25 : 99-110.
105. Baur MC, Alexander RI. Enzymatic procedure for determination of starch in cereal products. *Cereal Chem* 1979 ; 56 : 364-6.
106. Loescher WH, McCamant T, Keller JD. Carbohydrate reserves, translocation and storage in woody plant roots. *Hort Sci* 1990 ; 25 : 274-81.
107. Peiris KHS, Dull GG, Leffler RG, Kays SJ. Spatial variability of soluble solids or dry-matter content within individual fruits, bulbs, or tubers: Implications for the development and use of NIR spectrometric techniques. *Hort Sci* 1999 ; 34 : 114-8.
108. Meuret M, Dardenne P, Biston R, Poty O. The use of NIR in the predicting nutritive value of Mediterranean and shrub foliage. *J Near Infrared Spectrosc* 1993 ; 1 : 45-54.
109. Rodriguez-Otero JL, Hermida M, Centeno J. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: a review. *J Agric Food Chem* 1997 ; 45 : 2815-9.
110. Slaughter DC. Nondestructive determination of internal quality in peaches and nectarines. *Trans Amer Soc Agr Eng* 1995 ; 38 : 617-23.
111. Linden G. *Techniques d'analyses et de contrôles dans les IAA. Tome 2 : Principes des techniques d'analyses*. Paris : Tec & Doc, 1991 ; 548 p.
112. Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis. Tome 2: Samples, reagents, assessment of result*. Weinheim (Germ): Verlag Chemie, 1983 ; 539 p.
113. Colonna P, Buelon A, Mercier C. Pisum sativum and Vicia faba carbohydrates: structural studies of starches. *J Food Sci* 1981 ; 46 : 88-93.
114. Harrison J, Gallagher JA, Pollock CJ. A simple method for the analysis of water-soluble carbohydrate from small segments of cereal leaf tissue. *J Plant Nutr* 1997 ; 151 : 654-9.
115. Rohrbach KG, Luepschen NS. Seasonal changes in sugar alcohols and sugars in peach bark: a possible relationship to Cytospora canker susceptibility. *J Am Soc Hort Sci* 1968 ; 93 : 135-40.
116. Goldschmidt EE, Golomb A. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J Am Soc Hort Sci* 1982 ; 107 : 206-8.
117. Haloul MN, Kleinberg I. Differential determination of glucose and fructose, and glucose- and fructose-yielding substances with anthrone. *Anal Biochem* 1972 ; 50 : 337-43.
118. Cerning-Beroard J. A note on sugar determination by the anthrone method. *Cereal Chem* 1975 ; 52 : 857-60.
119. Bellert C. *Gestion du carbone et de l'azote par le rosier miniplant (Rosa hybrida cv. Sonia). Effets d'une privation en azote à la préfloraison*. Thèse d'université, université de Montpellier II, 1995, 115 p.
120. Lasheen AM, Chaplin CE, Harmon RN. Biochemical comparison of fruit buds in five peach cultivars of varying degrees of cold hardiness. *J Am Soc Hort Sci* 1970 ; 95 : 177-81.
121. Von Fircks Y, Sennerby-Forsse L. Seasonal fluctuations of starch in root and stem tissues of coppiced Salix viminalis plants grown under two nitrogen regimes. *Tree Physiol* 1998 ; 18 : 243-9.
122. Brown CS, Young E, Pharr DM. Rootstock and scion effects on the seasonal distribution of dry weight and carbohydrates in young apple trees. *J Amer Soc Hort Sci* 1985 ; 110 : 696-701.
123. Moing A, Salesses G, Saglio PH. Growth and the composition of carbohydrate in compatible and incompatible peach/plum grafts. *Tree Physiol* 1987 ; 3 : 345-54.
124. Lo Bianco R, Rieger M, Sung SS. Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach "Encore". *Tree Physiol* 1999 ; 19 : 103-9.
125. Villanueva VR, Le Goff MT, Moncelon F. High-performance liquid chromatographic method for sugar analysis of crude deproteinized extracts of needles of air-polluted healthy and damaged picea trees. *J Chromatography* 1987 ; 393 : 115-21.
126. Tamassy I, Zayan M. Seasonal changes in total sugars, reducing and non-reducing sugars and starch contents in relation to cold hardiness of some apricot varieties from different groups. *Acta Hort* 1982 ; 121 : 125-39.
127. Bory G, Clair-Macczulajts D. Aptitude au débournement des bourgeons et répartition des glucides dans la pousse d'un an de l'Ailanthus glandulosa Desf. (Simarubacées). *Bull Soc Bot Fr* 1988 ; 135 : 81-90.
128. Nii N, Yamaguchi K, Nishimura M. Changes in carbohydrate and ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase contents in peach leaves after applications of different amounts of nitrogen fertilizer. *J Japan Soc Hort Sci* 1997 ; 66 : 505-11.
129. Evert DR, Smittle DA. Limb girdling influences rooting, survival, total sugar, and starch of dormant hardwood peach cuttings. *Hort Sci* 1990 ; 25 : 1224-6.
130. Sauter JJ, Wellenkamp S. Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the twig wood of salix caprea L. *Holzforchung* 1998 ; 52 : 255-68.
131. Rowe DB, Blazich FR. Mineral nutrient and carbohydrate status of loblolly pine during mist propagation as influenced by stock plant nitrogen fertility. *Hort Sci* 1999 ; 37 : 1279-85.
132. Rasmussen TS, Henry RJ. Starch determination in horticultural plant material by an enzymatic-colorimetric procedure. *J Sci Food Agric* 1990 ; 52 : 159-70.
133. Moing A, Carbone F, Rashad MH, Gaudillere JP. Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiol* 1992 ; 100 : 1878-84.
134. Garcia H, Nygren P, Desfontaines L. Dynamics of non structural carbohydrates and biomass yield in a fodder legume tree at different harvest intensities. *Tree Physiol* 2001 ; 21 : 523-31.
135. Dowler WM, King FD. Seasonal changes in starch and soluble sugar content of dormant peach tissues. *Proc Am Soc Hort Sci* 1966 ; 89 : 80-4.