



HAL
open science

Comportement hivernal du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : morphogénèse et rôle des composés carbonés

Marie-Pierre Guinchard

► To cite this version:

Marie-Pierre Guinchard. Comportement hivernal du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : morphogénèse et rôle des composés carbonés. Agronomie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1995. Français. NNT : 1995INPL120N . tel-01751213

HAL Id: tel-01751213

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751213>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES
ALIMENTAIRES
LABORATOIRE D'AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

[M] 1995 GUINCHARD, M.P.

Thèse
présentée en vue d'obtenir le diplôme de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

en SCIENCES AGRONOMIQUES

**COMPORTEMENT HIVERNAL DU TREFLE
BLANC (*Trifolium repens* L.) :
MORPHOGENESE ET RÔLE DES RESERVES
CARBONEES**

par **Marie-Pierre GUINCHARD**

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

Soutenue le 20 octobre 1995 devant la commission d'examen composée de :

MM	A. GUCKERT,	Président
	J. NÖSBERGER,	Rapporteur
	J.C. SIMON,	Rapporteur
	B. FRANKOW-LINDBERG,	Examineur
	G. PARENTE,	Examineur
	C. ROBIN	Examineur

AVANT PROPOS

Je remercie Monsieur Armand GUCKERT, Professeur à l'ENSAIA et Directeur du laboratoire d'Agronomie et Environnement, pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire et avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je lui suis reconnaissante de m'avoir offert l'opportunité de rencontrer de nombreux chercheurs étrangers et de travailler avec eux, grâce à notre participation à l'action COST 814.

Les précieux conseils et les critiques de Christophe ROBIN, Chargé de Recherches INRA, m'ont stimulée tout au long de cette recherche. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses qualités ainsi que pour la confiance et la disponibilité qu'il a toujours su m'accorder.

Que Messieurs Joseph NÖSBERGER, Professeur à l'ETH de Zürich et Jean-Claude SIMON, Directeur de Recherches INRA à l'Université de Caen trouvent ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Merci également aux examinateurs de ce jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à ma thèse : Madame Bodil FRANKOW-LINDBERG, Docteur es Sciences Agronomiques à l'Université d'Uppsala (Suède) et Monsieur Giuseppe PARENTE, Professeur à l'Université de Udine (Italie).

J'adresse mes remerciements aux membres de la Région Lorraine et de l'INRA qui ont financé ma thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur Marc Benoît , directeur de la station INRA-SAD de Mirecourt et Monsieur Claude Bazard, pour avoir accepté de nous mettre à disposition des parcelles expérimentales sur leur domaine et avoir suivi et conduit avec soins ces prairies.

J'associe également à ces remerciements Monsieur Patrice Vion, technicien INRA, qui m'a aidé à réaliser les expérimentations, en gardant sa bonne humeur, malgré les faibles températures que nous subissions en plein champ !!!.

Isabelle Maurice, Vinciane Heraut , Francis Bages et Christine Todorovic m'ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de certaines parties de cette étude. Je leur adresse mes plus vifs remerciements et encouragements pour la suite de leurs travaux.

Ma reconnaissance s'adresse également à Madame Susset, Madame Claude, Amina Gautier, Dominique Thierry et Michel Philbert pour leurs disponibilités, aides et conseils qu'ils m'ont apportés pendant toute la période que j'ai passée au laboratoire.

Merci aussi à Jean-Luc Dupouey chargé de recherches à l'INRA de Champenoux pour son aide dans mon apprentissage du logiciel SAS, sans lui je n'aurais jamais réalisé ces analyses statistiques ...

Enfin, je ne peux oublier la super équipe jeune et dynamique du laboratoire d'Agronomie et Environnement : Virginie, Christophe, Emile, Myriam, Fred, Dédé, Kathy, Daniel, Anne, Vinciane, Willy, Valérie, Philippe, Virginie, Christine, Sylvain, Claude, Patricia, Gwenola, Sophie et tous ceux qui passent et s'en vont. Leur bonne humeur, leurs gâteaux, leur musique, leurs discussions, leurs rires, leur entrain, leur présence, leur soutien resteront pour toujours un très bon souvenir...

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	P 6
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	P 13
<ul style="list-style-type: none"> 1. EFFETS DU FROID SUR LES PLANTES CULTIVEES 2. MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC: CYCLE ANNUEL DES DIFFERENTS ORGANES 3. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LES ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES 4. EFFETS DU FROID SUR LA GESTION DU CARBONE ET DE L'AZOTE 5. EFFETS DU FROID SUR L'ETAT HYDRIQUE DE LA PLANTE 6. ACCLIMATATION-ENDURCISSEMENT 7. LA SURVIE HIVERNALE DES PLANTES CULTIVEES 8. CONCLUSION 	
II. MATERIELS ET METHODES	P 55
<ul style="list-style-type: none"> 1. MISE EN PLACE ET SUIVI DES EXPERIMENTATIONS 2. MORPHOGENESE 3. RELEVES METEOROLOGIQUES 4. DETERMINATIONS DES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES 5. CARACTERISATION DE L'ETAT HYDRIQUE DES PLANTES 6. MESURE DES ECHANGES GAZEUX 7. ANALYSES STATISTIQUES 	
III. RELATIONS ENTRE LA MORPHOGENESE, LA DYNAMIQUE DES RESERVES CARBONEES ET LES PARAMETRES CLIMATIQUES EN PLEIN CHAMP.	P 70
<ul style="list-style-type: none"> 1. OBJECTIFS DE L'ETUDE EN PLEIN CHAMP 2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL 3. RESULTATS 4. DISCUSSION 5. CONCLUSION 	
IV. ANALYSE DE LA REPONSE AU FROID DU TREFLE BLANC	P 112

1. EFFETS D'UNE ACCLIMATATION AU FROID SUR L'ETAT
HYDRIQUE ET LES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES DU TREFLE
BLANC SOUMIS A DES FAIBLES TEMPERATURES POSITIVES OU A
DES GELS SUCCESSIFS

2. EFFET DES BASSES TEMPERATURES ET DE LA REPOUSSE SUR
L'EVOLUTION DES RESERVES CARBONEES ET SUR LA
MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC. IMPORTANCE DU CULTIVAR.

V. CONCLUSION GENERALE	P 147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	P 155
GLOSSAIRE	P 167
ABBREVIATIONS ET NOMENCLATURE	P 169
ANNEXES	P 170
SUMMARY	P 195

INTRODUCTION

De nombreux pays européens présentent un climat froid et humide. Dans ces régions, l'hiver est une période difficile pour les espèces végétales cultivées. Les basses températures sont, avec les précipitations, l'un des facteurs environnementaux qui limitent le plus la production et la répartition géographique des plantes cultivées.

En France, plus de 2 millions d'hectares sont couverts par des prairies artificielles et temporaires, soit 15% de la surface totale de terres arables (Agreste, 1994).

En Lorraine, 60% de la Surface Agricole Utile (SAU) est couverte par des prairies permanentes. En 1984, un programme agronomique est mis en place par la région Lorraine pour développer l'exploitation prairiale. L'utilisation du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) dans les prairies est ainsi relancée.

Le trèfle blanc est utilisé en association avec des graminées (ray-grass, fétuque, dactyle...). Cette espèce constitue un excellent fourrage qui présente une bonne qualité nutritive, une bonne digestibilité et appétence. En effet, sa matière sèche est constituée de 20 à 30% de composés azotés, de 11% de sucres solubles, de 4 à 7% de lipides, de 6 à 9,5% d'acides organiques (Andrieu, 1983) et de minéraux (calcium, magnésium et phosphore) (Frame et Newbould, 1986). Le trèfle blanc contribue également à la richesse du fourrage et du sol par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à la présence de nodosités en symbiose avec *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. La fixation atmosphérique d'azote en plein champ par le trèfle blanc est estimée de 56Kg.ha⁻¹.an⁻¹ en Autriche (Danso, 1991) à 200Kg.ha⁻¹.an⁻¹ en Lorraine (Guckert *et al.*, 1983), la variation est dépendante de la variété utilisée et du climat (Danso, 1991). Une association à base de ray-grass anglais et de trèfle blanc conduite sans fertilisation azotée peut produire entre 7 et 14 t.ha⁻¹.an⁻¹ de matière sèche (Besnard *et al.*, 1983).

Cependant, malgré ces avantages, le trèfle blanc est souvent considéré comme instable et peu sûr en raison des problèmes de variabilité de rendement inter et intra-

annuelle (Morton *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1991). L'intérêt sur le plan fourrager de ces associations à base de trèfle est essentiellement conditionné par l'équilibre entre les deux partenaires et notamment par le maintien d'une contribution du trèfle blanc au rendement de l'ordre de 40 à 50%, dans les prairies temporaires. La croissance du trèfle blanc est ralentie en hiver. Une chute importante de la biomasse des stolons de trèfle blanc est observée pendant l'hiver et au début du printemps (Guckert *et al.*, 1983). L'équilibre trèfle-graminée est perturbé, ainsi que le rendement printanier (Guckert *et al.*, 1983 ; Sackville Hamilton et Harper, 1989 ; Collins *et al.*, 1991).

Plusieurs causes peuvent être à l'origine de cette réduction de la part du trèfle dans la prairie au printemps. La compétition interspécifique peut devenir très importante au printemps du fait du retard de départ en végétation du trèfle blanc par rapport aux graminées (Munro et Hughes, 1966 ; Cooper et Breese, 1971 cités par Ollenrenshaw and Baker, 1981). Si l'hiver est rigoureux, les conditions hivernales sont destructrices et allongent la phase de latence précédant la croissance du trèfle (Kung Benoit, 1991). La disparition du trèfle blanc observée au printemps semble être due à l'effet des faibles températures et des faibles photopériodes hivernales qui vont limiter le développement du trèfle pendant cette période (Woledge *et al.*, 1990).

En plein champ, d'autres variables comme la composition granulométrique du sol, l'intensité, le spectre et la durée d'insolation sont certainement corrélées à la température du sol et vont affecter la vitesse de croissance du trèfle blanc (Sackville Hamilton et Harper, 1989). Les faibles températures hivernales vont également limiter la fixation symbiotique de l'azote ce qui peut en conséquence induire une diminution de la croissance du trèfle blanc (Davies et Young, 1967).

Une part non négligeable de la pérennité du trèfle blanc est attribuée au compartiment réserve constitué par les stolons. Le stolon, tige rampante du trèfle assure la multiplication végétative et la colonisation du terrain. Cet organe essentiel assure la survie de la plante pendant l'hiver et la reprise de végétation au printemps. En automne, lorsque les températures et la photopériode diminuent, le trèfle blanc accumule des

réserves carbonées et azotées dans ses stolons sous forme d'amidon et d'acides aminés (Vez, 1961). Ces réserves carbonées et azotées sont élaborées, stockées et utilisées par la plante. Ces substances servent au maintien et au développement de nouveaux bourgeons et racines pendant l'hiver (May, 1960 ; Lüscher, 1989).

Cette thèse a été co-financée par l'INRA et la Région Lorraine. En effet, la survie hivernale du trèfle blanc est un sujet important pour cette région sachant que 60% de la surface agricole utile est recouvert par des prairies permanentes. De plus, ce sujet fait partie des préoccupations agronomiques actuelles au niveau européen. Ainsi, en 1993 s'est engagée l'action COST 814 dont le but principal est de "coordonner le développement des plantes cultivées dans les régions nordiques et ouest de l'Europe qui sont fortement influencées par un climat maritime. D'autres régions présentant des problèmes liés à l'altitude sont incluses dans cette action". La seconde étape de ce projet porte sur les effets des basses températures sur les plantes cultivées, avec dans le questionnement l'acclimatation, la résistance et les mécanismes biochimiques et physiologiques sous-jacents.

Au sein de cette action COST 814, un groupe de travail a pris naissance à Zürich en 1992, incluant des équipes de Zürich (Pr Nösberger), de Weihenstephan (Pr Simon), d'Aberystwyth (Pr Wilson), et de Nancy (Pr Guckert). L'objectif de cette action COST est d'étudier la survie hivernale du trèfle blanc et sa reprise printanière dans les différents pays européens présentant un climat hivernal froid et humide. Une partie du travail de cette thèse fait l'objet de cette collaboration COST. Le principe de cette action est de réaliser des suivis expérimentaux communs en plein champ et d'aboutir à une comparaison multisite des comportements du trèfle blanc. L'étude concerne deux variétés de trèfle blanc ; cv. Huia et cv. Aberherald (selectionné au Pays de Galles pour une meilleure tolérance au froid et une reprise printanière précoce).

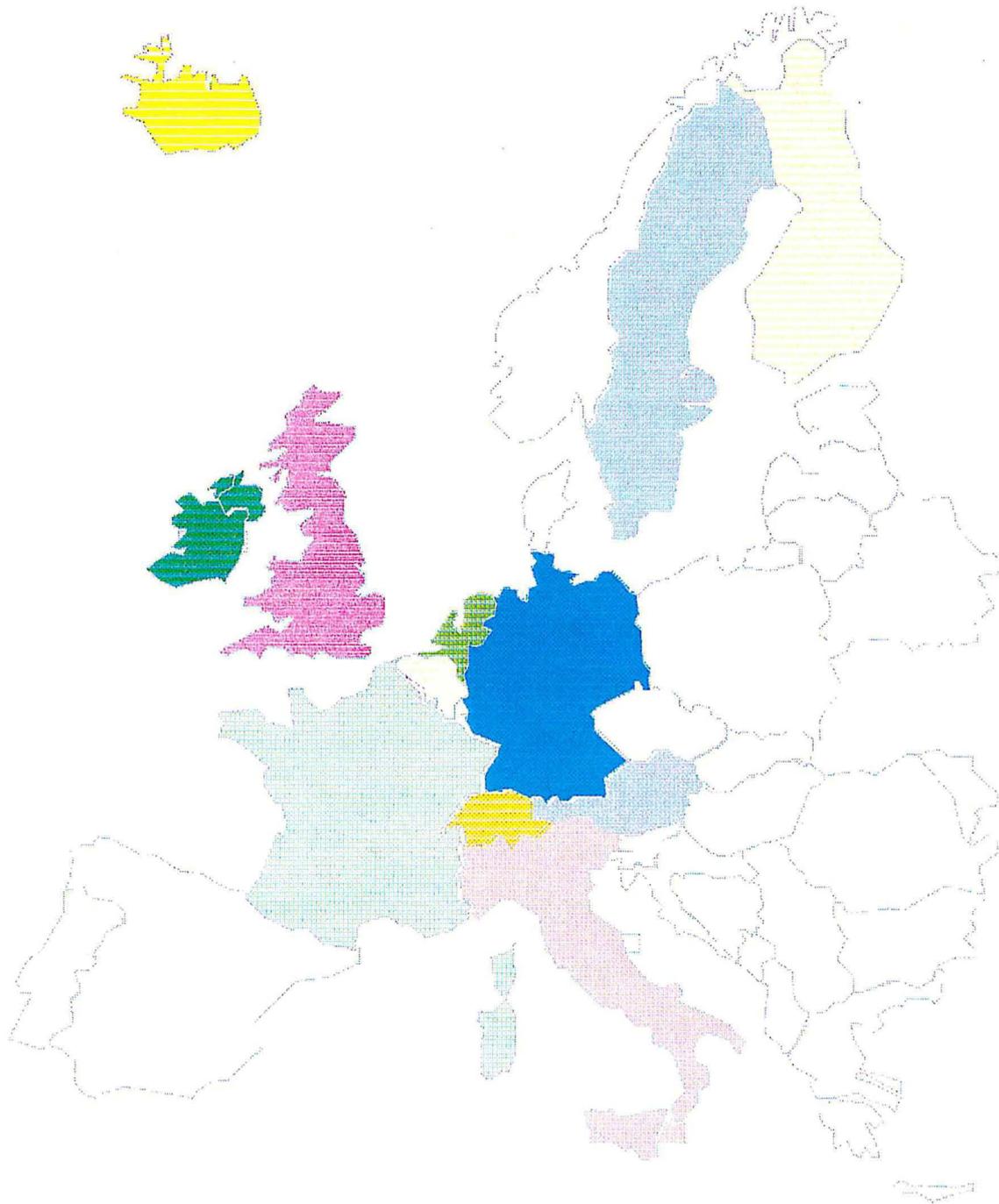


Figure 1 : Pays impliqués dans le programme COST 814 : "White clover winter survival and spring regrowth".

Actuellement, ce projet COST en est à sa 3ème année de réalisation. De nouvelles équipes d'Italie (Pr Parente), de Finlande (Dr Nykänen Kürki), de Suède (Dr Frankow-Lindberg), d'Islande (Dr Helgadóttir) se sont associées (fig 1). Des réunions de travail annuelles ont permis d'échanger les connaissances de chaque équipe et ont fortement contribué à l'élaboration de ce travail.

L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments de compréhension de la survie hivernale du trèfle blanc. Le travail présenté est une approche écophysiological de la question. Une partie des résultats ont été obtenus en plein champ sur des parcelles expérimentales mises en place à l'INRA-SAD de Mirecourt. Quatre saisons hivernales ont été étudiées à Mirecourt : 1991-1992 ; 1992-1993 ; 1993-1994 et 1994-1995.

La deuxième partie des résultats provient d'expérimentations conduites en conditions contrôlées. Ces dernières auront pour but d'approfondir les mécanismes observés en plein champ.

Le plan suivi dans la rédaction de ce document est constitué de 5 chapitres. Dans le premier, nous ferons un état des connaissances actuelles sur le comportement des plantes en saison hivernale et printanière, tant du point de vue morphologique que physiologique. Le deuxième chapitre précisera les méthodes et outils utilisés pour la réalisation de ce travail. Le troisième chapitre aura pour but de caractériser le comportement hivernal du trèfle blanc dans la région Lorraine pendant les quatre hivers considérés et de soulever les questions sur les mécanismes mis en jeu. Le quatrième chapitre concernera les expérimentations en conditions contrôlées. Son but sera d'apporter des éléments de réponse aux questions soulevées lors des expérimentations en plein champ. Le cinquième chapitre constitue une synthèse des résultats obtenus lors de ce travail et des réponses apportées pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la survie hivernale du trèfle blanc. Nous terminerons cette partie par des perspectives de recherches que cette étude peut laisser envisager.

CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

SOMMAIRE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. EFFETS DU FROID SUR LES PLANTES CULTIVEES p 13

1.1. Les effets des basses températures sur les plantes

1.1.1. Les effets des températures basses positives "chilling"

1.1.2. Les effets du gel ("freezing injury")

1.2. Notions d'adaptation et d'endurcissement

1.2.1. Adaptation

1.2.2. Acclimatation = Endurcissement :

1.3. Notions de résistance et tolérance

1.3.1. Résistance

1.3.2. Tolérance

2. MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC : CYCLE ANNUEL DES DIFFERENTS ORGANES p 17

2.1. Le trèfle blanc

2.2. Evolution du stolon

2.3. Evolution des feuilles

2.4. Evolution des racines

2.5. Evolution des inflorescences

2.6. Rythme de croissance des parties aériennes et reprise printanière

3. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LES ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES p 28

3.1. Photosynthèse Nette

3.2. Photoinhibition

4. EFFETS DU FROID SUR LA GESTION DU CARBONE ET DE L'AZOTE p 33

4.1. Les réserves carbonées

4.1.1. Principaux sucres du trèfle blanc

4.1.2. Evolution des sucres et de l'amidon pendant l'hiver

4.2 Les réserves azotées

5. EFFETS DU FROID SUR L'ETAT HYDRIQUE DE LA PLANTE	p 41
6. ACCLIMATATION-ENDURCISSEMENT	p 44
7. LA SURVIE HIVERNALE DES PLANTES CULTIVEES	p 46
8. CONCLUSION	p 51

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude des effets du froid sur les plantes fait intervenir de nombreuses notions d'écophysiologie qui nécessitent des définitions claires et précises pour une bonne compréhension de la suite de ce travail. Nous aborderons ici les notions d'adaptation, endurcissement, tolérance et évitement au froid et au gel, après avoir défini les effets de ces facteurs sur les plantes cultivées. Un glossaire situé à la fin du manuscrit rassemble les définitions des termes abordés dans ce travail.

1.EFFETS DU FROID SUR LES PLANTES CULTIVEES

1.1. Les effets des basses températures sur les plantes :

Pendant l'hiver, les plantes sont soumises à deux types de températures : des températures basses positives ("chilling") et des températures inférieures à 0°C induisant un gel ("freezing"). Dès 1894, Molish fit la distinction entre la mort résultant du gel et celle entraînée par des températures basses non gélantes qui, en les nommant respectivement *Erfrieren* et *Erkältung*, établit une distinction qui subsiste dans les termes anglo-saxons de *freezing injury* et de *chilling injury*. Il faut regretter que l'appellation française de "maladies du froid" manque de précision (Côme, 1992).

1.1.1. Les effets des températures basses positives

Les températures basses positives sont souvent nommées chilling, terminologie issue du terme anglais sans équivalent français, regroupant l'ensemble des températures proches de 0°C, ne provoquant pas de gel (Graham et Patterson, 1982).

Les effets des basses températures prennent la forme de plusieurs symptômes (fig 1.1): nécroses, décoloration, fragilité tissulaire, brunissement, réduction de la croissance ou problèmes de germination dans le cas des graines. D'autres effets peuvent être observés comme la réduction de la taille des grains, une chute du rendement, une réduction de la photosynthèse et une réduction de l'absorption d'eau. Les effets seront également importants au niveau cellulaire. Chez une tomate exposée à 5°C pendant 3 jours, les effets sont progressifs. Après 2h, les modifications sont minimales. Après 4h, on observe une perte d'organisation des thylakoides et les membranes mitochondriales montrent des discontinuités. Après 8h, les changements dans les membranes sont drastiques, et les parois cellulaires deviennent opaques avec des renflements. Après 16h, tous les symptômes deviennent plus accentués et sont accompagnés de précipitations des protéines dans les vacuoles. Ces événements ont été décrits par Ilker *et al.* (1979) et sont cités par Hale et Orcutt (1987).

1.1.2. Les effets du gel ("freezing injury") :

La limite critique de température basse qui induira un gel chez les plantes est difficile à déterminer. Selon les plantes et selon la concentration des solutés à l'intérieur de la cellule, le gel interviendra plus ou moins rapidement. Le gel peut intervenir également au moment de la reprise de l'activité végétale (gelées de printemps). En période hivernale, les effets du gel dépendent de son intensité plus que de sa durée. Ainsi, des gelées moyennes mais brutales, survenant après une période prolongée de redoux sont parfois plus dangereuses que des gelées plus intenses mais plus progressives. Les effets du gel sont dus à la formation de glace extra-cellulaire qui provoque alors une perte de turgescence de la cellule et donc la mort de la cellule. Selon l'intensité du gel, la déshydratation sera létale ou non. Si la déshydratation n'est pas létale, on observera alors une réhydratation des cellules si la plante est à nouveau placée dans des conditions favorables (fig 1.1) (Hale et Orcutt, 1987).

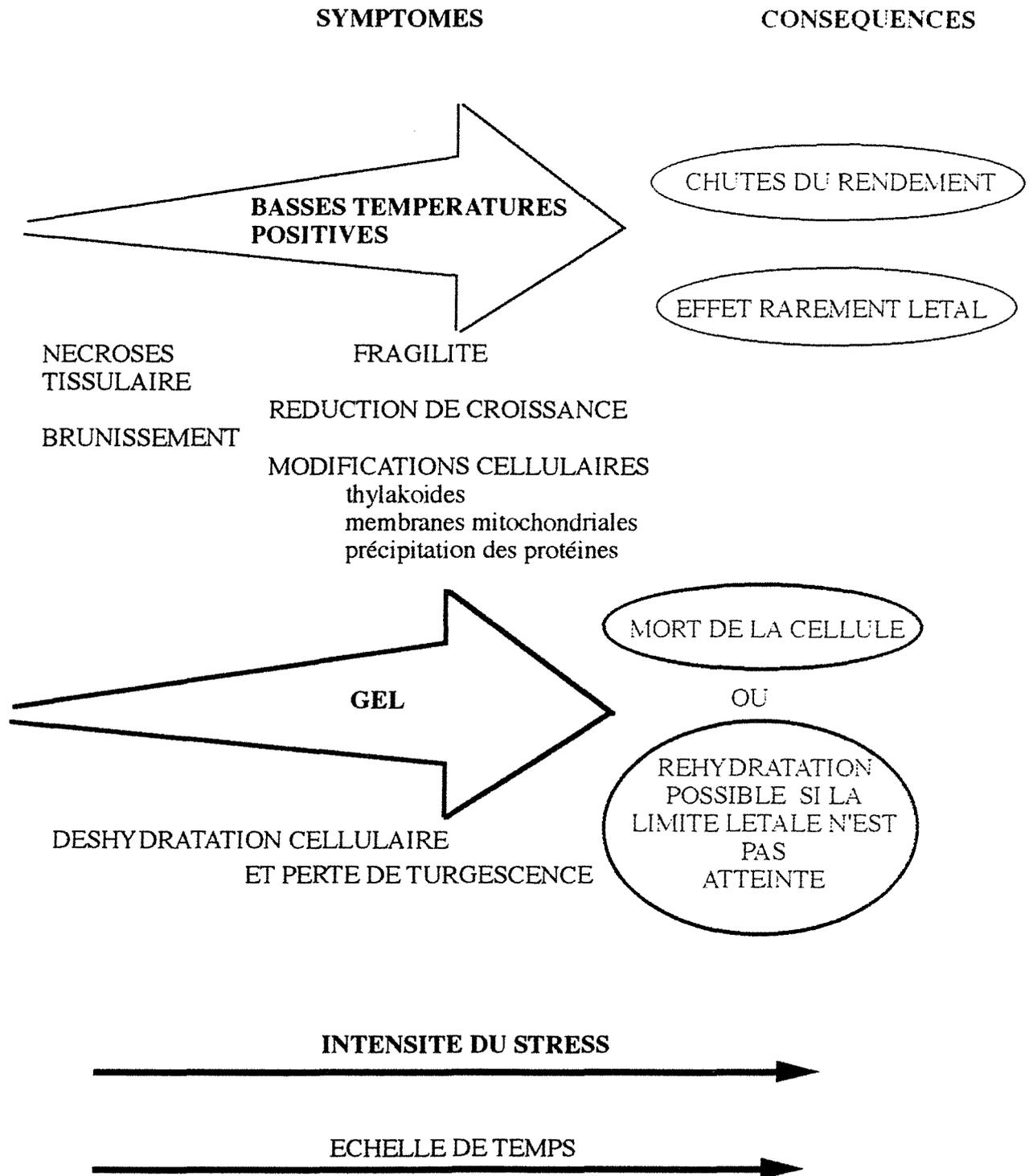


Figure 1.1 : Symptomes occasionnés par des expositions aux basses températures positives et au gel des plantes cultivées. Les flèches indiquent l'intensité du stress de température.

1.2. Notions d'adaptation et d'acclimatation

Les deux termes vont se distinguer par leur implication génétique chez la plante.

1.2.1. Adaptation :

Réponse à des changements à long terme qui résulte en des altérations génétiques héréditaires. Ces altérations sont stables et se maintiendront dans les populations pendant des générations (Huner *et al.*, 1993).

1.2.2. Acclimatation :

Réponse induite par des changements environnementaux qui produisent des modifications phénotypiques sur une seule génération sans modification du génotype (Huner *et al.*, 1993). En automne, lorsque la température, la photopériode et l'intensité lumineuse diminuent, les plantes s'acclimatent à ces nouvelles conditions (Côme, 1992 ; Larsen, 1994). Nous pouvons, dans notre cas considérer l'acclimatation au froid des plantes comme un durcissement, compte tenu de la notion de contrainte imposée par les basses températures.

1.3. Notions de résistance et tolérance

1.3.1. Résistance

La résistance d'une plante à un facteur est sa faculté à réagir de manière active contre les effets négatifs imposés par ce facteur de stress en développant des mécanismes de protection. Généralement, la résistance d'une plante à un facteur est caractérisée par la présence d'un ou plusieurs gènes dits de résistance.

1.3.2. Tolérance :

La tolérance est la capacité d'une plante à survivre à un stress avec des petites altérations ou sans altérations du tout; la capacité relative d'un organisme à croître, se développer ou survivre lorsque cet organisme est soumis à un facteur environnemental défavorable; la capacité à supporter les effets d'une maladie ou d'un stress sans mourir ou souffrir des altérations irréparables.

1.3.3. Evitement :

Une plante qui est capable de contourner les effets négatifs d'un facteur, grâce à des mécanismes physiologiques ou physiques montre une réaction d'évitement.

2. MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC: CYCLE ANNUEL DES DIFFERENTS ORGANES

2.1. Le trèfle blanc

Le trèfle blanc semble être originaire des régions méditerranéennes (Vavilov, 1951, cité par Davies et Young, 1967). C'est dans l'Herbarum Tomus de Brunfels (1532), cité par Erith (1924) qu'apparaissent les premiers essais de classification du trèfle blanc. Pendant plus de deux siècles, il sera dénommé *Trifolium pratense album*. C'est en 1753 que Linné sépare le trèfle blanc du trèfle violet et lui donne le nom de *Trifolium repens*. Le trèfle blanc est une légumineuse dicotylédone qui croît en association et en compétition avec diverses espèces d'herbes.

Il existe trois types de trèfle blanc ; le type sauvage (petites feuilles, stolons fins) ; le type hollandicum (feuilles moyennes, stolons épais) et le type giganteum ou ladino (feuilles très larges) (Erith, 1924).

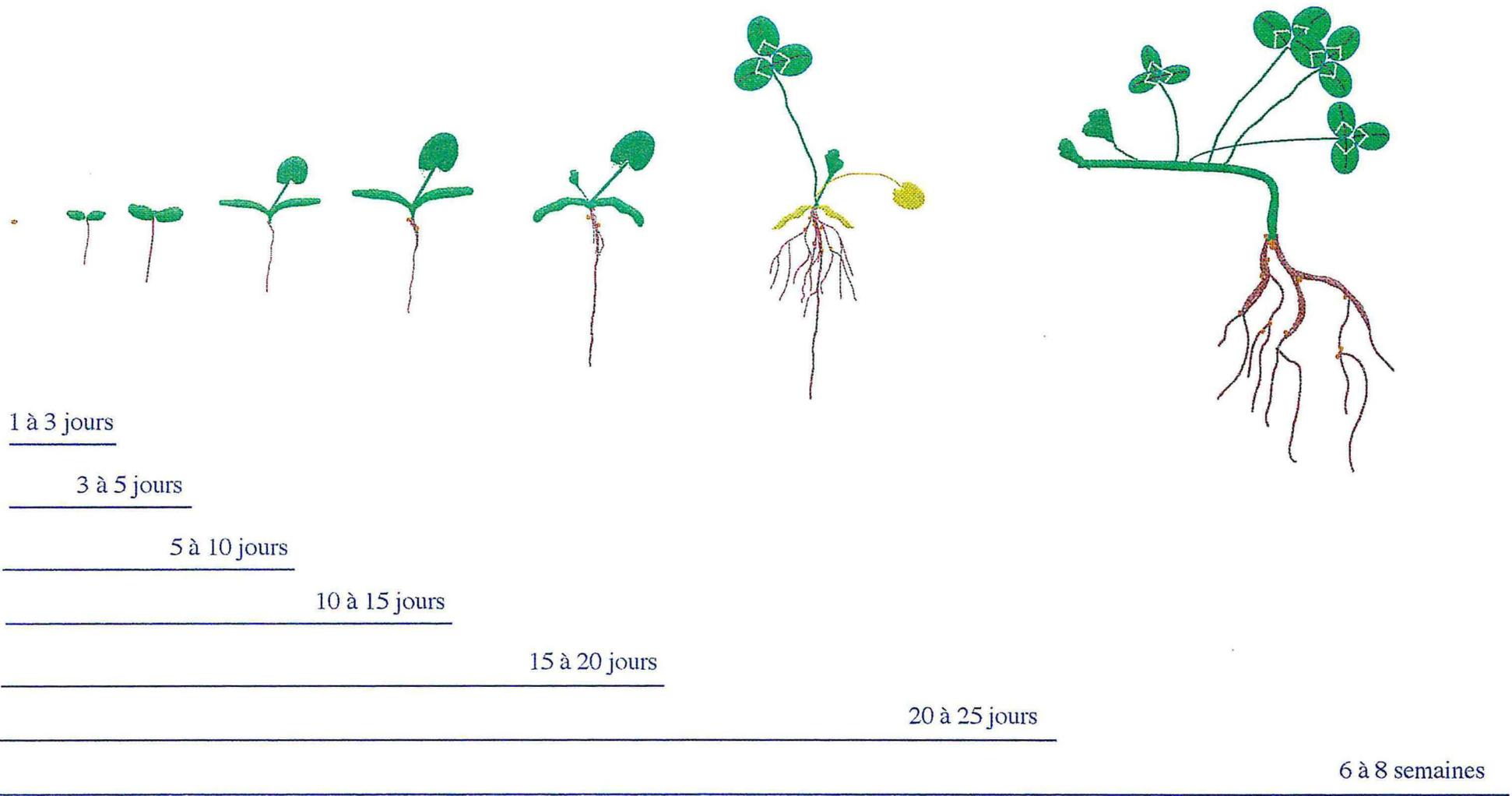


Figure 1.2. : Schéma descriptif de la morphogénèse du trèfle blanc depuis le semis jusqu'au développement de la plante adulte (d'après Laperrière, 1984).

Le type le plus cultivé est le type *hollandicum* auquel appartiennent les variétés Huia et Aber-Herald sur lesquelles nous avons travaillé. Le type *ladino* est fréquemment rencontré dans les régions méditerranéennes.

En phase d'implantation, la première feuille du trèfle blanc est unilobée; elle est déployée une dizaine de jours après la levée (fig 1.2). Les feuilles suivantes sont trilobées. Des stolons apparaissent environ 2 mois après le semis dans des conditions non limitantes. Les bourgeons axillaires des stolons donneront d'abord naissance à des stolons secondaires (ramifications) puis durant l'été à des inflorescences.

La racine principale évolue en pivot et donne ensuite naissance à des racines secondaires qui engendrent elle-mêmes des racines très fines. Des racines adventives se forment à partir des noeuds des stolons. En présence de *Rhizobium*, des nodosités de forme et de taille variables se rencontrent sur la plupart des racines, en particulier au niveau des ramifications. Les nodosités se trouvent en général dans les 10 premiers centimètres du sol. L'ensemble de ces organes de trèfle va présenter un comportement particulier, et évoluer de manière différente pendant l'automne, l'hiver et le printemps.

2.2. Evolution du stolon

Le stolon est une tige rampante (fig 1.3) qui permet au trèfle blanc de coloniser l'espace (Harris, 1987). Il se développe à partir du mois d'avril par la production de nouveaux noeuds et sa croissance se poursuit pendant tout l'été (Treillet, 1981). En été, la ramification du trèfle blanc est importante et dépend de la vitesse d'émission des feuilles qui elle-même dépend de la température. La ramification des stolons est donc liée aux fluctuations saisonnières de la température, dans le cas où l'alimentation hydrique n'est pas limitante (Simon *et al.*, 1989). Les stolons représentent une part importante de la biomasse aérienne du trèfle blanc : 40 à 50% en été (fig 1.5) (Woledge *et al.*, 1990 ; Harris *et al.*, 1983). En automne, lorsque les températures, la photopériode

et l'intensité lumineuse diminuent, la biomasse et la longueur du stolon augmentent (Vez, 1961 ; Harris *et al.*, 1983). La part des stolons dans la biomasse aérienne peut atteindre 80% en janvier (Treillet, 1981). Cette augmentation de la biomasse correspond à une accumulation de réserves carbonées et azotées (Vez, 1961 ; Cyr *et al.*, 1990). Au cours de l'hiver, la biomasse des stolons va chuter selon les auteurs de 43%, 58% ou 72% jusqu'au mois de mars selon Harris *et al.* (1983) ; Guckert *et al.* (1983) et Vez, (1961) respectivement.

La longueur des stolons et la longueur des entre-nœuds diminuent également du mois de février au printemps (Nösberger, 1983 ; Collins *et al.*, 1991). La longueur du stolon diminue moins vite que sa biomasse. On observe alors une diminution de la masse linéique du stolon (Harris *et al.*, 1983).

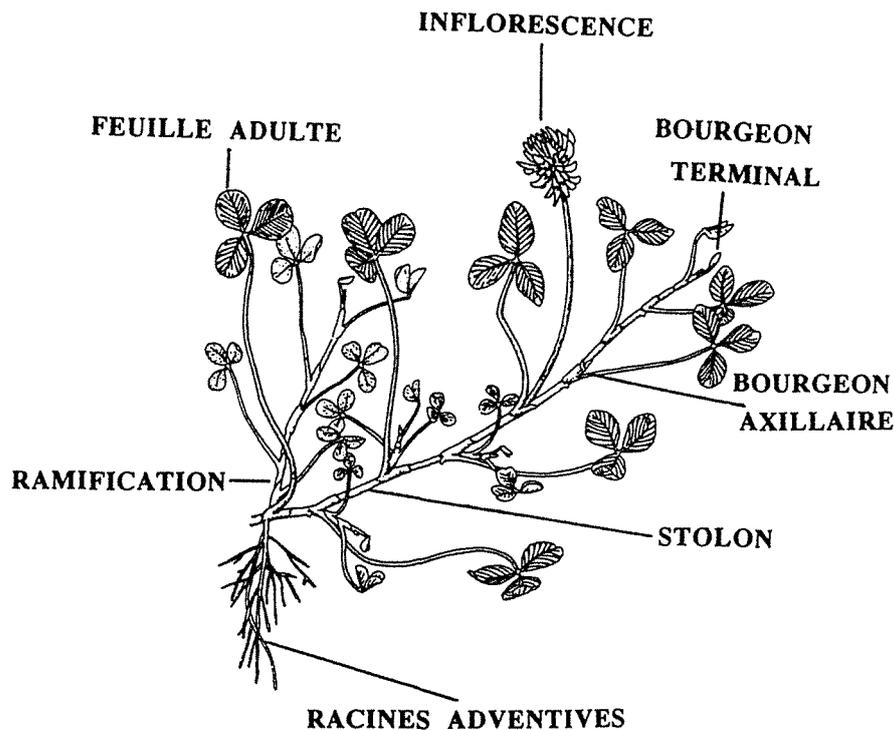


Figure 1.3. Schéma d'une plante entière de trèfle adulte (d'après Thomas, 1987).

La perte de biomasse et de longueur des stolons observée pendant l'hiver s'accompagne également d'une mortalité accrue des stolons à la sortie de l'hiver (Marriott et Smith, 1992; Collins *et al.*, 1991). Cette mortalité correspond en fait à une nécrose apicale (fig 1.4.) qui fragmentera la plante en sous parties indépendantes (Hay *et al.*, 1987). Certains auteurs ont observé des réactions de protection du stolon contre les agressions hivernales par un enfouissement de ces stolons dans les prairies pâturées (Grant *et al.*, 1986; Woledge *et al.*, 1990). Cette réaction est soit passive (action des vers de terre qui remuent la terre), soit active (attraction exercée par la racine pivotante) (Fothergill, 1995, communication personnelle).



Figure 1.4. Nécrose apicale du stolon observée en plein champ à Mirecourt (mars 1993).

2.3. Evolution des feuilles

En absence de compétition pour la lumière, Simon *et al.* (1989) indiquent que la vitesse d'apparition des feuilles dépend de la température. De manière générale, le nombre de feuilles totales par plante et leur biomasse diminuent en hiver mais également au début du printemps (fig 1.5) (Davies et Evans, 1982; Guckert *et al.*, 1983). Cependant, il existe une production continue de feuilles en hiver chez le trèfle blanc mais à une vitesse réduite, de l'ordre de 1 feuille toutes les 7 à 8 semaines en climat océanique (Davies et Evans, 1982). Les feuilles produites pendant l'hiver sont petites, basses et incomplètement développées (Guckert *et al.*, 1983 ; Woledge *et al.*, 1990). Les feuilles vont être très sensibles aux conditions hivernales et beaucoup d'entre elles vont disparaître. Le nombre moyen de feuilles par axe de stolon est d'environ 2,2 en décembre et 6,6 en août en climat océanique (Sackville Hamilton et Harper, 1989). Les données les plus massives rencontrées dans la littérature sont issues des études réalisées au Pays de Galles. Il est important de considérer la différence de climat entre cette région et la Lorraine pour ensuite interpréter nos résultats.

Les gains et pertes pendant l'hiver ont été estimés du même ordre en Angleterre : 15kg/ha/jour de février à mars (Davies et Evans, 1982). Le rythme de production des feuilles de la variété Huia à Lusignan a été estimé en pleine saison à 0,19 feuilles par jour, soit une feuille tous les 100°Jour (Simon *et al.*, 1989). En hiver, ce rythme d'émission a été estimé à 0,09 feuilles par jour pour la variété Huia à 10°C, en conditions contrôlées et à 0,156 feuilles par jour en octobre-novembre en plein champ, en Angleterre (Eagles et Othman, 1986).

La température du sol à 10 cm a un effet très important sur la vitesse d'apparition des noeuds chez le trèfle blanc. En plein champ, d'autres variables telles que la composition granulométrique du sol, ou l'insolation (intensité, spectre et durée) influent sur la

température du sol affectant ainsi la vitesse de croissance du trèfle blanc (Sackville Hamilton et Harper, 1989).

2.4. Evolution des racines

La biomasse des racines va suivre celle des stolons en automne ; elle augmente mais en plus faible proportion (Vez, 1961). Comme pour les stolons, cette augmentation correspond à une accumulation de réserves. Au cours de l'hiver, les racines peuvent perdre jusqu'à 57% de leur biomasse (Vez, 1961). Une seconde période de mortalité importante est observée au printemps, elle semble correspondre à une utilisation des réserves pour la repousse (Westbrooks et Tesar, 1955). Les racines sont le site de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique grâce à la symbiose avec une bactérie fixatrice : *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Cette fixation est sensible à la température et sera limitée si la température du sol est inférieure à 12°C et la température de l'air inférieure à 7°C (Guckert *et al.*, 1983).

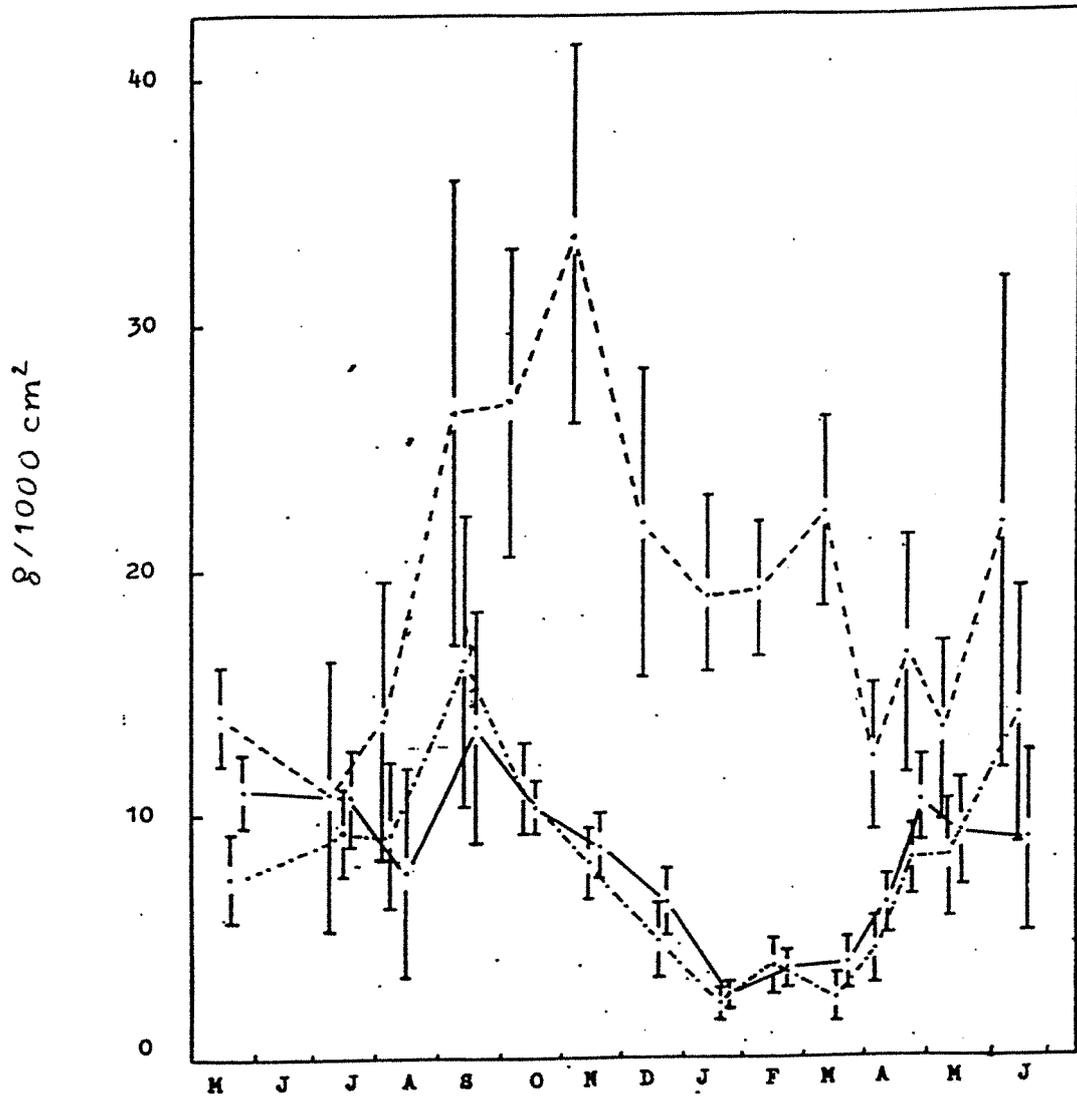


Figure 1.5. Variations saisonnières de la biomasse des organes du trèfle blanc en g/1000 cm² : stolons (----) ; folioles (-.-.-.-) et pétioles (_____). D'après Guckert *et al.*, 1983.

2.5. Evolution des inflorescences

Les inflorescences se forment de juin à août à l'aisselle des bourgeons axillaires des stolons (Marshall *et al.*, 1993). La floraison est induite par des jours longs (13,5 heures) à une température élevée (30°C) (Takeda et Agata, 1966). La fécondation est allogame, réalisée par les insectes. Un plant de trèfle produit en général 1400 à 2000 graines à l'issue de la première année de croissance mais ces graines constituent un faible potentiel de dissémination de l'espèce dans des conditions naturelles. Seulement 4,4% des graines produites pourront donner une plante adulte, les autres graines ne germeront pas ou les plantules seront sujettes à des compétitions pour la lumière et les éléments nutritifs selon la densité de végétation de la prairie (Chapman, 1987). Nous ne nous intéresserons pas aux inflorescences de trèfle blanc dans cette étude étant donné que les fleurs ne sont pas présentes en hiver ni au printemps et qu'elles représentent un potentiel très faible de multiplication et de progression du trèfle blanc dans une pâture.

2.6. Rythme de croissance des parties aériennes et reprise printanière

Les premières reprises de biomasse aérienne du trèfle blanc sont observées entre le 15 mars et le 5 avril au Pays de Galles, lorsque la température de l'air dépasse 6,8 °C et celle du sol 5,9°C (Davies et Evans, 1982). D'autres auteurs ont montré que la reprise printanière du trèfle n'est effective que si la température de l'air devient supérieure à 5°C (Menzi *et al.*, 1991; Ollenrenshaw et Baker, 1981). Dans le Massif Central, à 890m d'altitude, le seuil de température pour la croissance nette de la biomasse épigée du trèfle blanc a été déterminé entre 4 et 5°C (Arregui, 1990). La reprise de croissance des feuilles au printemps s'observe d'abord par une augmentation de la longueur des pétioles (Davies et Evans, 1982) mais elle n'est effective qu'au-delà de 8°C en montagne (Arregui, 1990). De même, en 1966, Munro et Hughes ont montré que la

température minimale de croissance du trèfle blanc était de 9°C, comparée à 5-6°C pour les graminées.

On observe un taux de mortalité des feuilles très important au printemps (Ollenrenshaw et Haycock, 1984; Arregui, 1990). Cette réduction du nombre de feuilles est compensée par un fort accroissement de la surface moyenne d'une feuille, elle peut être multipliée par 5 (Arregui, 1990). Ce même auteur a montré que la probabilité que des feuilles émises en février survivent pendant une durée équivalente à 100° jours n' est que d'environ 40-45% au mois de mars, probablement du fait de gelées tardives . De plus, durant l'hiver, la faible croissance de la biomasse foliaire, ainsi qu'une faible vitesse d'émission des feuilles, peuvent placer le trèfle en situation défavorable pour la compétition avec le ray-grass lors du démarrage de la croissance au printemps. Pendant la repousse printanière, les stolons vont assurer une fourniture d'énergie par la disponibilité de réserves et permettre la croissance du trèfle blanc. Des auteurs anglais ont montré que la quantité de stolons présente au début de l'hiver déterminait la capacité d'un cultivar à recommencer de croître au printemps. Ils ont mis en évidence une corrélation positive entre le rendement de la première coupe au printemps et le poids de stolon au début de l'hiver (Harris *et al.*, 1983).

La reprise de l'activité fixatrice des nodosités sera dépendante non seulement de la température du sol mais également de la taille de l'appareil photosynthétique et de la taille des stolons. Au printemps, les réserves carbonées sont plus utilisées pour l'élaboration de nouvelles structures foliaires que pour les nodosités. Il existe donc une période pendant laquelle la masse foliaire va limiter la fixation symbiotique (Treillet, 1981).

En résumé, trois phases d'évolution de la biomasse du trèfle blanc sont à prendre en compte pour étudier sa survie hivernale et sa reprise printanière (fig 1.6). En automne, la matière sèche des stolons et racines augmente, correspondant à une mise en réserves.

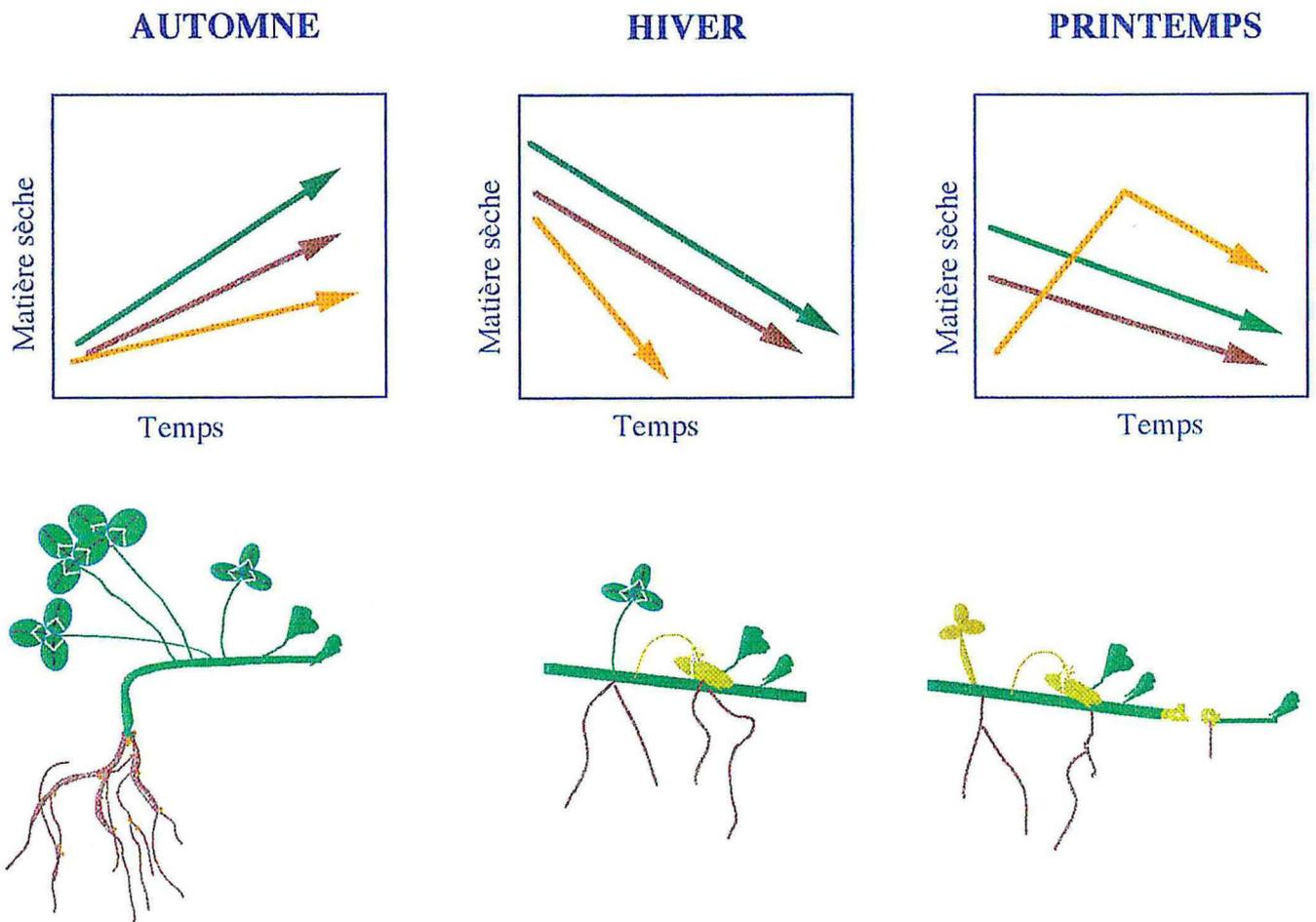


Figure 1.6 : Evolution de la biomasse du trèfle blanc de l'automne au printemps .
 Stolons : ——— Feuilles : ——— Racines: ———

Au cours de l'hiver, la biomasse des stolons est la plus importante mais elle peut diminuer de 40 à 70%. La production de feuilles continue à un rythme très ralenti pendant l'hiver et les feuilles sont petites, basses et incomplètement développées. Au printemps, la biomasse des stolons, racines et feuilles chute et l'on peut observer une mort accrue des stolons. Ces phénomènes vont placer le trèfle en situation défavorable de reprise et donc de compétition avec les graminées. De plus, la température minimale de croissance du trèfle ne semble pas encore clairement déterminée. Elle explique en grande partie le retard en végétation du trèfle au printemps par rapport aux graminées.

3. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LES ECHANGES GAZEUX FOLIAIRES

3.1. Photosynthèse Nette

D'une manière générale, les travaux relatifs à l'étude de l'assimilation de CO₂ chez les plantes cultivées concluent sur le fait que les faibles températures réduisent cette assimilation (Woledge et Tewson, 1989 ; Koscielniak, 1993 et Stirling *et al.*, 1993). Woledge *et al.*, 1989 observent une photosynthèse nette journalière inférieure en hiver de 90% aux valeurs estivales pour un couvert de trèfle et ray-grass en plein champ. Les mêmes auteurs ont remarqué que le taux de photosynthèse du trèfle en hiver est inférieur à celui du ray-grass alors que l'inverse se produit en été. Dans le cas de gels, la photosynthèse nette risque d'être totalement inhibée (Klosson et Krause, 1981). Des espèces de régions froides présentent un optimum de photosynthèse à des températures plus basses que les espèces des régions tempérées, et ces optima peuvent se déplacer si les espèces sont capables de s'acclimater (Côme, 1992), (fig 1.7).

En hiver, la réduction de la température s'accompagne également d'une forte diminution du rayonnement. Il existe alors de fortes interactions entre la photosynthèse et le rayonnement solaire (Woledge et Tewson, 1989). La diminution de la photosynthèse sera plus importante sous forte luminosité (Woledge et Dennis, 1982). A

basse température, l'intensité lumineuse nécessaire pour saturer l'incorporation du CO₂ est plus faible qu'à température normale (Côme, 1992). De nombreuses études tentent d'expliquer la diminution de la photosynthèse induite par des faibles températures. Lorsqu'un gel intervient, la chute de la photosynthèse suggère que l'environnement chloroplastique interne et externe a été altéré pendant les premières étapes du gel (Steffen *et al.*, 1989). Chez le maïs soumis au froid, la diminution de la photosynthèse peut être due à une augmentation de la résistance des stomates mais également à la diminution de l'accumulation de chlorophylle a et b (Koscielniak, 1993). Les réactions enzymatiques sont également sensibles à la diminution de température (Krall et Edwards, 1993). L'effet global de la température sur l'activité photosynthétique est donc la résultante de multiples effets sur les étapes élémentaires du processus photosynthétique (Côme, 1992).

3.2. Photoinhibition :

La diminution de l'efficacité photochimique des photosystèmes II et I (PSII et PSI) peut être à l'origine de la baisse de photosynthèse chez les plantes soumises à un stress. Ce paramètre est mesuré grâce aux techniques de fluorescence chlorophyllienne. L'un des phénomènes les plus courants conduisant à la perte de rendement photochimique des photosystèmes est la photoinhibition. Elle est définie par une série d'événements se produisant au niveau des centres réactionnels de la photosynthèse, c'est à dire, les PSII et PSI. De nombreux auteurs démontrent l'existence d'une photoinhibition lorsque, à l'obscurité, quand tous les centres réactionnels entre les deux photosystèmes sont déconnectés la fluorescence maximale émise par le PS II et le PSI augmente (Genty *et al.*, 1989 ; Tyystjarvi *et al.*, 1994).

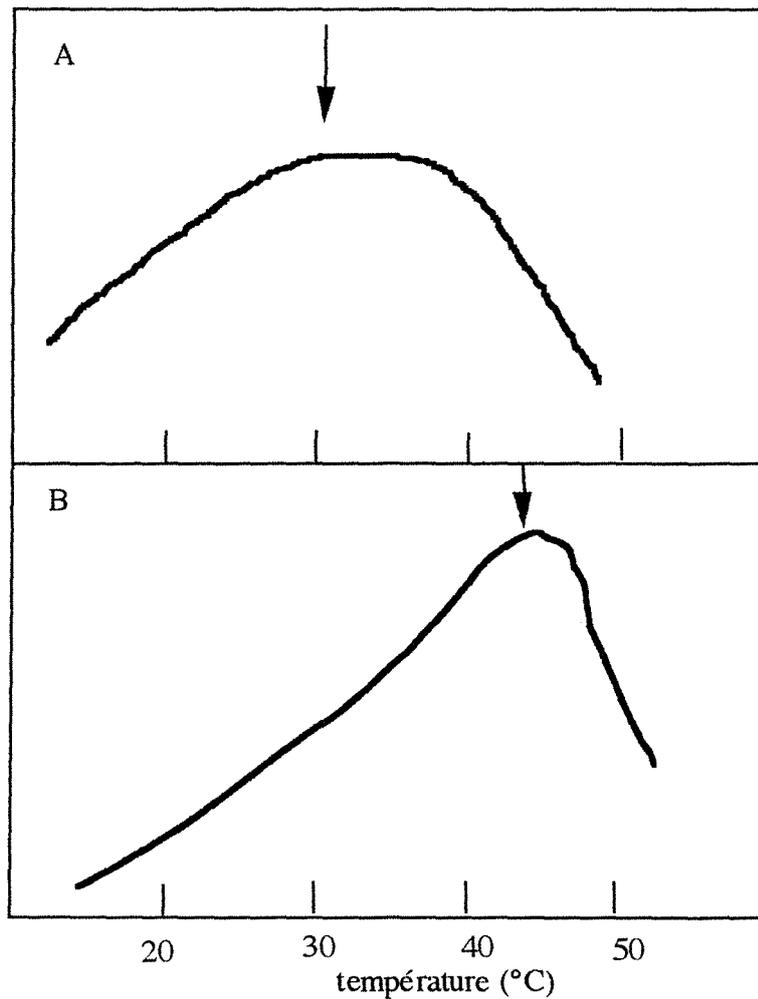


Figure 1.7. Effet de la température sur l'activité photosynthétique de deux espèces en C3, adaptées ou non aux faibles températures. A correspond à l'espèce adaptée aux températures fraîches (16°C) (*Atriplex glabriuscula*) ; B correspond à l'espèce adaptée aux températures élevées (45°C) (*Larrea divaricata*). Les mesures ont été réalisées à 0,1% de CO₂ dans des conditions d'éclairement élevé et de concentration normale en oxygène (21%). Les espèces adaptées au froid présentent des optima de température (flèches) de leur activité photosynthétique inférieurs à ceux des espèces adaptées aux températures élevées. D'après Côme (1992).

Cependant, on ne peut conclure à l'existence d'une photoinhibition que lorsque ce phénomène est réversible (Tyystjarvi *et al.*, 1994). Le processus de photoinhibition commence par une absorption de photons, il conduit tout d'abord à une perte de

l'activité photochimique du centre PSII et ensuite à une dégradation de la protéine D1 qui conditionne le transfert d'électron du PSII vers le PSI. La photoinhibition est due à la diminution du transfert de l'excès d'énergie produit en pleine lumière vers les centres réactionnels. L'accumulation d'énergie au niveau des centres réactionnels risque de favoriser une création en excès d'atomes d'oxygène ou de radicaux libres et de les détruire (Hale et Orcutt, 1987). Pour éviter cette altération, l'énergie sera dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence (appelée alors "quenching non photochimique" de l'énergie d'excitation du PSII), (fig 1.8).

De récentes études font état de la photoinhibition induite par les faibles températures (Öquist *et al.*, 1992 ; Kristjansdottir et Merker, 1993). Ces résultats ont pu être obtenus grâce à l'utilisation de mesure de la fluorescence chlorophyllienne dont le principe sera décrit en matériel et méthodes. La diminution de l'efficacité photochimique des photosystèmes I et II peut également être due à des phénomènes différents de la photoinhibition. L'existence de ces phénomènes pourra être mise en évidence à la lumière, lorsque les centres réactionnels sont activés. Dans ces conditions, si le PSII est affecté par un facteur externe, la température par exemple, l'excès d'énergie stockée autour du PSII sera dissipée sous différentes formes : dissipation thermique, transfert direct vers le PSI. Ces modifications seront alors mises en évidence par la diminution de la fluorescence émise.

En résumé, les faibles températures vont diminuer la photosynthèse nette. La diminution de la photosynthèse qui peut expliquer la réduction de croissance du trèfle blanc soumis à des faibles températures va s'accompagner d'une modification de la gestion du carbone fixé. Des phénomènes de photoinhibition peuvent expliquer cette réduction de la photosynthèse mais également d'autres altérations de type enzymatiques ou de dissipation d'énergie.

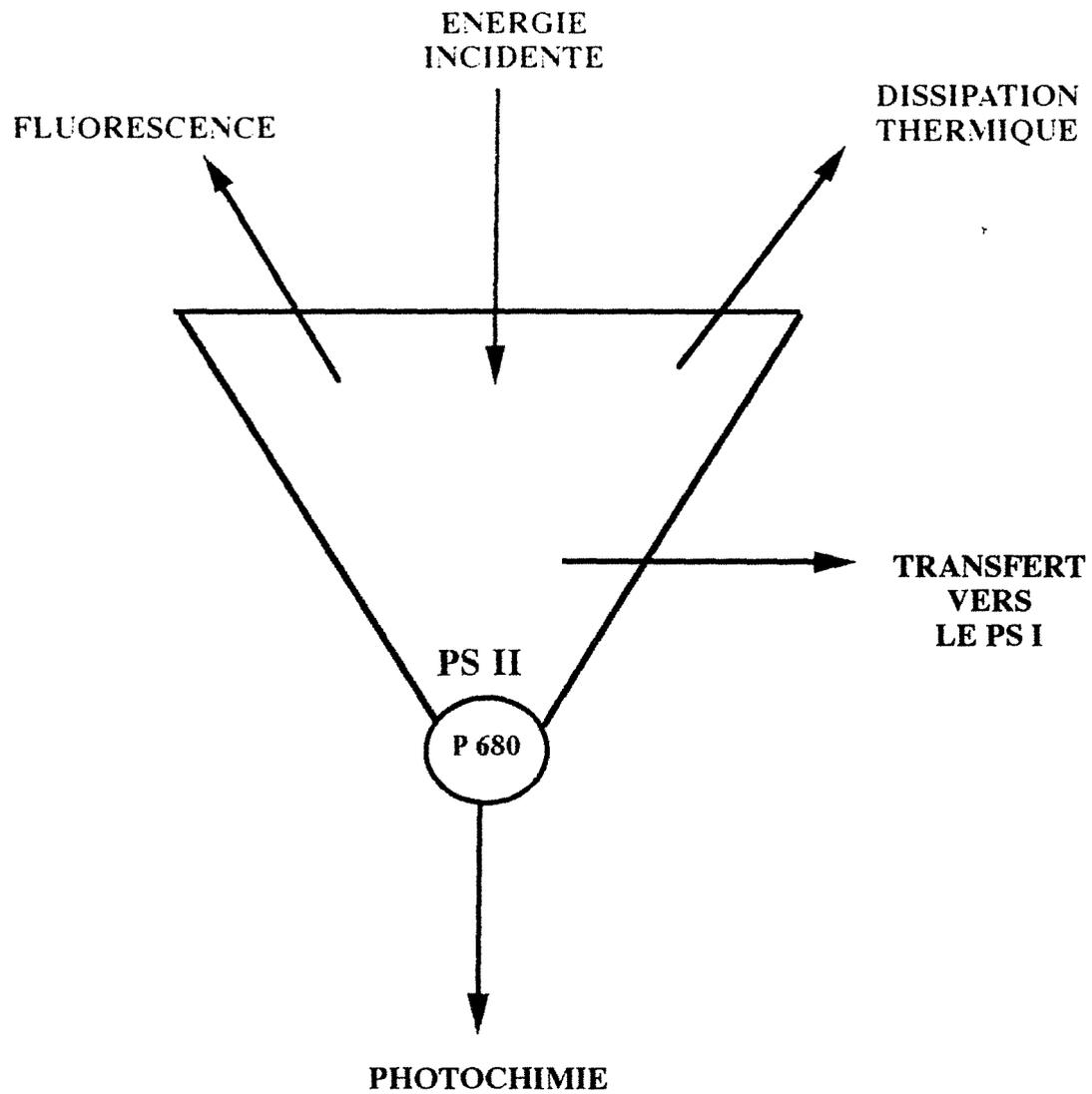


Figure 1. 8 : Représentation schématique des différentes voies d'utilisation de l'énergie reçue par le photosystème II (P 680, centre réactionnel du PS II). D'après Epron, 1993.

4. EFFETS DU FROID SUR LA GESTION DU CARBONE ET DE L'AZOTE

4.1. Les réserves carbonées

Réserves : Les réserves sont des glucides et des composés azotés élaborés, stockés dans la plante et utilisés comme substrat pour sa maintenance et pour le développement des futurs bourgeons et racines (Graber *et al.* (1927); Weinman (1948) dans May (1960)).

Des feuilles adultes de trèfle blanc exportent 70% du carbone fixé pendant la photopériode et retiennent simultanément 30% de ce carbone pour l'utiliser pendant la nuit. Ce stockage temporaire est principalement constitué d'amidon et de saccharose, ce qui représente une particularité chez les feuilles de trèfle blanc (Gordon *et al.*, 1987). Les 70 % du carbone fixé par les feuilles sont redistribués dans les stolons, les racines et les nodosités. Trois semaines après un marquage au ^{14}C , 10% du carbone fixé par les feuilles est investi dans les réserves dites "à long terme" et localisé dans les stolons et les racines. Les réserves carbonées sont des molécules de faible et de haut poids moléculaire mais 18 jours après un marquage au ^{14}C , les stolons contiennent plus de molécules à haut poids moléculaire qu'à faible poids moléculaire alors que l'inverse est observé dans les racines (fig 1.9) (Danckwerts et Gordon, 1989). Chez le trèfle blanc, les réserves carbonées "à long terme" sont représentées majoritairement par l'amidon. Cet amidon sera ultérieurement hydrolysé en sucres solubles qui seront utilisés par la plante pour son métabolisme. Les stolons contiennent 10% d'amidon et 5 à 6% de sucres solubles en automne.

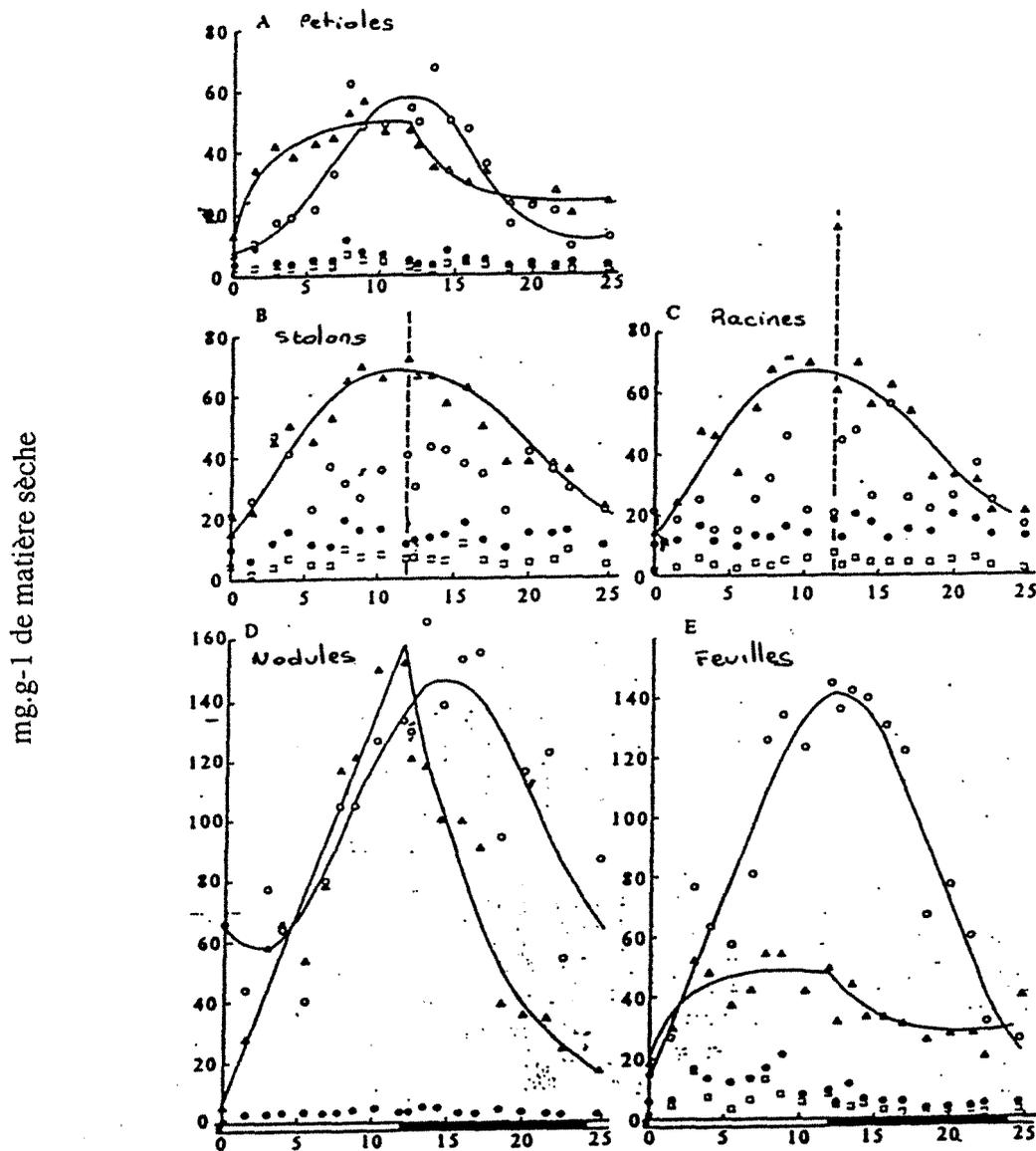


Figure 1.9. : Modifications diurnes des composés carbonés des organes de la plante de trèfle : A : Pétioles, B : Stolons, C : Racines plus nodosités attachées, D : Nodosités et E : Feuilles. Amidon 0, saccharose Δ , glucose \bullet , fructose \square . Les courbes sont tracées entre tous les points lorsque cela est possible, ou les résultats du jour et de la nuit sont séparés. Le pourcentage de la variance est pour (A) : amidon, 85% ; saccharose, 0-12h : 85%, 12-24h : 98% ; (B) : saccharose, 90% ; (C) : saccharose, 72% ; (D) : amidon, 75% ; saccharose, 0-12h : 93%, 12-24h : 85% ; (E) amidon, 90% ; saccharose, 0-12h : 61%, 12-24h : 84%. D'après Danckwerts et Gordon, 1989.

Dans les stolons de trèfle blanc il existe deux parties distinctes concernant la localisation de l'amidon:

- dans la partie intermédiaire, l'amidon est localisé dans les cellules corticales, contre les faisceaux vasculaires. Il est concentré au niveau des noeuds (départ des racines et des pétioles) (Laperrière, 1984).

- dans la partie apicale, l'amidon est localisé autour des faisceaux vasculaires, il est concentré dans la moelle à l'apex.

4.1.1. Principaux sucres du trèfle blanc

Les principaux sucres solubles chez le trèfle sont le fructose, le glucose, le saccharose, le maltose et le raffinose. Le saccharose (dans tous les organes) et le maltose (surtout dans les racines et les stolons) représentent 80% des sucres solubles de la plante entière (Beinhart, 1964). Des quantités importantes de pinitol ont également été détectées chez le trèfle blanc (Davis et Nordin, 1983). Cette molécule semble impliquée dans la fixation symbiotique de l'azote (Philipps *et al.*, 1984) mais n'est certainement pas une forme de réserve rapidement utilisable (Smith et Philipps, 1982). Le tableau 1.1 donne quelques concentrations en sucres détectés chez le trèfle blanc.

	sucres solubles			polyols cycliques		
	F	G	S en mg.g ⁻¹ MS	Ch	My	Pi
Feuilles	0,1-4	2,6-9	0,2-25	0,6	1,5	7-26
Racines	0,1-1	4-7	9-43	0,8	0,6	3,4-11
Nodosités	<0,1	3,4	3,1	6,4	1,2	12,9

Tableau 1.1 : Principaux sucres solubles dans les feuilles, les racines et les nodosités du trèfle blanc adulte prélevé en plein champ : F : Fructose, G : Glucose, S : Saccharose et polyols cycliques, Ch : Chiro-inositol, My : Myo-inositol, Pi : Pinitol. Les valeurs indiquées sont des fourchettes de données relevées dans Philipps *et al.*, (1984) et Smith et Philipps (1982).

4.1.2. Evolution des sucres et de l'amidon pendant l'hiver

Lorsqu'une jeune plante est placée dans des conditions de températures normales (25°C), les produits de la photosynthèse sont pratiquement tous utilisés. Aux alentours de 5°C, la photosynthèse continue à vitesse ralentie tandis que la croissance est pratiquement arrêtée. Dans les plantes endurcies au froid, la diminution de la production des assimilats ne limite pas leur utilisation qui elle aussi est ralentie, ce qui a pour conséquence une accumulation de glucides (fig. 1.10) (Côme, 1992). En automne, le carbone fixé en excès est stocké sous forme de polysaccharide non structural : l'amidon dont la quantité peut atteindre 10 à 20% de la matière sèche (Cyr et Bewley, 1989). On observe alors chez le trèfle une accumulation d'amidon dans les stolons et une diminution des sucres solubles (polymérisation) (Vez, 1961, Treillet, 1981). En hiver, la teneur en amidon dans les stolons chute (Lüscher, 1989) quelle que soit la partie considérée (Laperrière, 1984). Cet amidon est hydrolysé en monosaccharides et disaccharides pendant la période hivernale (Cyr et Bewley, 1989; Volenec *et al.*, 1991; Bertrand et Paquin, 1991). En février l'amidon ne représente plus que 4,2% de la matière sèche et le saccharose est 7 fois plus concentré qu'en automne. Chez le trèfle blanc, le saccharose représente 0,8% de la matière sèche en novembre et 6% en février, le glucose lui ne représente plus que 0,15% à la fin de l'hiver. Les variations des teneurs en glucides sont plus importantes dans les stolons que dans les feuilles (Guckert *et al.*, 1983) (fig 1.11).

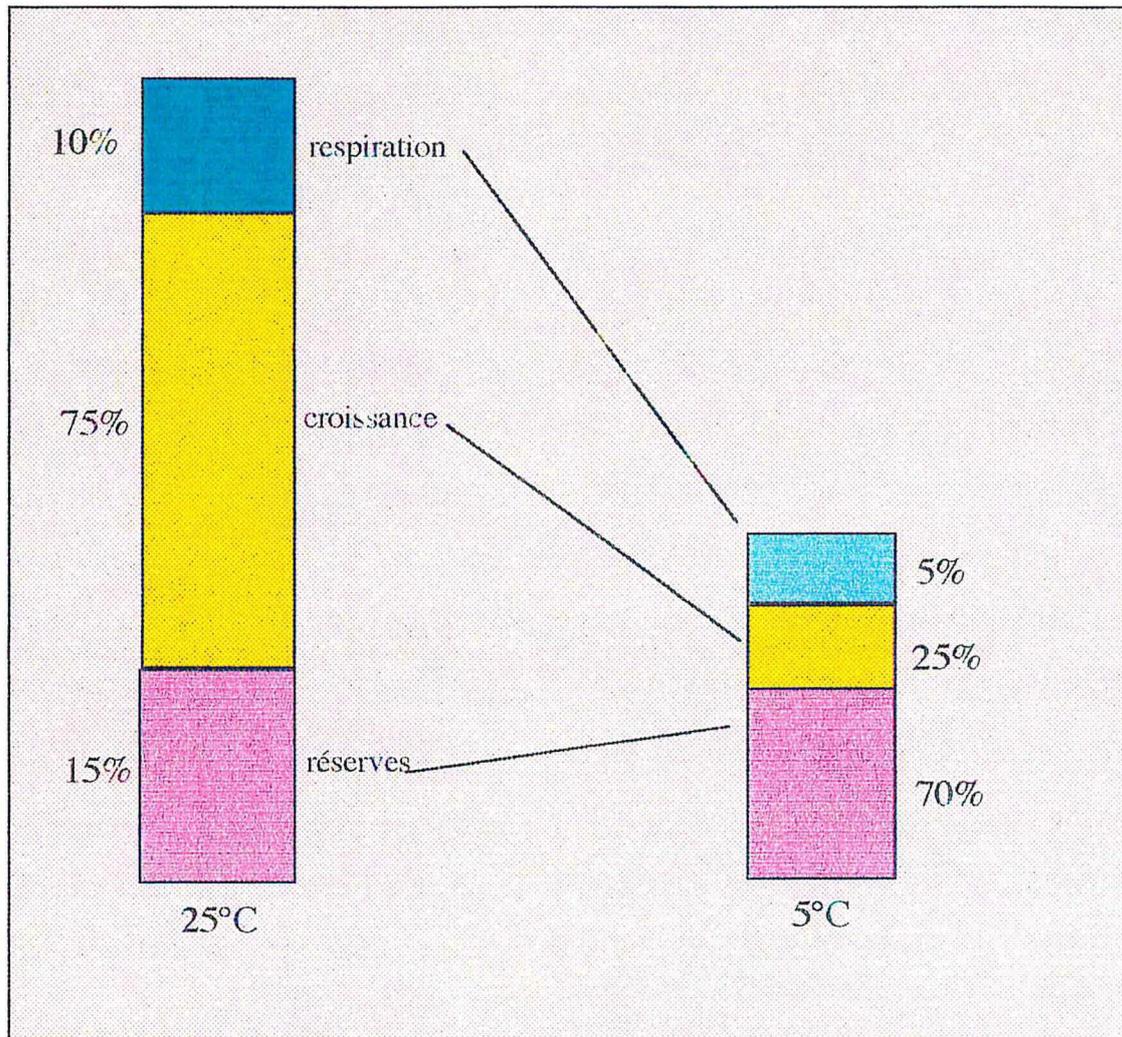


Figure 1.10. Représentation schématique des effets du froid sur l'utilisation des glucides chez une jeune plante endurcie au froid. A 25°C, la majorité des produits de la photosynthèse sont utilisés pour la croissance de la plante et par le processus respiratoire ; une faible quantité est accumulée dans les réserves. A 5°C, la croissance est pratiquement stoppée et la photosynthèse est ralentie. L'accumulation de glucides est alors augmentée. D'après Côme, 1992.

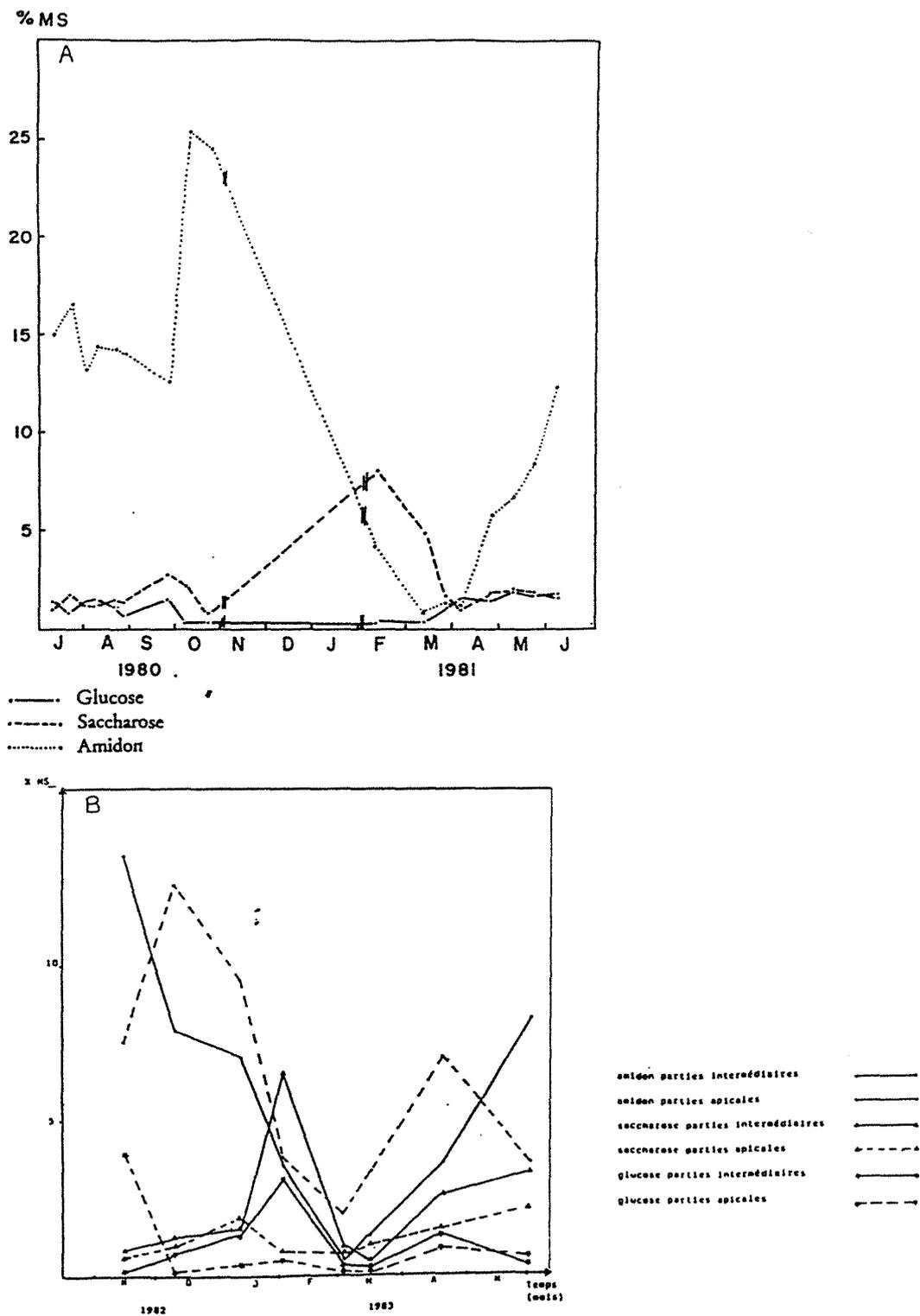


Figure 1.11 : Fluctuations saisonnières des teneurs en glucides utilisables des stolons de trèfle blanc. Détermination en 1980 et 1981 sur le stolon entier (A) et en 1982 et 1983 sur les parties apicales et intermédiaires du stolon. D'après Guckert *et al.*, 1983 et Laperrière, 1984.

En réponse à un coup de froid (février), un pic hivernal de glucose et de saccharose est observé dans les parties intermédiaires du stolon de trèfle blanc (Laperrière, 1984). Chez d'autres plantes soumises au froid, on observe une augmentation de la teneur en glucose, saccharose et raffinose : (Yelenosky et Guy, 1989 ; Bertrand et Paquin, 1991 ; Koster et Lynch, 1992 ; Tronsmo *et al.*, 1993).

Au printemps, on observe une diminution rapide de la concentration en amidon à l'apex. Cette diminution correspond à une mobilisation du carbone pour la repousse (Laperrière, 1984). Le rendement de la première coupe au printemps s'établit au dépens de la biomasse des stolons qui représentent une quantité d'énergie nécessaire au développement des plantes pendant l'hiver et au printemps (Harris *et al.*, 1983). La chute de la concentration en amidon provoque cependant une mortalité importante des bourgeons, certainement dûe à la consommation de réserves au début du printemps pour supporter la repousse (Ashworth *et al.*, 1993).

Dans les parties intermédiaires du stolon, la concentration en amidon augmente, il s'agit d'un stockage de carbone en même temps que les feuilles apparaissent et que la photosynthèse reprend (Laperrière, 1984).

4.2 Les réserves azotées

Chez le trèfle blanc, l'azote soluble ne comprenant pas les protéines représente 60 mg.g^{-1} de matière sèche dans les feuilles, 50 mg.g^{-1} dans les racines et 25 mg.g^{-1} de matière sèche dans les nodosités (Gérant-Sauvage, 1982). Cette fraction d'azote soluble est constituée :

- d'acides aminés solubles dont les teneurs sont respectivement de 119, 53 et 280 mg de N.g^{-1} de matière sèche dans les feuilles, les racines et les nodosités

- d'azote ammoniacal dont les teneurs sont respectivement de 14, 14 et 30 mg de N.g^{-1} de matière sèche dans les feuilles, les racines et les nodosités

-d'amides dont les teneurs sont respectivement de 260, 53 et 280 mg de N.g⁻¹ de matière sèche dans les feuilles les racines et les nodosités (Gérant-Sauvage, 1982).

Très peu de données existent sur l'évolution saisonnière des réserves azotées chez le trèfle blanc. Une accumulation d'asparagine a été montrée chez le trèfle blanc en automne (32,6 mmol.g⁻¹ de Matière Fraîche (MF)), cet acide aminé sera remplacé au printemps, après la repousse par l'arginine (21,8 mmol.g⁻¹ MF) (Sagisaka, 1987). L'asparagine est une forme de transport et de stockage alors que l'arginine n'est qu'une forme de réserve. Ainsi, l'asparagine s'accumule dans les jeunes organes et représente une source d'azote disponible pour une croissance rapide au printemps alors que l'arginine se trouve dans les organes plus âgés (Rosnitschek-Schimmel, 1985). Les études sur l'évolution des composés azotés chez le trèfle blanc concernent les mouvements du pool azoté après une coupe ou lors de la repousse printanière. Culvenor (1991) a montré que les protéines solubles étaient les formes principales de mobilisation de l'azote après une coupe chez le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.). Lors de la repousse printanière, 40% de l'azote des racines et 74% de l'azote des stolons sont remobilisés pour la repousse des parties aériennes. Une grande part de l'azote en réserve est utilisée pendant les 10 premiers jours de repousse. Une protéine de 17,3 KD dans les stolons et une de 15KD dans les racines semblent réagir comme des protéines de réserves pour le développement végétatif (Corre *et al.*, 1994). Des travaux plus avancés sur le rôle et le comportement du pool azoté pendant l'hiver ont été réalisés sur d'autres espèces pérennes appartenant à la famille des astéracées, des euphorbiacées et des labiacées. Ils concluent généralement sur un rôle important des composés azotés dans la viabilité des plantes pérennes.

La proline est un acide aminé indicateur de stress. Chez le trèfle blanc, la concentration en proline augmente au froid et représente 50 % des acides aminés totaux après un traitement à 0,5°C (Sandli *et al.* 1993). Chez l'euphorbe, l'asparagine est le composé

azoté qui augmente en quantité la plus importante pendant l'hiver, l'arginine est aussi associée à la survie hivernale (Cyr *et al.*, 1990). Chez la luzerne, 12 à 18 nouveaux polypeptides sont synthétisés lors d'une acclimatation à 2°C (Castonguay *et al.*, 1993). Alors que la proline diminue pendant l'hiver dans les racines de luzerne, la teneur en protéines solubles augmente de 500% chez les plantes de luzerne endurcies et de 200% chez des plantes non endurcies (Jung *et al.*, 1967).

En résumé, les réserves carbonées du trèfle blanc sont majoritairement représentées par l'amidon. Cette molécule s'accumule dans les stolons et les racines en automne. Au cours de l'hiver, elle sera hydrolysée en molécules plus simples comme le saccharose. La concentration en amidon est donc très faible à la sortie de l'hiver ce qui pourrait expliquer le taux de mortalité accru des stolons au printemps. Très peu de données existent sur l'évolution des réserves azotées du trèfle blanc pendant l'hiver. Certains acides aminés et protéines s'accumulent pendant l'automne et des protéines de faible poids moléculaire semblent très impliquées dans la repousse du trèfle blanc.

5. EFFETS DU FROID SUR L'ETAT HYDRIQUE DE LA PLANTE

Nous aborderons ici les notions relatives aux potentiels hydriques et osmotiques, et les teneurs en eau relative, paramètres qui caractérisent l'état hydrique d'une plante ou d'un organe. Devant le faible nombre de travaux sur l'état hydrique du trèfle blanc soumis à de faibles températures nous évoquerons dans cette partie des recherches conduites sur d'autres plantes.

On observe chez certaines plantes des variations saisonnières de l'état hydrique. Des températures froides de type "chilling" (de 0°C à 5°C) peuvent induire une légère diminution de la teneur en eau des cellules mais dans des proportions ne permettant pas de parler de déshydratation (Hale et Orcutt, 1987 ; Gonzalez *et al.*, 1990). Par contre,

des températures négatives entraînent une déshydratation cellulaire avec une diminution de la teneur en eau relative (Charest et Phan, 1990). Si un gel intervient, il induit une déshydratation dont les effets peuvent être létaux si elle atteint 75% (Yelenosky et Guy, 1989). Dans ce cas, la sortie d'eau vers l'apoplasme provoque une déshydratation dont les effets peuvent être irréversibles (Capell et Dorffling, 1993; Fukuda *et al.*, 1993; Goldstein *et al.*, 1994). Les modifications induites par le gel se produisent en plusieurs étapes. Dans un premier temps, l'eau à l'intérieur des cellules et dans les espaces intercellulaires se refroidit, la glace se forme en dehors des cellules car la concentration est inférieure à celle à l'intérieur des cellules. La nucléation à l'intérieur de la cellule est empêchée grâce à la barrière plasmique. Tant que la glace n'est pas en contact avec le contenu cellulaire, un gradient de pression de vapeur se forme entre les deux compartiments. L'équilibre vapeur-glace s'établit soit par l'évaporation d'eau en direction du compartiment extracellulaire, soit par la formation de glace à l'intérieur des cellules. La manière dont l'équilibre s'installe va dépendre de la vitesse de refroidissement en relation avec la perméabilité du plasmalemme. La quantité d'eau qui va sortir de la cellule va dépendre de la perméabilité du plasmalemme mais aussi de la surface disponible pour le flux. Si le flux n'est pas adéquat, l'équilibre est établi par la formation de glace à l'intérieur de la cellule ce qui généralement cause la mort de la cellule (Hale et Orcutt, 1987). Si la déshydratation n'atteint pas un seuil critique, on pourra alors observer une réhydratation chez la plante replacée dans des conditions optimales. Cependant, cette réhydratation ne sera pas totale et la vacuole ne retrouvera pas son volume initial. La réexpansion des cellules sera alors variable selon le degré de tolérance au gel de la plante, via les particularités de ses membranes (Hale et Orcutt, 1987).

Il existe donc une différence très importante de réaction hydrique d'une plante selon qu'elle sera soumise à des faibles températures proches de 0°C ou à des températures inférieures à 0°C, conduisant au gel. Les températures froides ne sont pas les seuls

facteurs d'une déshydratation de la plante au cours de l'hiver. Un vent froid et une couverture neigeuse entraînent une diminution du potentiel hydrique foliaire (-1,2 MPa en pleine nuit et -2,3 MPa en pleine journée du lendemain) chez le thé. Un vent plus faible et une température moyenne de 3 à 5°C n'abaissent le potentiel hydrique que jusqu'à -1MPa (Fukuda *et al.*, 1993).

La perte d'eau des cellules soumises au gel peut être ralentie ou évitée par le développement d'un ajustement osmotique, qui correspond à une accumulation de solutés sans perte d'eau concomitante de la cellule (Munns, 1988). Certains auteurs ont observé la diminution du potentiel osmotique lorsque des plantes sont soumises à des faibles températures (Yelenosky et Guy, 1989; Thomas et James, 1993). Cette diminution du potentiel osmotique peut résulter d'une concentration passive en solutés en réponse à une déshydratation ou d'une accumulation active en solutés. La diminution du potentiel osmotique par concentration passive peut être due à une perte de la teneur en eau; à une diminution du volume de tissu foliaire due à des altérations de la cellule; à une modification de l'élasticité du tissu foliaire ou à une répartition de l'eau entre le volume symplastique et apoplastique (Girma Fekade et Krieg, 1992). La contribution maximale au potentiel osmotique est assurée par les sucres réducteurs et les ions K⁺. La contribution de la proline est très importante après un stress hydrique et sa régulation semble plus effective que celle des autres solutés lors d'un ajustement osmotique. Quelle que soit la nature du stress, l'ajustement osmotique peut être considéré comme un mécanisme qui modifie l'équilibre entre la production et la consommation d'une plante (Li *et al.*, 1992). Le processus de conservation ou de génération des solutés osmotiques (sucres ou acides aminés) limite la synthèse de macromolécules qui sont généralement nécessaires à la croissance des plantes. Des cellules adaptées à un stress ont une croissance plus faible que des cellules en condition témoin même si leur turgescence semble être beaucoup plus élevée (Handa *et al.*, 1983).

En résumé, les principales altérations hydriques de la plante interviennent en cas de gel. La déshydratation qui suit peut être létale. Chez les plantes soumises à des températures froides positives, il n'existe que de faibles déshydratations. Par contre, un ajustement osmotique peut intervenir par l'accumulation active de solutés et permettre à la plante de maintenir une turgescence positive, donc de lutter contre les effets déshydratants du froid.

Les chapitres précédents font état des modifications de morphologie, physiologie et de métabolisme induites par les basses températures, sur les plantes cultivées, notamment sur le trèfle blanc lorsque ces données sont connues. Nous avons également abordé en début les définitions relatives aux phénomènes de résistance, tolérance et adaptation aux faibles températures.

Les chapitres qui suivent auront pour objectif de décrire les relations existant entre les modifications physiologiques induites par le froid et la tolérance des plantes aux basses températures. Le rôle de ces modifications sera abordé et nous ferons le point des connaissances sur le déterminisme de la survie hivernale du trèfle blanc fig 1.12.

6. ACCLIMATATION-ENDURCISSEMENT

De nombreuses expérimentations sur les effets des faibles températures sur les plantes font état de périodes d'acclimatation ou durcissement avant le véritable traitement au froid. Ces périodes d'acclimatation ont pour but de préparer la plante à des conditions plus sévères. La définition de Larsen, (1994) rappelle qu'une acclimatation au froid intervient après une exposition de la plante à des températures, photopériodes et intensité lumineuses plus faibles que celles auxquelles la plante est régulièrement soumise. Des acclimatations en conditions contrôlées ont pour but de simuler un "automne" et donc d'induire chez les plantes des réponses spécifiques.

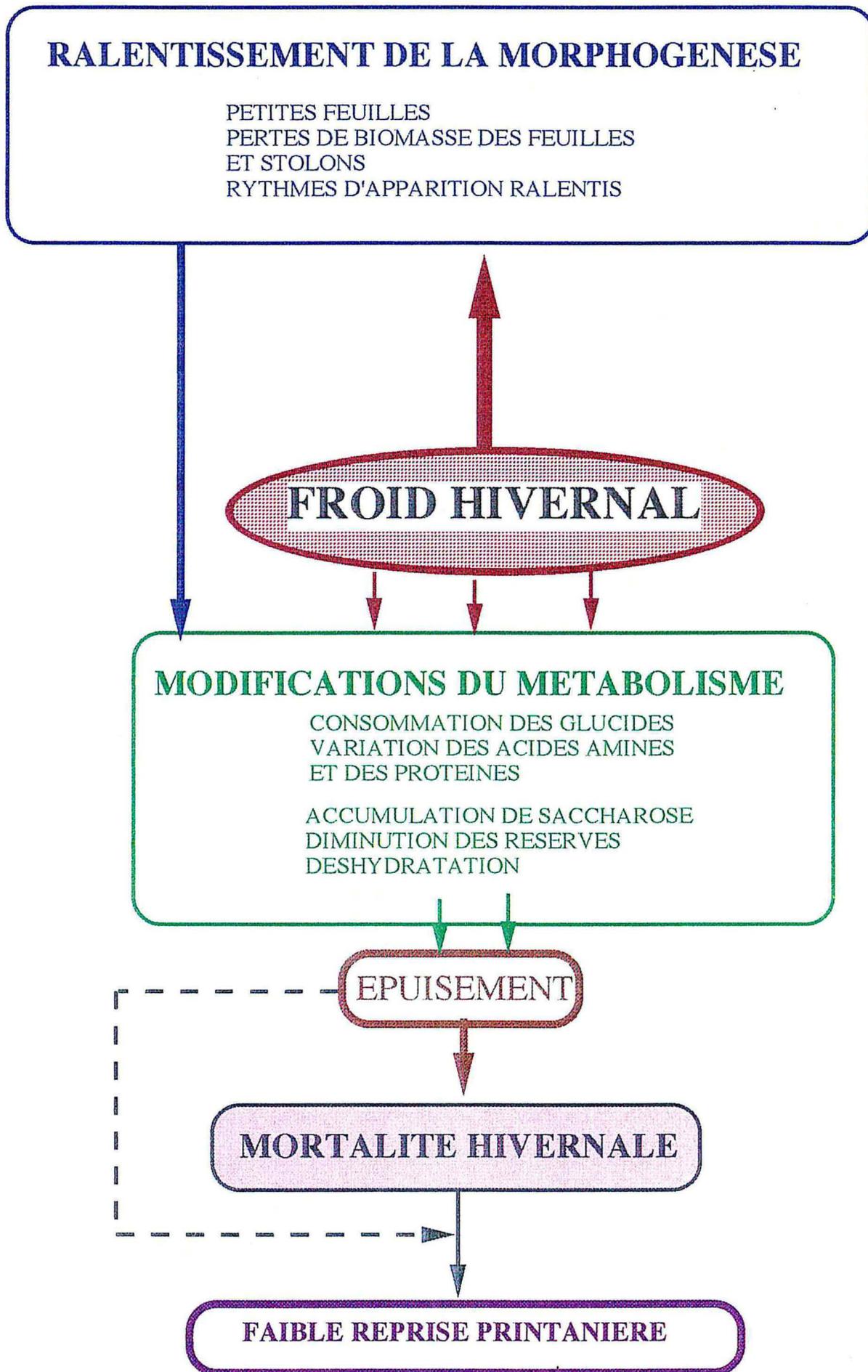


Figure 1.12. Synthèse des effets du froid sur le trèfle blanc

Ainsi, une exposition à des températures proches de 0°C et des faibles photopériodes (12h) induit une acclimatation au froid chez le trèfle blanc qui semble lui permettre de mieux résister au gel. Il est possible qu'en plus d'une période d'acclimatation à de faibles températures supérieures à 0°C, quelques petites gelées conduisent à un durcissement rapide chez le trèfle blanc (Juntilla *et al.* 1990).

Une acclimatation au froid augmente la résistance intérieure de la vacuole chez la luzerne, ce qui conduit à une augmentation de la tolérance au froid. Il existe deux phases dans le processus d'acclimatation au froid chez les herbacées. La première étape, à des températures supérieures à 0°C induit une diminution du potentiel osmotique (due à une accumulation de sucres solubles) et une diminution du potentiel hydrique (corrélée à une augmentation de l'acide abscissique). La deuxième étape est dépendante du gel. Si les températures sont comprises entre -3°C et -5°C, des modifications réversibles des propriétés de la membrane se produisent. Ceci induit une accentuation de la chute du potentiel hydrique et du potentiel osmotique ainsi que la synthèse d'acide abscissique (Kacperska *et al.* 1993). Chez la luzerne par exemple, une acclimatation de 2 semaines à 2°C permet de passer d'une température létale de -5°C à -9,5°C pour un cultivar sensible et à -14,5°C pour un cultivar tolérant au froid. Par contre, l'extension de la période d'acclimatation de 2 semaines à 4 semaines cause une diminution de la tolérance au gel (Castonguay *et al.*, 1993).

7. LA SURVIE HIVERNALE DES PLANTES CULTIVEES

Le froid, nous l'avons vu dans les chapitres précédents, induit des réactions morphologiques et physiologiques chez les plantes. Ces réponses physiologiques vont de la diminution de l'assimilation nette à la mise en réserves et consommation de composés carbonés et azotés et font intervenir des mécanismes de régulation osmotique. Actuellement, il existe de nombreuses controverses quant à la définition du

rôle exact de ces composés dans la résistance ou la tolérance de la plante concernée aux faibles températures.

Dès 1955, Hodgson et Bula concluent sur du mélilot cultivé en Alaska (*Melilotus* spp.) que la tolérance au froid ou l'intolérance au froid ne sont pas liées aux quantités de carbone en réserves dans les racines ou dans les stolons. Beinhart (1964) remarque que le carbone n'est pas un facteur limitant pour la repousse du trèfle blanc et qu'il n'existe pas de corrélation entre les sucres solubles et la ramification ou la croissance du trèfle. Cependant, Vez (1961) à partir de ses travaux sur le trèfle blanc en Suisse démontre que la survie hivernale du trèfle est assurée par le niveau de réserves dans les racines et dans les stolons. Dès lors, de nombreuses controverses apparaissent.

La quantité de stolons présente au début de l'hiver détermine la capacité d'un cultivar à recommencer de croître au printemps. Il existe une corrélation positive chez le trèfle blanc entre le poids de stolons au début de l'hiver et le poids de stolon à la fin de l'hiver ($r=0,982$) (Harris et Rhodes, 1983). Nous avons vu dans les chapitres précédents que les stolons de trèfle blanc accumulaient une grande quantité de réserves en automne. On peut donc penser que ces réserves carbonées et azotées vont être déterminantes dans la reprise printanière du trèfle et dans sa survie hivernale.

Yelenosky et Guy (1977) montrent que la conversion de l'amidon en sucres solubles confère une meilleure tolérance au froid chez les arbres. Les plantes capables de s'acclimater au froid montrent un potentiel énergétique plus élevé que des plantes ne pouvant pas s'acclimater. Il semble en plus qu'au cours d'une exposition au froid, le mécanisme contrôlant la polymérisation des sucres favorise l'accumulation de mono et oligo-saccharides. Ces molécules sont facilement transportées dans la plante et peuvent immédiatement apporter de l'énergie et diminuer le point de congélation par simple effet colligatif (cohésion entre les molécules) (Tronsmo *et al.*, 1993).

L'un des effets des sucres solubles contre le froid est un effet cryoprotecteur sur la membrane plasmique. Cet effet a été démontré pour le saccharose et le raffinose

accumulés pendant une acclimatation au froid de l'orge (Koster et Lynch, 1992). Un second effet est lié au rôle osmotique des sucres à l'intérieur des cellules. En effet, l'accumulation de sucres dans les plantes est supposée faciliter la survie hivernale en diminuant la formation de glace et en évitant la déshydratation, en augmentant le métabolisme des sucres en énergie ou en autres substances protectrices, en protégeant les membranes du gel et en diminuant le point de congélation du contenu cellulaire (Lym et Messersmith, 1993 ; Tronsmo *et al.*, 1993 ; Olien et Clark, 1993). L'accumulation de sucres de mai à janvier dans le ray-grass de 19,9 mg.g⁻¹ MF correspond à 0,09 MPa et à un abaissement du point de congélation de l'eau de 0,17°C. Les sucres solubles sont donc responsables de la diminution du potentiel osmotique observé lorsque les plantes sont soumises au froid (Gonzalez *et al.*, 1990).

D'autres molécules semblent jouer un rôle plus important dans la tolérance au froid que les sucres (Rütten et Santarius, 1993). Les acides aminés sont également osmotiquement actifs. L'augmentation de l'arginine et autres acides aminés pendant l'hiver chez le trèfle blanc joue un rôle important dans le stockage d'azote mais aussi pour protéger les plantes des dommages causés par le froid (Sagisaka, 1987). Des variétés de Mélilot d'Antarctique ont converti beaucoup d'acides aminés et peptides en protéines solubles pendant l'automne, la conversion continue jusqu'à ce que la plante soit suffisamment pourvue en protéines pour tolérer le froid (Hodgson et Bula, 1955). Chez la luzerne, la tolérance au froid est associée de près à la concentration en protéines solubles des collets et racines, ces molécules semblent reliées à la protection contre le gel et dégel (Faw et Jung, 1972).

D'autres substances permettent également à la plante de retrouver un bon état hydrique après un gel. Des plantes déshydratées par le froid récupèrent un niveau correct d'hydratation entre 20 à 30 heures. La turgescence retrouvée est en relation avec la fermeture des stomates et la production d'acide abscissique endogène qui semble jouer un rôle dans la tolérance des plantes au froid (Barnes et Wilson, 1986).

Les solutés qui s'accumulent dans les cellules de plantes soumises à des faibles températures et qui conduisent à un ajustement osmotique, permettent de diminuer le point de congélation de ces cellules et d'éviter ainsi la formation de gel pour une température donnée (Stout et Steponkus, 1977 ; Yelenosky et Guy, 1989 ; Gonzalez *et al.*, 1990 ; Tronsmo *et al.*, 1993).

Cependant, le rôle exact de cet ajustement osmotique dans la tolérance au froid n'est pas encore défini et reconnu (Bertand et Paquin, 1991; Thomas et James, 1993). En effet, l'ajustement osmotique permet de maintenir une turgescence positive même si le volume hydrique diminue (Li *et al.*, 1993). Cependant, certains auteurs montrent que la turgescence ne semble pas contrôler directement la croissance des végétaux et qu'une plante peut ne plus croître et avoir encore une turgescence positive. Ainsi, l'accumulation de solutés qui conditionne l'ajustement osmotique peut être une réponse passive due à la diminution de la croissance de la plante. Une diminution de 30% de croissance relative peut augmenter la pression osmotique de 0,1 à 0,2 MPa dans la plante si la vitesse d'assimilation des solutés organiques et inorganiques n'est pas affectée (Munns, 1988).

De manière fréquente dans la littérature, la tolérance des plantes au gel est mesurée par la température létale à 50% (LT50) dans des bains réfrigérants. Il est aisé ensuite d'établir des corrélations entre cette donnée et la quantité de réserves présentes dans la plante. De cette manière, des auteurs anglais ont montré qu'il n'existait pas de relation entre la LT50 et le potentiel osmotique ou la concentration en solutés chez le ray-grass (Thomas and James, 1993). Chez la luzerne, le coefficient de relation entre les sucres totaux, les sucres réducteurs et la TL 50 est inférieur à 0,5. La méthode de la LT50 est certes rapide et facile à mettre en oeuvre mais elle ne permet pas d'obtenir des renseignements sur les modifications métaboliques induites par le froid ou le gel donc d'aboutir à des informations précises sur les mécanismes de tolérance au gel des plantes. De plus, elle ne donne que des résultats à court terme sur les effets du gel.

L'hypothèse stipulant qu'il faut un niveau élevé de réserves (sucres et amidon) pour tolérer un gel chez les plantes n'est pas forcément vraie. Les sucres peuvent être impliqués dans le processus d'endurcissement sans être nécessairement liés à l'acquisition maximale de la tolérance au gel (Bertrand et Paquin, 1991). Il s'agirait alors uniquement d'une conséquence passive des effets du froid sur la croissance de la plante. L'existence d'une corrélation entre le niveau de sucres solubles et la survie au froid ne confère pas forcément à la plante une tolérance au froid, il faut tenir compte des autres facteurs susceptibles d'influencer cette tolérance comme les pratiques culturales et les conditions météorologiques : la température, l'intensité lumineuse ou encore l'humidité (Wample *et al.*, 1993).

Des controverses quant au rôle des composés azotés existent également. En effet, l'augmentation de la proline observée chez le ray-grass pendant une acclimatation au froid semble résulter d'une réduction de la synthèse protéique ou d'une augmentation de la dégradation des protéines pendant les conditions extrêmes et n'est pas reliée à l'acclimatation (Thomas and James, 1993). La croissance initiale des stolons ayant passé l'hiver peut être influencée par la mobilisation des réserves stockées avant la dépendance des assimilats fournis par la photosynthèse (Eagles et Othman, 1988 ; Vez, 1961). Peu de travaux précisent le rôle des réserves dans la reprise printanière du trèfle. Il semble que les réserves azotées jouent un rôle plus important que les composés carbonés (Corre *et al.*, 1994).

En résumé, une acclimatation au froid permet à la plante de mieux tolérer le gel et les faibles températures. Cette acclimatation correspond à la phase automnale en plein champ, la plante supportera alors plus ou moins bien les conditions hivernales selon l'intensité de son endurcissement. Chez le trèfle blanc, deux théories sont actuellement débattues :

1. La quantité de réserves et leur évolution vont conditionner la survie hivernale du trèfle blanc

2. Ces molécules n'ont pas d'effet actif sur la survie hivernale.

Dans l'hypothèse où une relation positive entre la quantité de sucres et la tolérance au froid existe, les sucres pourront jouer plusieurs rôles : ils apporteront un pool d'énergie facilement mobilisable, ils permettront de diminuer le point de congélation de la cellule par un effet osmotique et ils auront un rôle cryoprotecteur autour de la membrane plasmique.

L'ajustement osmotique décrit précédemment ferait donc intervenir les sucres solubles mais également des acides aminés. Ces dernières substances semblent d'ailleurs être de plus en plus considérées comme inductrices de la tolérance au froid du trèfle (tab 1.2). Les facteurs physiologiques de la plante conditionnant sa reprise printanière sont quand à eux encore très mal définis.

8. CONCLUSION :

De nombreux travaux concernent les effets du froid sur les plantes cultivées. Ces effets seront soit directs : réduction de la morphogénèse, de la photosynthèse, altérations des organes exposés, soit indirects : modifications du métabolisme carboné et azoté, développement de mécanismes de protection : ajustement osmotique. Les effets les plus dangereux du froid sont le gel qui induit une déshydratation de la plante qui peut être létale.

Cependant, il existe des mécanismes qui vont se développer chez certaines plantes cultivées soumises à de faibles températures. Chez le trèfle blanc, ces mécanismes ne sont pas encore clairement élucidés. Il apparaît que cette plante est capable de s'endurcir en automne lorsque les températures, la photopériode et l'intensité lumineuse diminuent. Cet endurcissement se traduit par un ralentissement de la morphogénèse et une accumulation de réserves carbonées telles que l'amidon.

ABSENCE DE ROLE DES COMPOSES CARBONES ET AZOTES DANS LA TOLERANCE AU FROID ET DANS LA REPRISE PRINTANIERE	ROLE DES COMPOSES CARBONES ET AZOTES DANS LA TOLERANCE AU FROID ET DANS LA REPRISE PRINTANIERE
Pas de relation entre la teneur en carbone et la résistance au froid (<i>Hodgson et Bula, 1955 ; Bertrand et Paquin, 1991</i>).	La survie hivernale du trèfle blanc est assurée par le niveau de réserves dans les racines et dans les stolons (<i>Veze, 1961</i>).
La relation entre les sucres et la survie hivernale ne veut pas forcément dire qu'on observe une augmentation de la résistance au froid (<i>Wample et al., 1993</i>).	L'hydrolyse de l'amidon en sucres solubles confère une meilleure tolérance au froid (<i>Yelenosky et Guy, 1977 ; Lym et Messersmith, 1993</i>). Effet positif de l'accumulation de solutés dans les cellules des plantes sur la tolérance au froid (<i>Hale et Orcutt, 1987</i>).
Le carbone n'est pas un facteur limitant pour la repousse (<i>Beinhart, 1964</i>).	Corrélation positive entre la quantité de stolons présente à l'automne et la reprise printanière (<i>Harris et Rhodes, 1983</i>).
	Effet cryoprotecteur des sucres sur les membranes (<i>Koster et Lynch, 1992</i>).
Rôle non osmotique des sucres mais rôle colligatif (<i>Ashworth et al., 1993</i>). Pas de relation entre le potentiel osmotique et la LT50 (<i>Thomas et James, 1993</i>).	Rôle osmotique des sucres à l'intérieur des cellules (<i>Gonzalez, 1990 ; Lym et Messersmith, 1993 ; Olien et Clark, 1993 ; Tronsmo et al., 1993</i>).
	Les sucres vont limiter la déshydratation induite par le gel (<i>Ashworth et al. 1993</i>).
	Rôle plus dynamique des réserves azotées dans la résistance au froid (<i>Cyr et Bewley, 1990</i>).
L'augmentation de composés solubles azotés correspond à une diminution de la teneur en protéines et n'est pas reliée à l'endurcissement au froid (<i>Odlum et al., 1993 ; Thomas et James, 1993</i>).	Rôle osmotique et cryoprotecteur des acides aminés (<i>Rosnitschek et Schimmel, 1985 ; Sagisaka, 1987 ; Santarius, 1994</i>).

Tableau 1.2 : Tableau récapitulatif des hypothèses relatives au rôle des sucres, des acides aminés et du potentiel osmotique dans la résistance au froid.

L'étude présentée ici a dans un premier temps pour but de définir les modifications induites par le froid chez le trèfle blanc cultivé en plein champ en suivant le comportement de deux variétés. Les études menées en plein champ seront réalisées à des fréquences de prélèvement rapprochées et sur une période de 6 mois, répétée quatre années. Nous espérons ainsi obtenir des résultats plus précis que ceux connus actuellement sur la dépendance de la morphogénèse du trèfle blanc avec les facteurs climatiques et les réserves carbonées. Dans un deuxième temps, il s'agira de comprendre le rôle des composés carbonés dans la survie hivernale du trèfle blanc et dans sa reprise printanière. Des études en conditions contrôlées, conduites sur des périodes plus longues que celles observées dans la littérature seront entreprises pour visualiser les réactions métaboliques et morphologiques du trèfle blanc aux basses températures positives et au gel.

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

SOMMAIRE CHAPITRE 2

1. MISE EN PLACE ET SUIVI DES EXPERIMENTATIONS	P 55
1.1. Semis en plein champ	
1.2. Cultures de trèfle au laboratoire	
2. MORPHOGENESE	P 57
2.1. Taux de croissance	
2.2. Caractéristiques morphologiques du trèfle	
3. RELEVES METEOROLOGIQUES	P 60
4. DETERMINATIONS DES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES	P 61
4.1. Prélèvements, stockage des échantillons	
4.2. Détermination des sucres solubles et de l'amidon	
4.3. Détermination des acides aminés	
4.4. Dosages du carbone et de l'azote total	
5. CARACTERISATION DE L'ETAT HYDRIQUE DES PLANTES	P 63
5.1. Teneur en eau relative	
5.2. Potentiel osmotique	
6. MESURE DES ECHANGES GAZEUX	P 65
6.1. Assimilation nette de CO ₂	
6.2. Fluorescence chlorophyllienne	
7. ANALYSES STATISTIQUES	P 68

1. MISE EN PLACE ET SUIVI DES EXPERIMENTATIONS :

Nous détaillerons ici la mise en place des parcelles de trèfle et ray-grass en plein champ puis la mise en place des cultures de trèfle au laboratoire.

1.1. Semis en plein champ :

Deux expérimentations ont été mises en place à la station expérimentale de l'INRA-SAD de Mirecourt dans les Vosges. La station est située à 289 m d'altitude, -6°81'E et 53°6'N et présente une pluviométrie annuelle de 850mm. Les caractéristiques physicochimiques du sol sont données en annexe 1.

La première expérimentation est constituée de 5 parcelles (10m*10m) associant du ray-grass anglais (cv. Preference, type intermédiaire) et du trèfle blanc (cv. Huia). Le semis a été réalisé en mai 1991 à raison de 4kg/ha de trèfle blanc et de 20kg/ha de ray-grass. Aucune fertilisation azotée n'a été apportée pendant toute la durée de l'expérimentation. Les apports de P et K ont été gérés selon les besoins inhérents à la culture et selon les analyses de sol. Les parcelles n'ont reçu aucun traitement chimique global pendant toute la durée de l'expérimentation. Des désherbages manuels ou chimiques (Roundup) ont été réalisés afin de lutter contre les adventices.

Le deuxième essai a été semé en mai 1992. Le protocole d'installation des parcelles a été décidé en commun entre toutes les équipes de la collaboration européenne COST 814. Les parcelles de 5m*5m sont disposées en 5 blocs dans lesquels nous avons réparti les variétés de trèfle blanc Huia et Aberherald en association avec le ray-grass Preference. La variété Aberherald a été sélectionnée par l'équipe de l'IGER à Aberystwyth (Pays de Galles) pour ses aptitudes à la tolérance au froid et à une reprise printanière précoce. Les densités de semis sont les mêmes que pour l'expérimentation précédente. Le semis de trèfle a été réalisé à la volée en mélangeant le trèfle à du sable et le ray-grass a été semé à la machine. Les parcelles ont reçu 25kg.ha⁻¹d'azote au

semis puis après chaque coupe et à chaque printemps et des fertilisations de P et K optimales.

Sur les deux expérimentations, trois à cinq coupes sont réalisées par an, à la faucheuse. Nous avons effectué au hasard un prélèvement de 0,09 m² par parcelle avant chaque coupe afin de déterminer le rendement en matière sèche de trèfle blanc et de ray-grass. La date de la première coupe est décidée en fonction du stade de développement du ray-grass (annexe 2). Lorsque 50% des talles de ray-grass ont atteint le stade 33, la coupe peut être réalisée. Ce stade a été choisi de manière à rendre homogènes les dates de coupes entre les équipes. De plus, il correspond à un stade de maturité optimal pour l'obtention d'un fourrage de qualité. La dernière coupe est réalisée au plus tard à la fin du mois d'octobre.



Figure 2.1. Placement de l'anneau de laine autour du stolon, à l'aisselle de la deuxième feuille développée.

1.2. Cultures de trèfle au laboratoire :

Pour réaliser les expérimentations en conditions contrôlées, nous avons choisi de travailler sur des boutures de trèfle issues d'un même clone afin de limiter les hétérogénéités entre plantes. Ces boutures sont réalisées à partir d'apex de stolon d'environ 3 cm de long. A la mise en place, ces apex sont défoliés pour limiter la déshydratation induite par l'évaporation et les racines sont coupées. Les boutures sont placées horizontalement sur un mélange de tourbe, vermiculite et sable (30/20/50 v/v/v). Environ 10 jours après le bouturage, les plantes sont inoculées avec une suspension de *Rhizobium trifolii* (annexe 3). Lorsque les racines sont bien développées, les plantes reçoivent une solution nutritive de Mac Knight, modifiée par Robin *et al.* (1989) une fois par semaine (annexe 4).

2. MORPHOGENESE :

2.1. Taux de croissance :

Afin de déterminer les taux d'apparition ou de disparition des feuilles, les stolons sont bagués au troisième noeud depuis l'apex. En plein champ, ce baguage correspond à la mise en place d'un anneau de laine autour du stolon (fig 2.1). Cet anneau est ensuite attaché à un piquet numéroté. En conditions contrôlées, le repérage initial se fait par marquage du noeud considéré par apposition d'une peinture blanche "tipex".

Le nombre de feuilles et ramifications développées depuis la bague est compté. Les feuilles sont comptées mortes lorsqu'elles sont jaunes et complètement flétries.

Les résultats sont exprimés de la manière suivante (Maître *et al.*, 1985):

$$NL_t = NL_{t-1} + A_t - D_t$$

où NL_t = nombre de feuilles vivantes au temps t ; A_t et D_t = nombre de feuilles apparues et disparues au temps t .

Les taux relatifs d'apparition de feuilles $a(t)$, de mortalité $d(t)$ et de croissance $r(t)$ peuvent alors être calculés :

$$a(t) = \frac{At}{NLt}$$

$$d(t) = \frac{Dt}{NLt}$$

$$r(t) = \frac{1}{NLt} \times \frac{DNLt}{Dt} = a(t) - d(t)$$

2.2. Caractéristiques morphologiques du trèfle

Les études morphologiques du trèfle en plein champ sont réalisées à partir de prélèvements de 2 cylindres de sol par parcelle, d'un diamètre de 12cm et de 20 cm de profondeur (fig 2.2). Après élimination de la terre nous séparons le trèfle du ray-grass pour déterminer les caractéristiques morphologiques du trèfle et compter le nombre de talles de ray-grass. Les mesures suivantes sont exprimées par m^2 :

- nombre de bourgeons axillaires et terminaux
- nombre et surface des feuilles développées
- longueur totale du stolon
- longueur des entre-noeuds de l'apex au 6ème noeud et pourcentage de noeuds enracinés
- nombre de racines



Figure 2.2: Prélèvement destructif en plein champ d'un cylindre de sol de 12cm sur 20cm, contenant le trèfle en association avec du ray-grass. Chaque espèce est ensuite séparée et les caractéristiques morphologiques du trèfle sont déterminées.

En conditions contrôlées, les mêmes mesures sont réalisées sur des plantes entières.

Au cours des lectures, le nombre de stolons nécrosés est enregistré de manière à exprimer le pourcentage de survie de ces stolons par rapport à la première lecture.

Les matières sèches de chaque organe sont ensuite déterminées en plaçant les échantillons à l'étuve pendant 48 heures à 80°C.

A partir de la matière sèche des stolons et de leur longueur, nous pouvons calculer la masse linéique du stolon (g.cm^{-1}).

Les fréquences de prélèvement des échantillons en plein champ et en conditions contrôlées seront détaillées pour chaque expérience dans les chapitres correspondants.

3. RELEVES METEOROLOGIQUES

Les données météorologiques des expérimentations en plein champ sont enregistrées à partir d'une station météorologique automatique, située sur le domaine de l'INRA-SAD de Mirecourt, à 500 m du site expérimental.

Les données suivantes sont retenues pour notre étude :

- température de l'air sous abri à 2 m: minimale et moyenne (°C)
- température minimale du sol à 10 cm de profondeur (°C)
- indice actinothermique à 10 cm (°C)
- vitesse du vent (m.s^{-1})
- rayonnement global (MJ.m^2)
- Pluviométrie (mm)

L'ensemble de ces données est relevé jour par jour par la station. Selon les besoins d'interprétation, nous avons utilisé les moyennes mensuelles de ces paramètres ou les moyennes par décade. La liste de tous les paramètres météorologiques et de leurs

abréviations utilisées figure à la fin du document dans la nomenclature et les abréviations.

L'indice actinothermique représente une température minimale mesurée la nuit, à la surface du couvert végétal. Sa définition repose sur le principe suivant : une plante reçoit, comme le sol, un excédent d'énergie par rayonnement pendant le jour, mais elle en perd du fait de la transpiration, si elle est alimentée en eau. Par une nuit claire, une plante se refroidit beaucoup par rayonnement et cette perte d'énergie, notoirement plus importante que d'éventuels gains par changements d'état de l'eau, risque de devenir un danger (Côme, 1992).

4. DETERMINATIONS DES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES

4.1. Prélèvements, stockage des échantillons

Les échantillons destinés aux analyses biochimiques sont immédiatement congelés par immersion dans l'azote liquide après le prélèvement. Cette précaution permet d'éviter des réactions enzymatiques qui pourraient modifier la nature des composés à doser.

En plein champ, des stolons, feuilles et racines sont prélevés au hasard dans les parcelles, rincés dans l'eau et immédiatement congelés. Le transport jusqu'au laboratoire se fait dans une glacière.

En conditions contrôlées, chaque organe prélevé est conservé de la même manière et stocké au congélateur à -18°C.

Les échantillons congelés sont lyophilisés pendant 48 heures, broyés puis conservés dans un dessiccateur à température ambiante.

4.2. Détermination des sucres solubles et de l'amidon

Les sucres solubles sont extraits à l'éthanol à 80% puis dosés colorimétriquement à la méthode à l'antrone (annexe 5) (Van Handel, 1968). Ils sont ensuite, pour certains échantillons analysés par CHLP (Beckman, système Gold) pour étudier leur répartition en fonction du froid. Les sucres solubles sont séparés à 80°C sur une colonne de plomb selon les deux principes ; partage par l'équilibre de Donnan et tamisage moléculaire. Un détecteur réfractométrique placé en sortie de colonne permet alors de doser chaque sucre. Les données sont immédiatement traitées à l'aide d'un logiciel Beckman Gold. L'amidon est extrait dans l'eau à partir du résidu d'extraction des sucres solubles. Il est ensuite hydrolysé par addition d'amyloglucosidase et dosé selon la méthode de Bergmeyer *et al.* (1974) (annexe 6).

4.3. Détermination des acides aminés

Les acides aminés sont extraits au méthanol à 80% puis purifiés par passage sur une résine cationique DOWEX H⁺ (annexe 7).

Rq/ Avant l'extraction des acides aminés, les échantillons lyophilisés doivent être conservés à -25°C, pour éviter toute activité protéasique.

La fraction aminée est dosée colorimétriquement par la méthode à la ninydrine de Yemm et Cooking (1955) (annexe 8).

4.4. Dosages du carbone et de l'azote total :

La teneur en azote total est déterminée par l'autoanalyseur carbone-azote Carlo Erba Na 1500 en chromatographie phase gazeuse. Après combustion de l'échantillon à 1030°C, les gaz CO₂ et N₂ produits sont séparés par une colonne chromatographique et détectés ensuite par catharométrie. Les résultats sont exprimés en pourcentage de carbone et

azote par rapport à la matière sèche introduite. Le principe du fonctionnement de l'autoanalyseur est détaillé en annexe 9.

5. CARACTERISATION DE L'ETAT HYDRIQUE DES PLANTES

L'état hydrique d'une plante est généralement déterminé par deux mesures, celle de la teneur en eau relative (TER) qui caractérise l'état quantitatif de l'hydratation des cellules et le potentiel hydrique qui caractérise l'état qualitatif de l'hydratation des cellules c'est à dire la force de rétention de l'eau à l'intérieur des cellules. Le potentiel hydrique d'une cellule est composé de deux potentiels : le potentiel osmotique et le potentiel de turgescence. La mesure de la TER et celle du potentiel hydrique sont complémentaires mais il n'est pas indispensable de disposer des deux pour caractériser l'état hydrique d'une plante ou d'un organe. Par contre, le potentiel osmotique est intéressant à considérer car il permet, en association avec la TER, de mettre en évidence le développement d'un ajustement osmotique. C'est pourquoi nous avons choisi dans cette étude de déterminer la teneur en eau relative et le potentiel osmotique des feuilles et stolons du trèfle blanc.

5.1. Teneur en eau relative

La détermination de la teneur en eau relative est réalisée sur des feuilles et des stolons frais selon la formule suivante :

$$TER(\%) = \frac{(MF - MS)}{(MFPT - MS)} \times 100$$

La masse fraîche (MF) est déterminée immédiatement après l'échantillonnage. La masse fraîche à pleine turgescence (MFPT) est obtenue par la pesée du même organe après immersion dans de l'eau distillée pendant 12 heures à 4°C. La masse sèche (MS) est obtenue après déshydratation à l'étuve à 80°C pendant 24h.

5.2. Potentiel osmotique

Le potentiel osmotique est une des composantes du potentiel hydrique d'une cellule ou d'un tissu végétal isolé, en absence de flux d'eau. C'est la mesure physique de la pression osmotique du cytosol dans lequel des ions et des molécules sont dissous.

Les mesures de potentiel osmotique sont réalisées sur des feuilles ou stolons placés dans des seringues de 1ml et congelés immédiatement après l'échantillonnage. La sève est recueillie par pression sur la seringue lors de la décongélation. L'osmolalité de la sève est déterminée grâce à un osmomètre hygrosopique à tension de vapeur (Wescor 5500). La sève recueillie est déposée dans la chambre étanche de l'osmomètre. Le plafond de cette chambre est muni d'un thermocouple qui est refroidi au contact de l'échantillon par effet Peltier. Des gouttelettes de condensation se forment à la surface de l'échantillon, la température va alors s'échauffer jusqu'à un point d'équilibre qui correspond au point de rosée. La différence entre la température de référence du thermocouple (37°C) et la température du point de rosée est proportionnelle à la tension de vapeur à la surface de l'échantillon et donc à sa concentration en osmoticum.

Le potentiel osmotique est ensuite calculé grâce à la formule suivante :

$$\Pi_0 (MPa) = R \times T \times C \times 10^{-6}$$

où R = constante des gaz parfaits = $8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, C est la concentration en osmoticum (en mmol.kg^{-1}) et T est la température de la chambre de mesure en degré Kelvin.

6. MESURE DES ECHANGES GAZEUX

6.1. Assimilation nette de CO₂

Les mesures sont réalisées grâce à un système portable de mesure de la photosynthèse (Portable Photosynthesis system). Cet appareil est constitué d'une chambre de mesure à circuit ouvert dans laquelle la température et l'humidité sont déterminées, d'un analyseur à infra-rouge qui fournit la concentration et le flux de CO₂, d'un microprocesseur qui gère le système et enregistre les données.

Les mesures sont réalisées sur deux folioles de la deuxième feuille adulte depuis l'apex. Le foliole non mesuré est repéré grâce à de la peinture blanche, on peut ensuite mesurer la surface exacte des folioles ayant servi à la détermination des échanges gazeux.

Les paramètres utilisés sont l'assimilation nette de CO₂ (A) exprimée en $\mu\text{moles de CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; et la conductance stomatique (Gs) exprimée en moles d'H₂O $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Le rapport A/Gs est ensuite calculé pour déterminer l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse. Le principe de fonctionnement du PPsystem est détaillé en annexe 10.

6.2. Fluorescence chlorophyllienne

La fluorescence chlorophyllienne provient essentiellement des molécules de chlorophylle a, associées au photosystème II (PSII) avec une faible participation du photosystème I (PSI) à une longueur d'onde supérieure à 700 nm. La fluorescence de la chlorophylle représente une fraction de l'énergie lumineuse collectée par les antennes collectrices du photosystème II, qui n'est pas convertie en énergie chimique par les chloroplastes ni transmise en chaleur par dissipation thermique.

Quand une feuille est illuminée à intensité constante, elle va fluorescer à un niveau constant. Si la feuille est maintenue à l'obscurité pendant plusieurs minutes, puis soudainement éclairée à intensité saturante ($700 \mu\text{moles de photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), la

fluorescence va rapidement passer d'un niveau faible (F_0) à un niveau maximal (F_m), en passant par un état intermédiaire puis va graduellement diminuer en passant par de nombreux états intermédiaires pour atteindre un niveau proche du point de départ (fig 2.3). Il est important de noter que l'intensité du signal de fluorescence sera proportionnelle à l'intensité d'illumination.

La différence entre la fluorescence maximale (F_m) obtenue quand tous les centres réactionnels du PS II sont fermés (donc à l'obscurité) et la fluorescence minimale (F_0) obtenue quand tous les centres réactionnels sont ouverts est appelée la fluorescence variable (F_v) ; $F_v = F_m - F_0$.

Le rapport F_v/F_m peut alors être calculé, il représente l'efficacité photochimique optimale du PSII, et est fortement corrélé au rendement quantique de la photosynthèse nette de feuilles intactes (Genty *et al.*, 1989).

La deuxième étape consiste à appliquer un flash de lumière blanche saturante (L_s) afin de mesurer la fluorescence maximale (F_m'). Ensuite, on place les plantes à la lumière et une lumière actinique blanche (L_a) ($3000 \mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) est allumée pour induire la cinétique de fluorescence. L'addition d'un flash saturant (L_s) à l'équilibre F' permet de mesurer la fluorescence maximale F_m' . Après extinction de la lumière actinique, le niveau de fluorescence minimale F_0' est déterminé. On calcule ensuite le rapport $\frac{\Delta F}{F' m}$. Ce rapport permet de déterminer le quenching de fluorescence, c'est à dire l'existence de phénomènes différents de la fluorescence au niveau du PSII.

La mesure de la fluorescence est non destructive et peut être totalement adaptée à des mesures périodiques sur les mêmes plantes au cours du temps. On utilise un fluorimètre modulé (P.A.M 2000., Walz, Allemagne) (annexe 11). Les impulsions de lumière ont une durée de 1ms, à une fréquence de 1,6 ou 100 kHz.

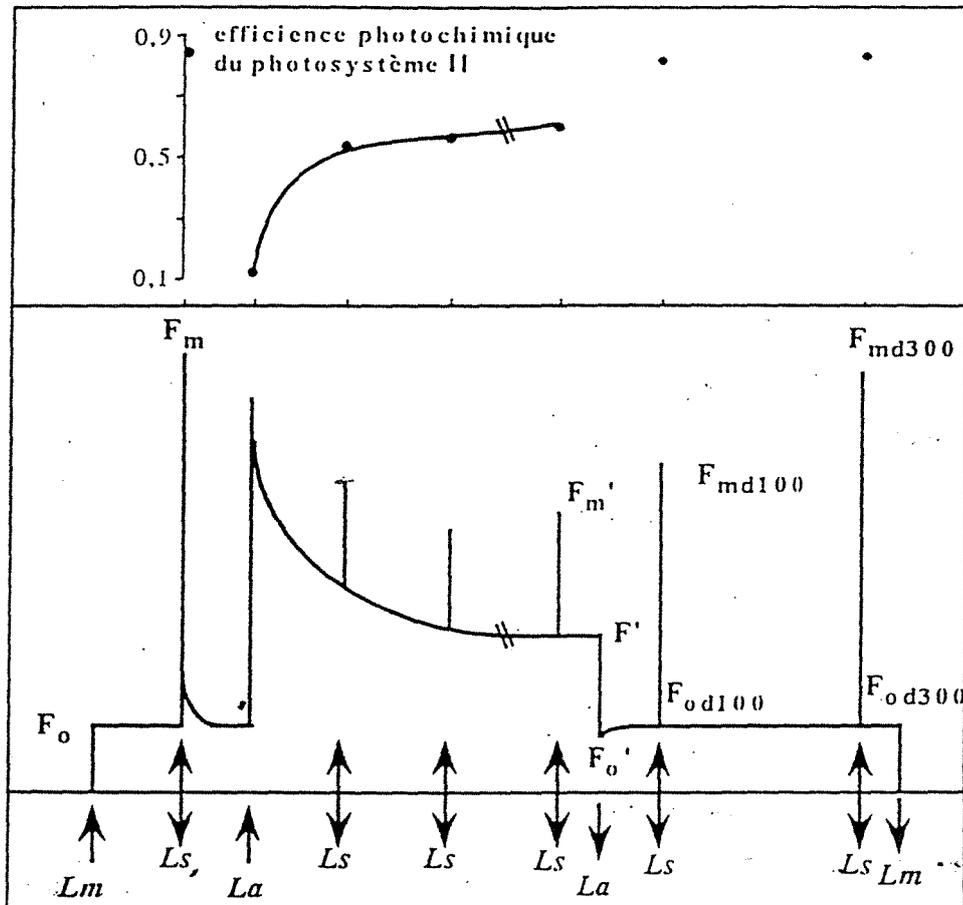


Figure 2.3. : Représentation schématique d'une cinétique d'induction de fluorescence. Une rondelle foliaire adaptée à l'obscurité est illuminée avec une lumière modulée de très faible intensité (L_m) afin de mesurer la fluorescence minimale (F_o). Puis un flash de lumière blanche saturante (L_s ; $0,7s$; $4000\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) est surimposé afin de mesurer la fluorescence maximale (F_m). Une lumière actinique blanche (L_a) est allumée pour induire la cinétique de fluorescence. L'addition d'un flash saturant (L_s) à l'équilibre (F') permet de mesurer la fluorescence maximale (F'_m). Après extinction de la lumière actinique, le niveau de fluorescence minimale $F'o$ est déterminé. Au bout de 100 puis 300 secondes d'obscurité, des flash saturants (L_s) sont effectués pour déterminer la fluorescence maximale (F_{md100} et F_{md300}) correspondant au niveau de fluorescence minimale $F'o d100$ et $F'o d300$. L'évolution de l'efficace photochimique du PSII au cours de la cinétique est représentée schématiquement dans la partie haute du graphique. (D'après Epron, 1993).

7. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont traitées par analyse de variance, en utilisant le logiciel SAS (SAS, Institute, Inc., 1987) et la procédure PROC GLM. Les moyennes sont comparées entre elles par le test de Bonferroni ou par le test de student à $p < 0,05$.

Des régressions linéaires sont calculées dans le chapitre III, utilisant la procédure PROC REG, avec l'option "Stepwise, forward selection". Chaque variable explicative est additionnée une à une au modèle, la valeur F du modèle intégrant cette variable est calculée. Si le modèle est significatif à $p < 0,5$, cette variable est incluse dans le modèle et rejetée dans le cas inverse.

Des analyses en composantes principales sont réalisées en utilisant le logiciel STAT-ITCF.

**CHAPITRE III. RELATIONS ENTRE LA
MORPHOGENESE, LA DYNAMIQUE DES
RESERVES ET LES PARAMETRES
CLIMATIQUES EN PLEIN CHAMP**

**CHAPITRE III. RELATIONS ENTRE LA MORPHOGENESE, LA
DYNAMIQUE DES RESERVES CARBONEES ET LES PARAMETRES
CLIMATIQUES EN PLEIN CHAMP.**

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE EN PLEIN CHAMP	P 70
2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	P 71
3. RESULTATS	P 74
3.1. Données météorologiques	
3.2. Données morphologiques et morphogénèse	
3.3. Evolution de la biomasse et différences variétales	
3.4. Rendement annuel et printanier	
3.5. Composés carbonés et azote total	
3.6. Relations entre la morphogénèse, les réserves et les paramètres climatiques	
4. DISCUSSION	P 104
5. CONCLUSION	P 109

1. OBJECTIFS DE L'ETUDE EN PLEIN CHAMP

La période hivernale en Lorraine est généralement très longue, (5 à 6 mois d'arrêt de croissance) et présente souvent des périodes de froid dont les températures minimales peuvent atteindre -15°C . La température moyenne des mois les plus froids (décembre, janvier et février) est de $1,5^{\circ}\text{C}$ (moyenne enregistrée sur 23 années). Les légumineuses et graminées qui couvrent les prairies permanentes sont alors exposées à des risques de mortalité pendant cette période. Des travaux réalisés dans les années 1980 au laboratoire ont déjà mis en évidence des pertes importantes de trèfle blanc entre l'automne et le printemps (-40 à -70% de la biomasse des stolons) (Guckert *et al.*, 1983). Cependant, peu de données nous renseignent sur la morphogénèse du trèfle blanc pendant l'hiver. De plus, aucune étude n'a encore précisé le rôle exact des paramètres climatiques dans cette activité ainsi que la relation existant entre les réserves accumulées chez le trèfle en automne et la tolérance aux conditions hivernales.

L'étude présentée ici est une synthèse des suivis de quatre saisons hivernales : (1991-1992) ; (1992-1993), (1993-1994) et (1994-1995) de la morphogénèse et de l'évolution des réserves carbonées du trèfle blanc cv. Huia. Les trois derniers hivers incluent une deuxième variété de trèfle, d'origine alpine (Suisse) et sélectionnée au Pays de Galles pour ses aptitudes à la résistance au froid et à une reprise printanière précoce ; la variété Aberherald.

Les objectifs de ce chapitre sont de :

- caractériser la morphogénèse hivernale et printanière du trèfle blanc ;
- suivre l'évolution des réserves carbonées des feuilles et des stolons pendant ces périodes ;
- mettre en évidence la nature des relations qui existent entre la morphogénèse, les réserves et les paramètres climatiques correspondant ;
- comparer le comportement de deux variétés : Huia et Aberherald pour identifier d'éventuelles différences dans la tolérance au froid.

2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La mise en place des parcelles a été détaillée en chapitre 2. Les suivis morphologiques non destructifs sont réalisés tous les dix jours sur les premières parcelles installées en 1991. Nous avons répété ces mesures pendant trois hivers 1991-1992; 1992-1993 et 1993-1994. Parallèlement à ces suivis, dont le principe a été détaillé en chapitre 2, nous avons prélevé des feuilles et des stolons afin de déterminer l'évolution des réserves carbonées. Les paramètres mesurés et déterminés sur ces parcelles sont les suivants :

- taux relatif d'émission de feuilles ;
- taux relatif de mortalité de feuilles ;
- bilan de croissance ;
- teneur en sucres solubles des feuilles et stolons ;
- teneur en amidon des feuilles et stolons ;
- pourcentage de mortalité des stolons ;

Lors du dernier hiver, des mesures supplémentaires ont été réalisées à partir de 10 stolons prélevés au hasard dans les parcelles : longueur des entre-noeuds (6 entre-noeuds depuis l'apex), nombre de noeuds ramifiés, nombre de noeuds enracinés.

Des suivis morphologiques destructifs ont été réalisés sur les parcelles semées en 1992, incluant les deux variétés Huia et Aberherald. Ces observations, associées à des déterminations de réserves carbonées (sucres solubles et amidon) dans les stolons ont été réalisées une fois par mois à partir du mois d'octobre jusqu'au mois d'avril et répétées pendant les deux hivers : 1993-1994 et 1994-1995. L'année 1992 correspondant à l'installation de la prairie, nous n'avons pas pris en compte l'hiver 1992-1993. Les paramètres déterminés sont les suivants et sont exprimés par surface de sol prélevé :

- nombre de feuilles.m⁻² ;
- nombre de bourgeons (axillaires et terminaux).m⁻² ;
- surface individuelle des feuilles (cm².feuille⁻¹) ;

- nombre de feuilles par bourgeons terminaux ;
- matière sèche des stolons (g.m^{-2}) ;
- matière sèche des feuilles (g.m^{-2}) ;
- matière sèche des bourgeons (g.m^{-2}) ;
- masse linéique du stolon (mg.cm^{-1}) ;

Afin d'expliquer les relations entre les paramètres morphologiques, les réserves et les données météorologiques, les résultats des trois hivers consécutifs ont été regroupés. L'étude des relations entre ces paramètres est abordée de trois manières complémentaires. Nous avons d'abord réalisé des analyses en composantes principales (ACP), afin de caractériser globalement l'évolution du trèfle pendant l'hiver et de regrouper les paramètres corrélés entre eux. La deuxième étape est une analyse graphique des nuages de points entre les variables sélectionnées d'après l'ACP. Elle permet alors de visualiser le type de relation qui existe entre les paramètres. La troisième étape est une analyse statistique des relations entre les paramètres ; nous avons réalisé des régressions linéaires afin de hiérarchiser l'importance de chaque facteur dans la variation d'un paramètre considéré.

Les données météorologiques sont considérées de deux façons : les valeurs du jour de la mesure et la moyenne des 10 jours précédant la mesure morphologique. D'un point de vue biologique, il est évident que les données moyennes des 10 jours précédant la mesure (10J) auront un effet sur la morphogénèse du trèfle blanc plus significatif que la seule donnée du jour même de prélèvement ou de mesure (jour J). Mais certaines variations brusques de température entraînent des réactions métaboliques rapides, il est donc également intéressant de considérer la température du jour de mesure. Dans un premier temps, nous analyserons les effets des variables climatiques en considérant les deux types de données puis, pour affiner les résultats attendus avec les régressions linéaires, nous ne conserverons que les données des 10 jours précédant la mesure.

	NOV	DEC	JAN	FEV	MAR	AVR	HIVER
<u>hiver 1991-1992</u>							
temp moy air (°C)	1.9	4.6	3.3	3.4	8.8	7.7	4.9
nombre de jours de gel	15.0	6.0	12.0	16.0	2.0	4.0	55
temp sol -10cm (°C)	6.1	1.8	1.9	2.1	5.4	8.2	4.2
indice actinothermique (°C)	0.2	-3.6	-3.7	-2.6	-0.1	1.2	-1.4
vent (m/s)	2.6	2.0	2.2	2.2	2.3	2.3	2.2
rayon. global (MJ/m ²)	99	104	120	205	287	182	166
precipitations (mm)	86	61	24	37	82	53	343
<u>hiver 1992-1993</u>							
temp moy air (°C)	7.0	0.8	0.1	3.2	6.2	8.5	4.3
nombre de jours de gel	3.0	7.0	19.0	12.0	14.0	8.0	63
temp sol -10cm (°C)	7.4	4.7	3.3	2.7	4.0	9.4	5.2
indice actinothermique (°C)	2.3	-1.3	-0.4	-3.4	-3.4	2.5	-0.6
vent (m/s)	2.3	2.2	3.0	1.6	1.9	2.2	2.2
rayon. global (MJ/m ²)	105	84	101	144	218	482	189
precipitations (mm)	127	40	66	24	10	32	299
<u>hiver 1993-1994</u>							
temp moy air (°C)	-2.8	4.6	3.3	3.4	10.3	7.7	4.4
nombre de jours de gel	15.0	6.0	12.0	15.0	2.0	4.0	54
temp sol -10cm (°C)	1.4	4.1	3.7	3.2	7.8	8.4	4.7
indice actinothermique (°C)	-7.2	1.5	-1.1	-1.6	3.2	0.9	-0.7
vent (m/s)	1.8	3.9	2.8	2.2	2.8	2.4	2.6
rayon. global (MJ/m ²)	121	65	95	158	301	421	193
precipitations (mm)	20	209	126	79	61	86	581
<u>hiver 1994-1995</u>							
temp moy air (°C)	8,7	4,8	2,3	6,3	4,6	8,7	5,9
nombre de jours de gel	1,0	9,0	14,0	5,0	15,0	3,0	47
temp sol -10cm (°C)	9,9	6,2	4,0	5,9	5,0	8,8	6,6
indice actinothermique(°C)	4,0	1,1	-2,3	1,6	-2,0	2,8	0,9
vent (m/s)	1,4	2,9	2,4	2,8	2,9	1,9	2,4
rayon. global (MJ/m ²)	97,8	77,3	107,3	161,1	350,3	374,4	195
precipitations (mm)	22,0	130,5	180,0	90,0	121,5	61,0	605
<u>hiver moyen de 1973 à 1991</u>							
temp moy air (°C)	4.5	2.1	0.8	1.5	5.0	7.3	3.5
temp sol -10cm (°C)	5.1	1.6	0.7	0.7	3.1	6.3	2.9
indice actinothermique (°C)	-0.3	-2.3	-2.4	-3.1	-0.7	-0.4	-1.5
vent (m/s)	1.7	1.9	2.1	1.8	2.1	1.8	1.9
rayon. global (MJ/m ²)	113	75	86	155	276	426	188
precipitations (mm)	89	31	79	63	69	59	390

Tableau 3.1: Données météorologiques moyennes mensuelles des 4 hivers : 1991-1992; 1992-1993; 1993-1994 et 1994-1995 et comparaison à la moyenne observée sur 23 ans à Mirecourt.

Le but de cette analyse n'étant pas de modéliser la morphogénèse du trèfle en période hivernale, nous utiliserons des méthodes simples et relativement faciles à mettre en oeuvre. Pour le choix des paramètres inclus dans ces analyses, nous avons considéré les données météorologiques généralement citées dans la littérature (températures, rayonnement, pluviométrie). Les paramètres morphologiques choisis pour les études de relations sont les taux d'apparition et de mortalité des feuilles et le bilan de croissance.

Ces données sont obtenues pendant trois années, avec des fréquences plus importantes que pour les données de biomasse, elles permettent donc d'obtenir des modèles significatifs du fait de leur nombre important

3. RESULTATS

3.1. Données météorologiques

Pendant les quatre hivers de l'étude, les valeurs de différents paramètres météorologiques sont supérieures aux moyennes enregistrées les 23 dernières années, excepté pour le rayonnement global (tab 3.1). Les mois les plus froids sont décembre, janvier et février avec une exception en novembre 1993 où la température minimale a atteint -7°C . Il est important de constater que la température minimale du sol à 10 cm de profondeur n'atteint jamais des valeurs négatives. Par contre, l'indice actinothermique qui concerne directement le couvert végétal atteint régulièrement des températures inférieures à 0°C , surtout lors des mois les plus froids. L'hiver 1991-1992 est le plus froid avec les températures minimales les plus basses (fig 3.1.) et la plus faible somme des températures comparée aux trois autres hivers. Par contre, l'hiver 1994-1995 est le plus doux avec le plus petit nombre de jours avec gel et une température moyenne du mois de novembre au mois de mars plus élevée. La somme des températures moyennes au-dessus de 0°C est de 802° jour, 1000° jour, 958° jour et 1080° jour pour les quatre années respectivement.

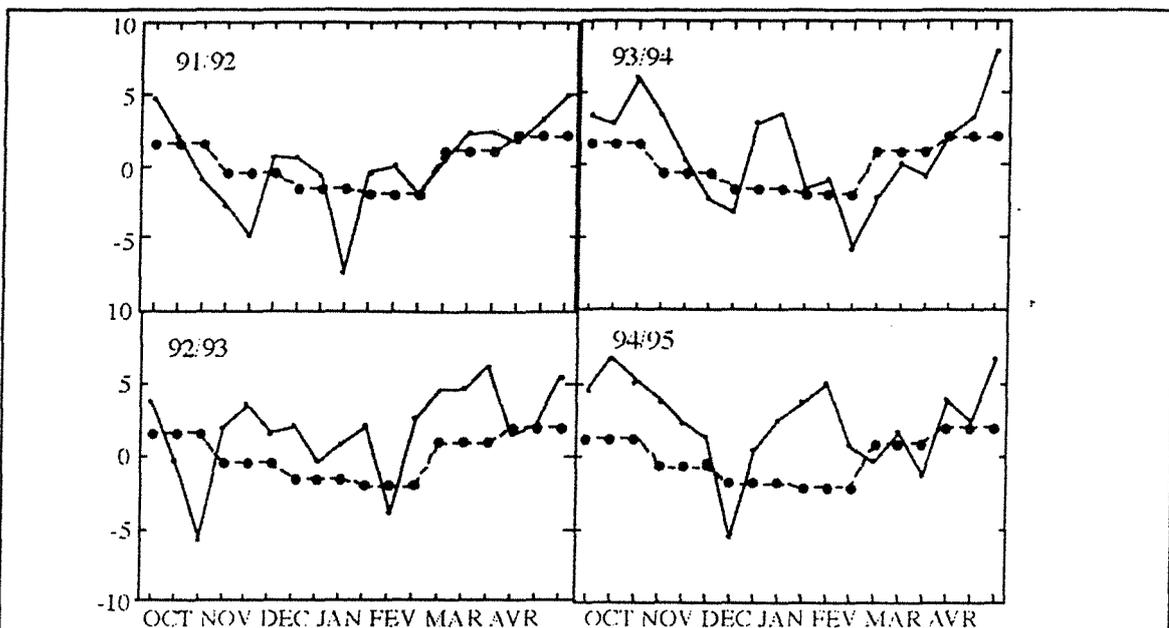


Figure 3.1 : Températures minimales (moyenne de dix jours) pendant les 4 hivers 91/92 , 92/93, 93/94 et 94/95 —●— et comparaison avec les températures minimales de 1973 à 1991 : ---●---

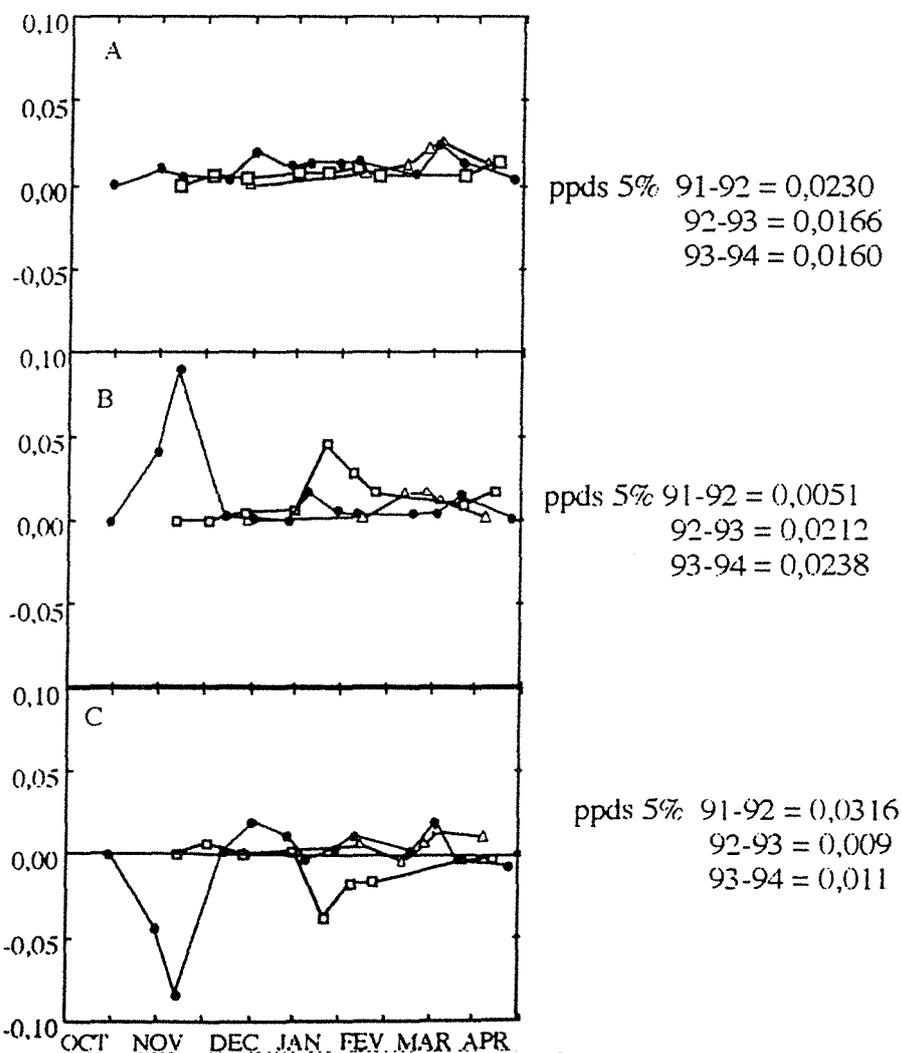


Figure 3.2 : Taux de croissance des feuilles du trèfle blanc en plein champ, (A); taux d'apparition (B) taux de mortalité, (C) : bilan de croissance pour les trois hivers Δ 1991-1992 , \square 1992-1993 et \bullet 1993-1994 . Les plus petites différences significatives pour chaque date sont données au seuil de 5% selon le test de Bonferroni.

La température commence à nouveau à s'élever à partir du mois de mars et le printemps 1994 est le plus chaud. Le dernier printemps montre les températures les plus froides en mars (4,6°C en moyenne et 15 jours de gel). Le rayonnement global est fortement réduit pendant l'hiver, les mois les plus faibles en intensité lumineuse sont les mois de novembre, décembre et janvier et le rayonnement s'intensifie à nouveau dès le mois de mars.

L'hiver le plus doux (1994-1995) est aussi le plus humide, un total de 605 mm de pluie est enregistré, ce qui représente plus des 2/3 de la quantité annuelle moyenne de pluie dans cette région (850 mm). Pendant les trois hivers, aucune couverture de neige durable (plus de 2 jours de suite) n'a été observée.

3.2. Morphogénèse

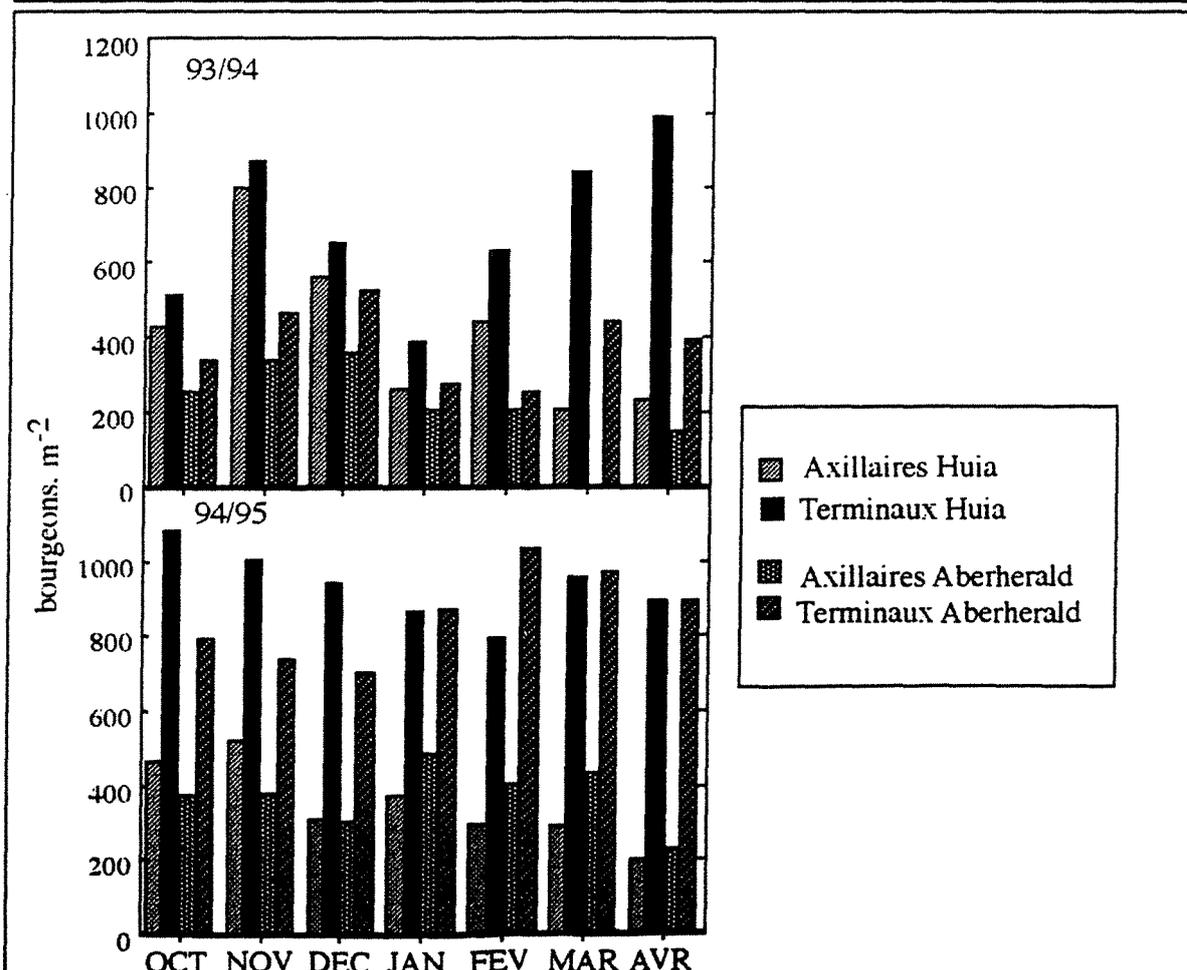
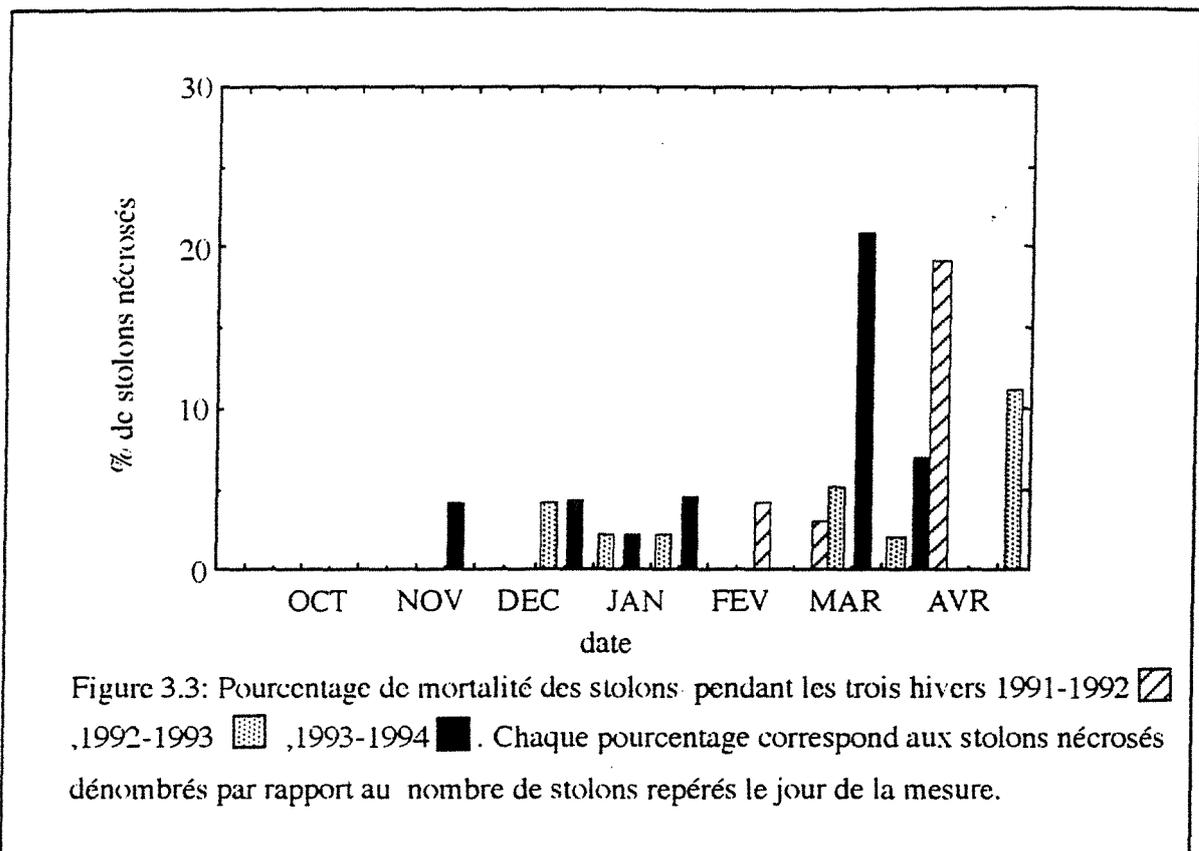
3.2.1. Taux de croissance

On compte en moyenne 1 feuille morte tous les 95, 75 et 66 jours lors des hivers 91-92, 92-93 et 93-94 respectivement. La mortalité des feuilles est élevée en novembre 1993, en raison de la période de froid très précoce (fig 3.2 B). Pendant les deux autres hivers, la mortalité des feuilles est toujours élevée lors des périodes les plus froides (janvier 1993 et février 1992). Pendant les trois hivers, on observe cependant une production de nouvelles feuilles, à l'apex des stolons (fig 3.2 A). Le taux moyen d'apparition des feuilles est de 1 feuille nouvelle tous les 61, 140 et 90 jours en 91-92, 92-93 et 93-94 respectivement. La plus importante production de feuilles est observée en 1993-1994, en dehors de la période froide du mois de novembre. En 91-92 et 93-94, le taux d'apparition des feuilles augmente en mars mais diminue en avril. En 1993, la repousse ne s'observe qu'à partir du mois d'avril. Le bilan entre la production de feuilles et la mortalité de feuilles évolue entre des valeurs positives et négatives (fig 3.2 C). Ce bilan est fortement négatif en novembre 1993 et lors des autres périodes de froid (entre janvier et février).

Le nombre moyen de feuilles vivantes et complètement développées par axe étudié est de 1,6 pendant tout l'hiver (de novembre à mars).

3.2.2. Survie des stolons

Quelle que soit l'année étudiée, la plus forte mortalité des stolons est observée au printemps (fig 3.3). Cette mortalité se caractérise par une nécrose de l'apex du stolon, 24%, 34% et 22% des parties apicales des stolons respectivement présentes en octobre 91, 92 et 93 ont disparu au printemps.



La longueur moyenne des nouveaux noeuds émis diminue pendant l'hiver (tab 3.2). Au printemps, les noeuds apicaux s'allongent à nouveau. Le pourcentage de noeuds ramifiés diminue fortement au printemps. Le pourcentage de noeuds enracinés est très faible au milieu de l'hiver (février), pour les trois premiers noeuds.

dates	E.N. 1			E.N. 2			E.N. 3			E.N. 4			E.N. 5		
	L (cm)	Enr.	R	L (cm)	Enr.	R	L (cm)	Enr.	R	L (cm)	Enr.	R	L (cm)	Enr.	R
18 oct	nd	0	0	1.2	0	0	1.8	90	10	1.9	81	60	2	90	60
20 dec	nd	0	0	0.4	12	0	1.3	100	0	1.8	100	25	2.2	100	25
28 fev	nd	0	0	0.1	0	0	0.3	57	14	0.8	100	42	1.4	100	71
21 mar	nd	0	0	0.1	90	10	0.2	100	30	0.6	100	40	0.9	100	40

Tableau 3.2 : Longueur des entre-noeuds (L), de l'apex (EN 1) à la base du stolon (EN 5), pourcentage de noeuds enracinés (Enr) et de noeuds ramifiés (R) des stolons en 1993-1994.

3.2.3. Développement du trèfle, du ray grass et caractéristiques variétales

Le nombre de talles de ray-grass augmente progressivement pendant tout l'hiver (tab 3.3). En 93/94, Huia semblait plus agressif (ns) qu' Aberherald alors qu'en 94/95, on observe l'inverse.

année	Cultivar	Oct	Nov	Dec	Jan	Fev	Mar	Avr	date
<i>Nombre de talles.m⁻²</i>									
1993/1994									
	Huia	791	635	922	1296	1265	1326	1517	
	Aberherald	1231	736	1324	1351	1167	1758	1430	
	<i>Effet variétal</i>	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	*
1994/1995									
	Huia	1072	1082	1277	1622	1296	2062	2001	
	Aberherald	758	650	1229	1078	1371	1176	1852	
	<i>Effet variétal</i>	ns	**						

Tableau 3.3. Développement du ray-grass (cv. Préférence) en association avec Huia ou Aberherald pendant l'hiver. Les différences entre variétés et l'effet date sont significatifs à $p < 0,001$ *** ; à $p < 0,01$ ** et à $p < 0,05$ * ou non significatifs (ns) selon le test de Bonferroni.

Au début de l'hiver, le nombre de bourgeons apicaux augmente, jusqu'en décembre, ensuite, il diminue progressivement jusqu'au printemps alors que le nombre de bourgeons terminaux augmente (fig 3.4). Il n'existe aucune différence variétale, quel que soit l'hiver considéré.

3.3. Evolution de la biomasse et différences variétales

La matière sèche des feuilles diminue à partir du mois novembre pour atteindre une valeur minimale en janvier ou février (tab 3.4).

		Oct	Nov	Dec	Jan	Fev	Mar	Avr	<i>date</i>
Matière sèche des feuilles (g.m ⁻²)									
93/94									
	Huia	24	57	34	32	29	71	24	
	Aberherald	17	39	44	20	16	56	16	
	<i>Effet variété</i>	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	***
94/95									
	Huia	11	13	7	6	7	11	19	
	Aberherald	12	11	9	8	9	14	24	
	<i>Effet variété</i>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	***
Matière sèche des stolons (g.m ⁻²)									
93/94									
	Huia	35	40	39	27	22	25	37	
	Aberherald	36	28	35	15	15	16	33	
	<i>Effet variété</i>	ns							
94/95									
	Huia	38	34	36	34	20	35	35	
	Aberherald	60	45	44	46	47	50	45	
	<i>Effet variété</i>	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns

Tableau 3.4. Biomasse des feuilles et des stolons de trèfle blanc variété Huia et Aberherald. Les différences entre les deux variétés et l'effet date sont significatifs à $p < 0,001$: *** ; à $p < 0,01$ ** ; à $p < 0,05$ * et non significatifs : (ns). (ND : non déterminé).

La reprise de biomasse foliaire s'observe à partir du mois de mars. Les biomasses foliaires du dernier hiver sont les plus faibles. Il existe très peu de différence variétale entre Huia et

Aberherald. En novembre 1993, Huia présente une biomasse plus élevée qu'Aberherald, par contre, en avril 1995, l'inverse se produit.

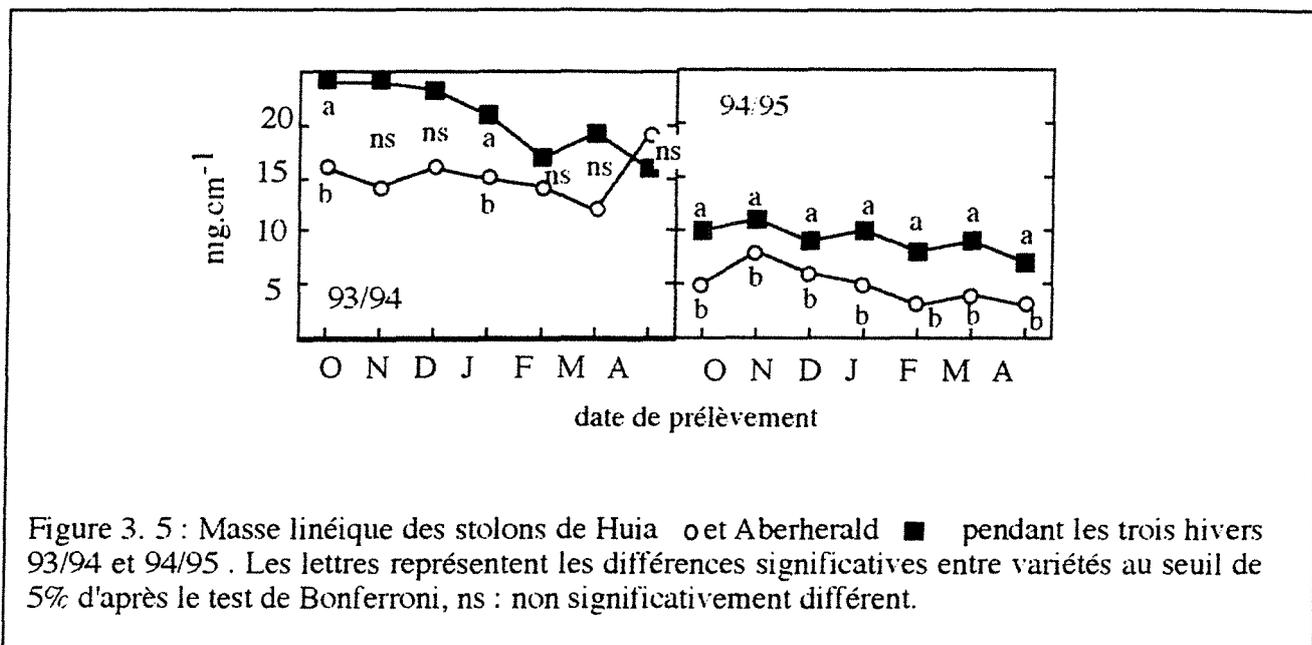


Figure 3. 5 : Masse linéique des stolons de Huia ○ et Aberherald ■ pendant les trois hivers 93/94 et 94/95 . Les lettres représentent les différences significatives entre variétés au seuil de 5% d'après le test de Bonferroni, ns : non significativement différent.

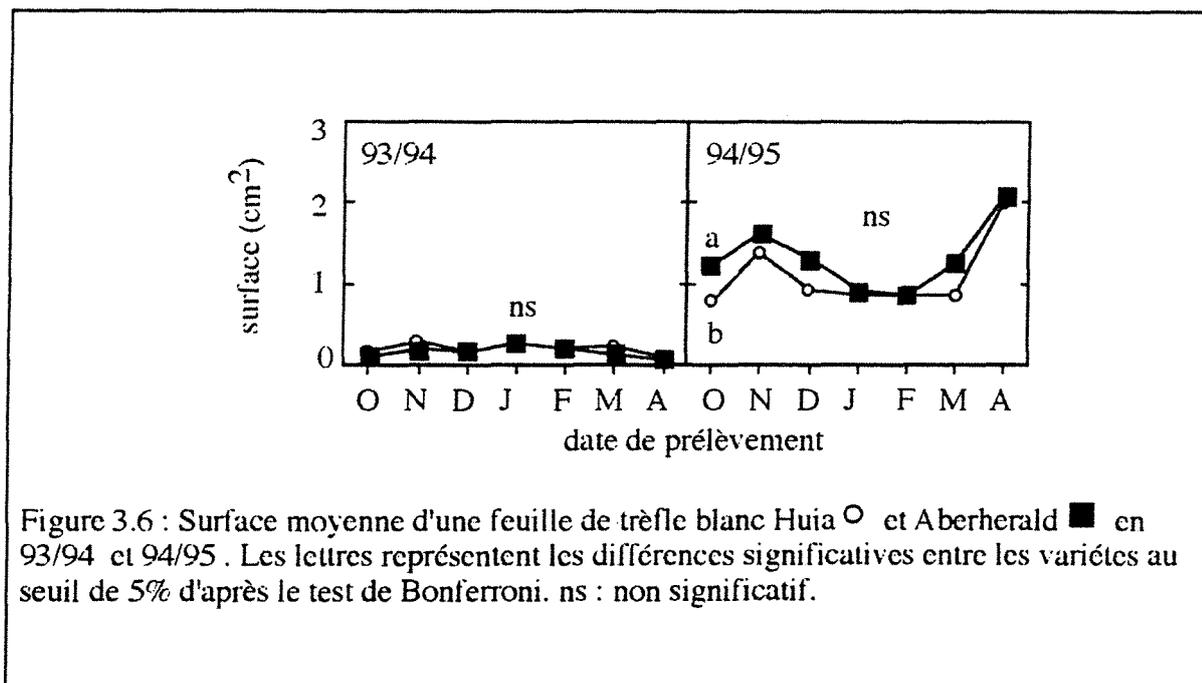


Figure 3.6 : Surface moyenne d'une feuille de trèfle blanc Huia ○ et Aberherald ■ en 93/94 et 94/95 . Les lettres représentent les différences significatives entre les variétés au seuil de 5% d'après le test de Bonferroni. ns : non significatif.

La matière sèche des stolons a tendance à diminuer au cours de l'hiver à partir du mois de janvier. Les différences variétales n'apparaissent qu'au dernier hiver (94-95) où, en novembre et février, Aberherald a plus de stolons que Huia.

La masse linéique du stolon évolue très peu pendant l'hiver : 20 à 25 mg.cm⁻¹ en 93/94 et environ 15 mg.cm⁻¹ en 94-95 (fig 3.5). Lors du dernier hiver, Aberherald a des stolons plus épais que ceux de Huia.

La surface moyenne d'une feuille est réduite pendant les mois les plus froids de l'hiver puis elle remonte à partir du mois de mars (fig 3.6). Il n'existe pas de différence significative entre les deux variétés.

3.4. Rendements printaniers et annuels

Les rendements printaniers de Huia sont toujours supérieurs à ceux de Aberherald sauf en 1995 (tab 3.5). La première coupe des parcelles de la deuxième expérimentation montre que le trèfle s'est très peu développé, reflétant une installation très lente, en particulier pour le cultivar Aberherald.

Années	Huia (1ère exp)		Huia (2ème exp)		Aberherald(2ème exp)	
	t.ha ⁻¹	%	t.ha ⁻¹	%	t.ha ⁻¹	%
22 mai 1992	2,2	42	nd		nd	
18 mai 1993	1,5	39	0,53	22	0,58	9,4
9 mai 1994	2,1	53	2,08	67	1,370	49
12 mai 1995			0,97	31	1,37	44

Tableau 3.5: Rendement (t.ha⁻¹) en trèfle et pourcentage de trèfle lors de la première coupe des parcelles de la première expérimentation et des parcelles de la deuxième expérimentation destinée à la comparaison entre les deux variétés Huia et Aberherald.

Les rendements annuels n'ont été calculés que pour les années 1993 et 1994 (tab 3.6). La troisième année d'exploitation de l'association (1994) est la plus productive.

	Trèfle	Total association	% de trèfle
1992-1993	6,2	16	44,5
1993-1994	6,58	12	52

Tableau 3.6. Rendements annuels (t.ha-1) du trèfle blanc Huia dans la première expérimentation et de l'association (trèfle + ray-grass) et pourcentage de trèfle blanc dans l'association.

3.5. Composés carbonés et azote total

3.5.1. Amidon et sucres solubles

Les premiers résultats concernant les réserves carbonées sont issus de la première expérimentation où les prélèvements de feuilles et stolons ont été réalisés tous les 10 jours sur la variété Huia. Seules les années 1992-1993 et 1993-1994 ont été prises en compte.

La teneur en amidon des stolons est élevée en automne, quelles que soient les années ($> 100 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (fig 3.7 A). Cette teneur diminue après les périodes de froid : janvier 1993 et novembre 1993. Après ces périodes de froid, la teneur en amidon des stolons atteint une valeur minimale jusqu'au mois de mars ($< 50 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) puis commence à augmenter en avril. La teneur en amidon des feuilles est plus faible que celle des stolons tout au long de l'hiver (de 20 à $80 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$). Elle diminue en 92-93 pour atteindre un minimum en janvier, puis augmente ensuite en février (fig 3.7 B). En 93-94, la quantité d'amidon dans les feuilles est très faible dès le départ de l'hiver mais elle augmente au printemps. Quel que soit l'hiver considéré, la teneur en sucres solubles des stolons est très variable pendant tout l'hiver (de 40 à $200 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$) (fig 3.7 C). Après chaque période de froid, la quantité de sucres solubles augmente puis diminue lorsque les températures se réchauffent. En 1993, la teneur en sucres diminue en mars mais réaugmente en avril.

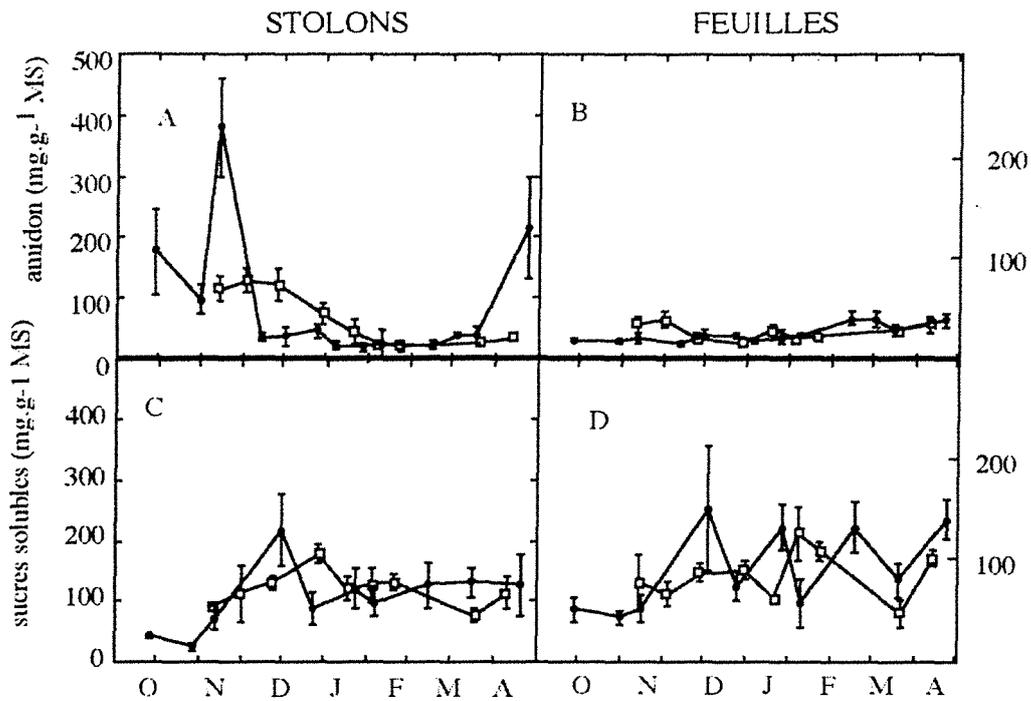


Figure 3.7 : Evolution des réserves carbonées de Huia en 1992-1993 (symboles ouverts) et en 1993-1994 (symboles fermés). A: Amidon dans les stolons, B: amidon dans les feuilles, C: sucres solubles dans stolons et D: sucres solubles des feuilles. Les barres verticales représentent les écart types.

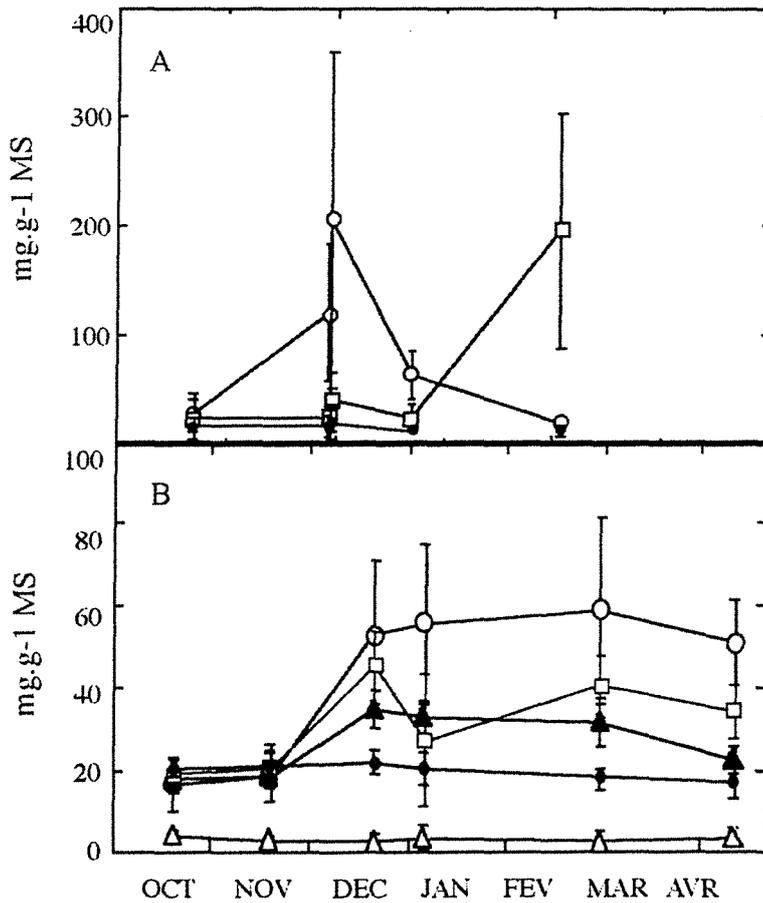


Figure 3.8 : Composition en sucres solubles des échantillons de stolons récoltés en plein champ pendant les hivers 1992/1993 (A) et 1993/1994 (B).

La teneur en sucres des feuilles est elle aussi très fluctuante (fig 3.7 D) et les quantités maximales sont également observées pendant les périodes froides (de 180 à 200 mg.g⁻¹ MS).

3.5.2. Analyse qualitative des sucres solubles

Dans les stolons, le sucre majeur rencontré est le saccharose (fig 3.8 A et B). Au cours des deux hivers considérés, on observe un pic de saccharose lors des périodes froides de décembre à janvier. Le fructose, le glucose et du pinitol sont également détectés. Il est important de constater que l'évolution des sucres solubles analysés par CLHP (mono et disaccharides) suit les mêmes fluctuations que les sucres totaux détectés par colorimétrie.

3.5.3. Caractéristiques variétales

Les deux cultivars ne présentent aucune différence dans les teneurs en amidon ou en sucres solubles de leur stolons (fig 3.9).

Par contre, lorsque l'on calcule la quantité d'amidon par unité de longueur, il apparait que la variété Aberherald possède plus d'amidon que Huia pour une même longueur de stolon (fig 3.10).

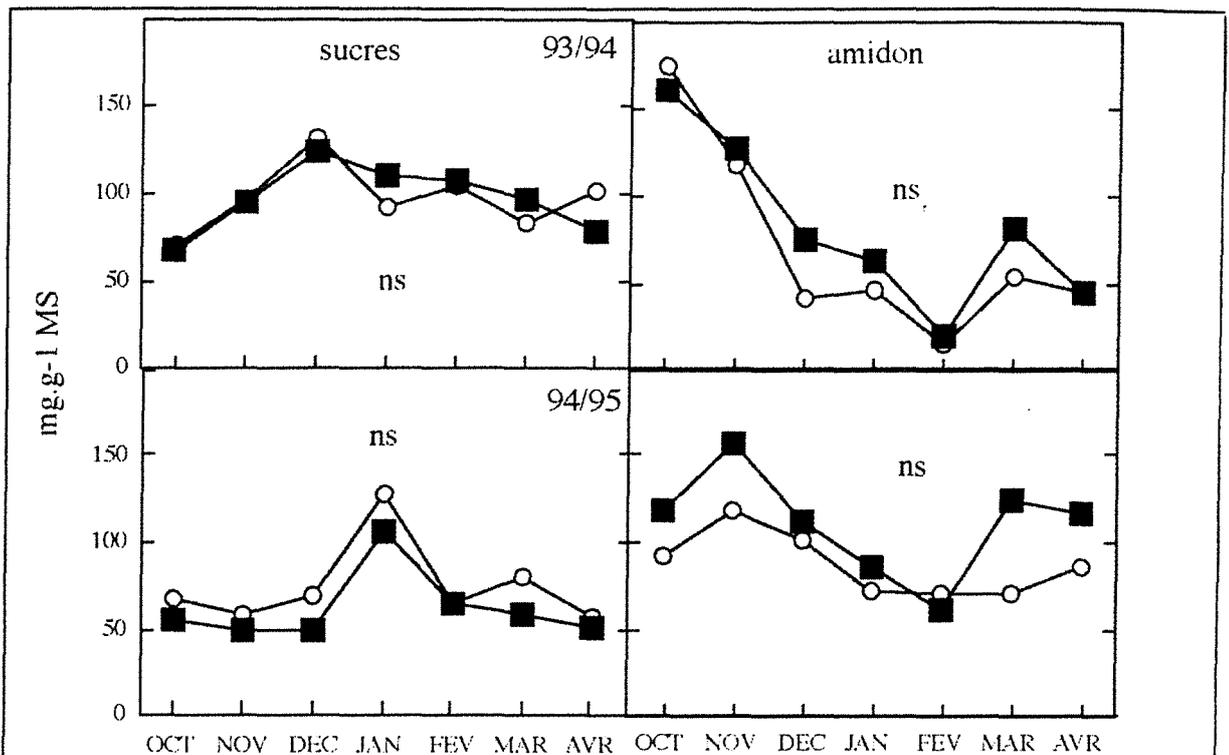


Figure 3.9. Evolution des teneurs en sucres et en amidon des stolons de Huia \circ et de Aberherald \blacksquare en plein champ pendant les hivers 93-94 et 94-95. Les lettres représentent les différences significatives entre les variétés au seuil de 5% d'après le test de Bonferroni. ns: non significatif.

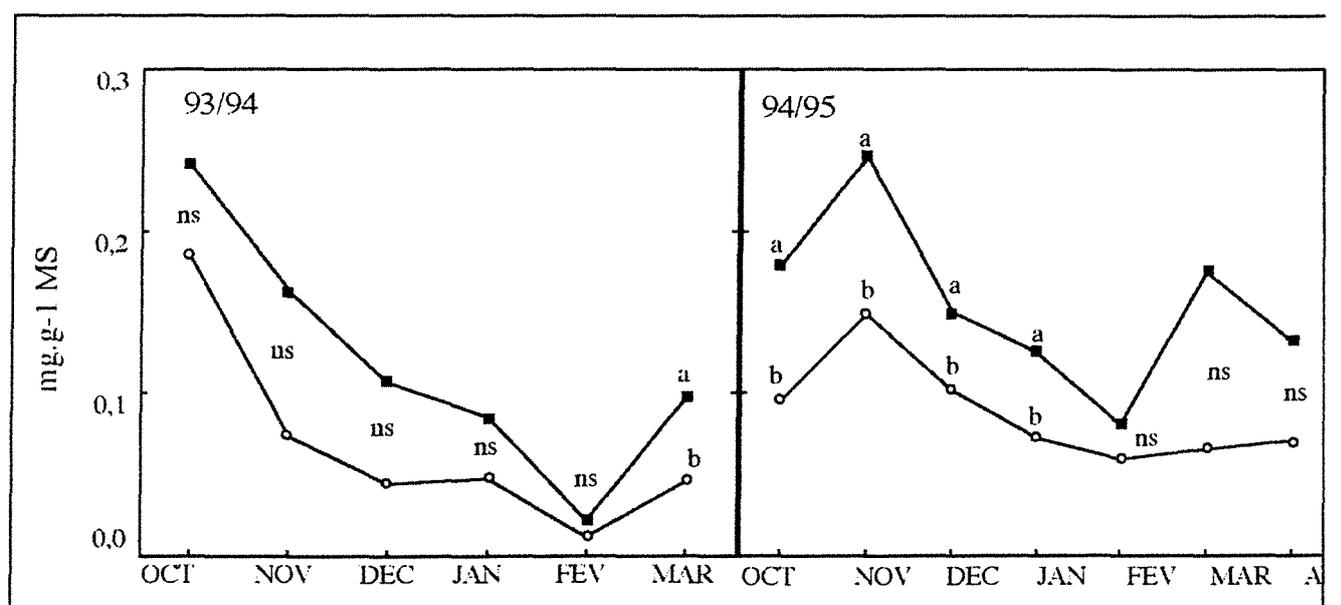


Figure 3.10. Teneur en amidon des stolons par unité de longueur de stolon chez Huia \circ et Aberherald \blacksquare en hiver 93-94 et 94-95. Les lettres représentent les différences significatives entre les variétés au seuil de 5% d'après le test de Bonferroni. ns = non significatif.

3.5.4. Azote total des feuilles et des stolons de Huia

La teneur en azote total des stolons augmente d'octobre à décembre 92 et jusqu'en février en 94. Ensuite, cette teneur diminue jusqu'à la fin de l'hiver. La teneur en azote total des feuilles diminue pendant les périodes froides.

	NOV	FEV	AVR	<i>effet date</i>
1992-1993				
azote feuilles (%)	3,72	4,94	4,34	***
azote stolons (%)	2,37	2,97	2,32	ns
1993-1994				
azote feuilles (%)	3,39	4,47	4,31	***
azote stolons (%)	3,15	2,68	1,87	***

Tableau 3.7. Teneurs en azote total des feuilles et des stolons de Huia au début, au milieu et à la fin de l'hiver. L'effet date est significatif à $p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** et $p < 0,05$: *, ns : non significatif.

3.6. Relations entre la morphogénèse, les réserves et les paramètres climatiques

Nous avons cherché les relations entre la morphogénèse, les réserves et les paramètres climatiques uniquement pour la variété Huia. En effet, nous disposons de plus de données avec cette variété étant donné que nous avons réalisé plusieurs prélèvements par mois. De plus, sachant qu'il n'existe que très peu de différences entre les deux variétés, "il n'est pas nécessaire" d'étudier les relations pour les deux variétés. La première étape de l'analyse concerne deux analyses en composantes principales (ACP). La première rassemble les résultats d'activité morphogénétique (taux d'apparition des feuilles, taux de mortalité et bilan de croissance) des trois hivers en variables principales et les données météorologiques correspondantes en variables supplémentaires. Le temps (date de prélèvement est inclus dans les variables principales). Les deux axes 1 et 2 représentent 60% de la variation du nuage de points. Trois groupes peuvent être identifiés d'après cette analyse (fig 3.11):

- les variables corrélées entre elles et associées à l'axe 1 horizontal : le taux de mortalité des feuilles et la température moyenne, en signe opposé ;
- les variables corrélées entre elles et associées à l'axe 2 vertical : le taux d'apparition des feuilles, la date de prélèvement et le rayonnement global, ces variables évoluent dans le même sens ;
- les variables faiblement corrélées à la morphogénèse ; ce sont la majorité des paramètres climatiques.

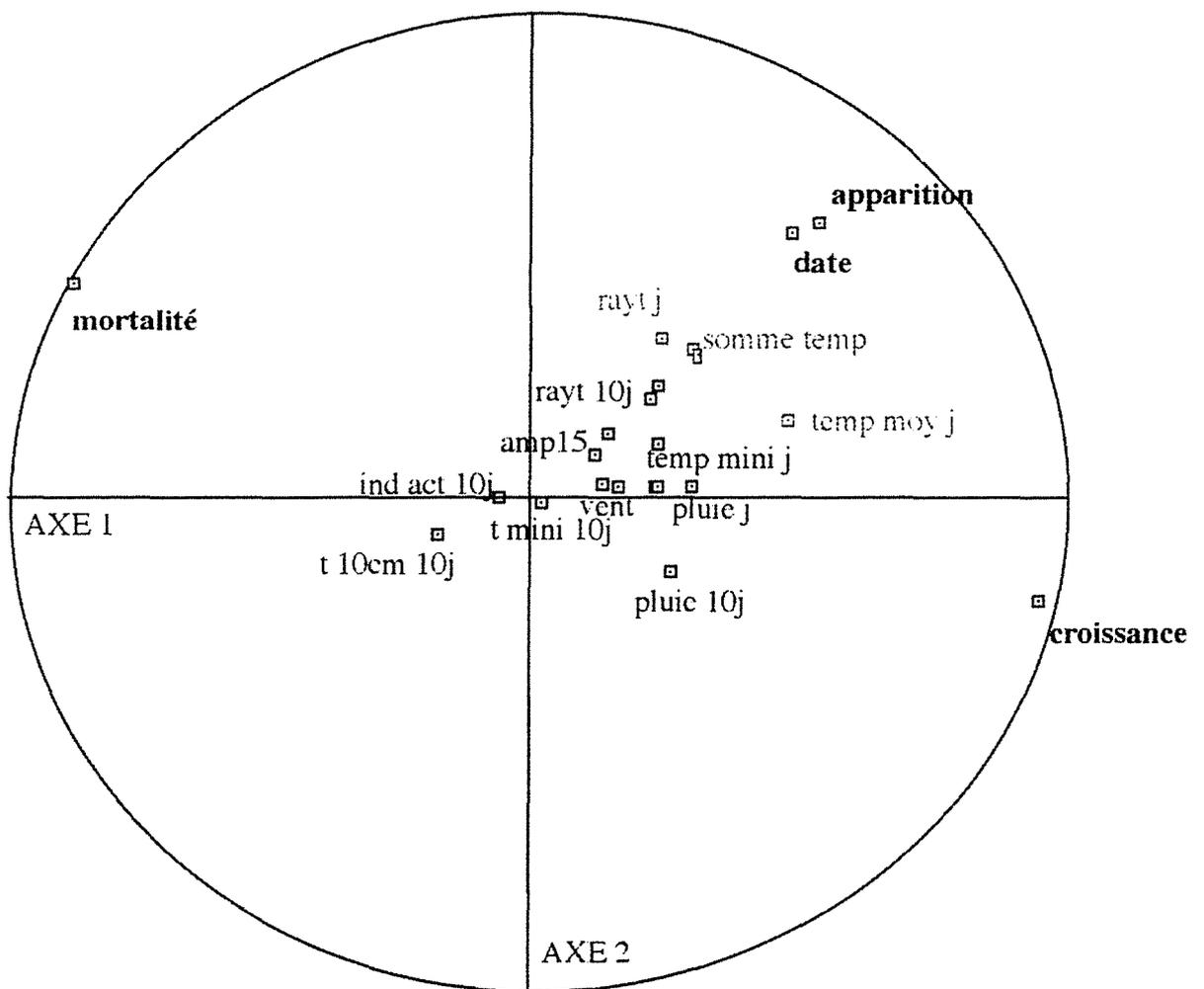


Figure 3.11 : Cercle des corrélations entre la morphogénèse et les données météorologiques pendant les trois hivers. La signification des variables est donnée en liste des abréviations à la fin du document

Peu de paramètres climatiques semblent directement reliés au taux d'apparition des feuilles, à leur mortalité ou encore au bilan de croissance (fig 3.11).

La deuxième ACP réunit les résultats d'activité morphogénétique et les réserves des deux hivers 92/93 et 93/94 en variables principales et les données météorologiques en variables supplémentaires. Les axes 1 et 2 représentent 50% de la variation du nuage de points (fig 3.12). L'axe 1 horizontal est représenté par le taux d'apparition des feuilles, par les sucres des feuilles et des stolons, l'azote et le carbone total des feuilles. Ces paramètres sont positivement reliés à la somme des températures en base 0°C, à la température moyenne de l'air et négativement à la température minimale du sol à 10cm de profondeur. L'axe vertical est majoritairement représenté par le taux de mortalité et la teneur en amidon des feuilles et des stolons, les deux paramètres sont reliés négativement. La somme des températures en base 5°C évolue dans le même sens que les réserves sur l'axe 2. Mise à part la somme des températures, les données météorologiques sont faiblement corrélées aux paramètres de morphogénèse et de réserves du trèfle blanc.

La matrice des corrélations entre les paramètres nous permet de représenter l'importance des relations apparues lors de l'ACP. Ainsi, les corrélations entre le taux d'apparition, et les paramètres principaux donnés par l'ACP sont les suivantes :

- temps :	+0,495		
- mortalité	-0,138		
- croissance	+0,398		
- sucres feuilles	+0,167	- sucres stolons	+0,289
- amidon feuilles	-0,207	- amidon stolons	-0,294
- azote feuilles	+0,195	- azote stolons	-0,039
- carbone feuilles	+0,180	- carbone stolons	+0,062
- temp. moyenne	+0,266	- rayonnement	+0,273
- SOMTEMP B0	+0,203	- SOMTEMP B5	+0,103

D'après ces ACP, il semble que les paramètres morphogénétiques soient peu corrélés aux paramètres climatiques et faiblement corrélés aux réserves (fig 3.12). Cependant, lorsque l'on représente le nuage de points de la deuxième ACP, on retrouve des nuages de point correspondant à des périodes saisonnières dont les variations climatiques sont très marquées (fig 3.13). Le résultat le plus net est le nuage de points représentant les mesures du mois de novembre 1993. Les températures ont été très faibles ce mois-là, on observe alors un nuage orienté selon l'axe de la mortalité et des teneurs en sucres faibles. Par contre, en novembre et décembre 1992, les températures étaient relativement douces, on retrouve alors un nuage de point orienté selon l'axe des teneurs en amidon. Lorsque les températures sont basses sans extrêmes, on observe alors un nuage de point plus global, orienté dans le sens du taux d'apparition des feuilles.

Cette répartition des individus selon des variations saisonnières très marquées montre qu'il existe une relation entre les paramètres morphologiques, les réserves du trèfle blanc et le climat. Cependant, ces relations ne sont pas simples et n'apparaissent pas évidentes dans une représentation graphique comme une analyse en composantes principales.

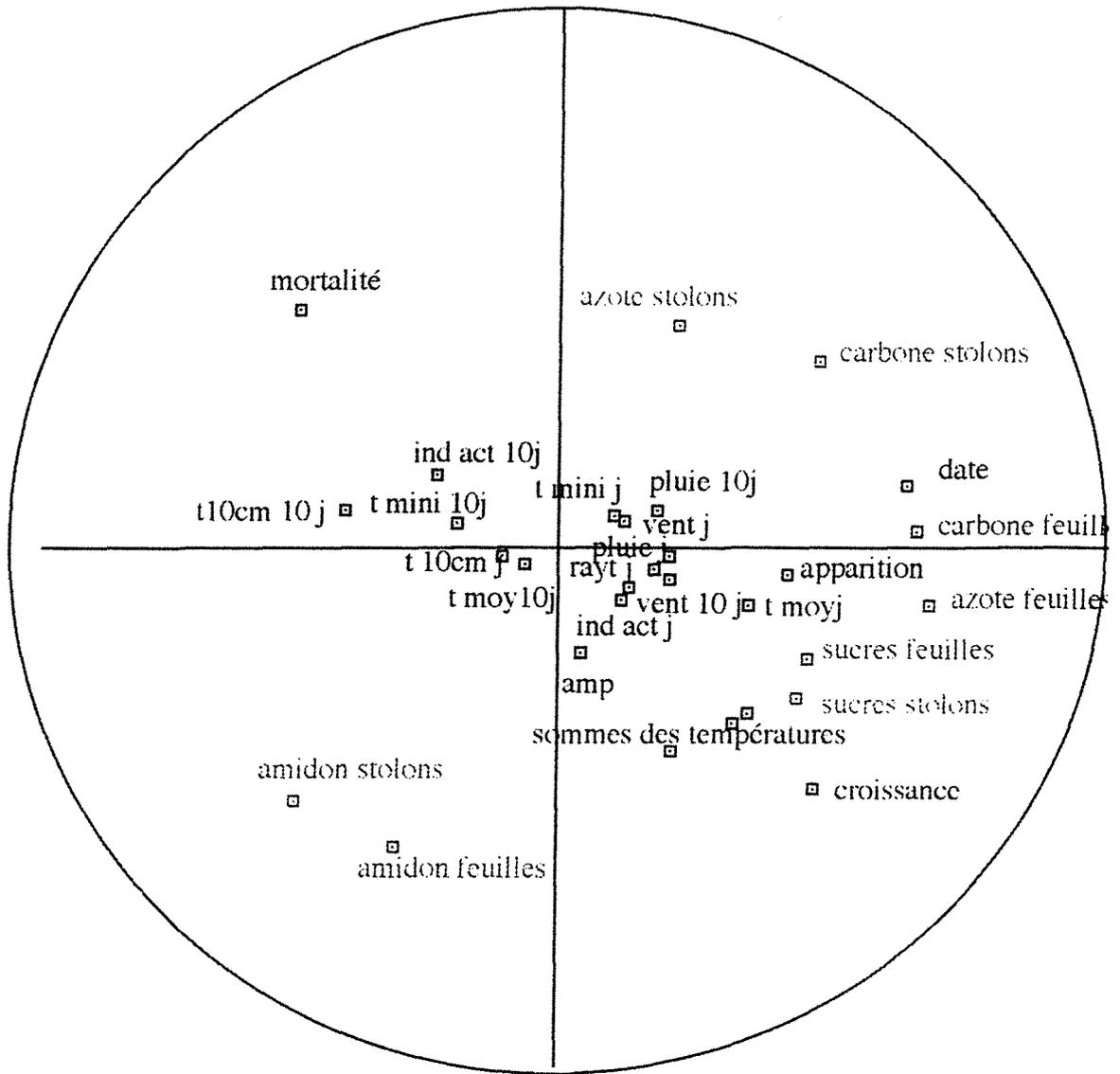
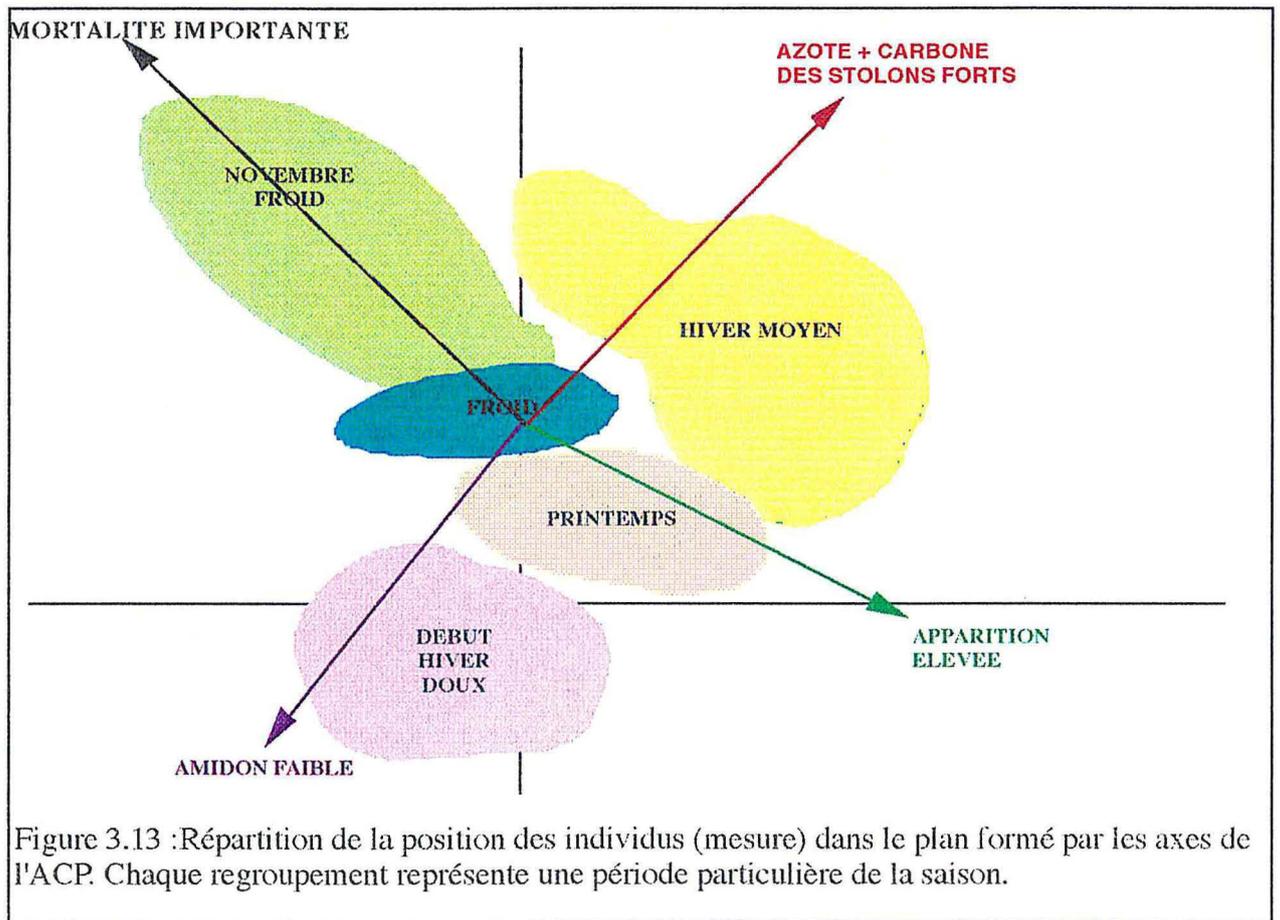


Figure 3.12 : Cercle des corrélations entre la morphogénèse, les réserves et les données météorologiques . La liste des paramètres est donnée en liste des abréviations à la fin du document.

La deuxième étape de notre analyse consiste à représenter graphiquement certains paramètres entre eux et d'observer la forme des nuages de point obtenus. Afin de simplifier la présentation, nous n'avons figuré ici que les courbes permettant d'émettre des hypothèses plus précises quant à l'existence de relations.



Ainsi, le taux d'apparition des feuilles qui présentait un coefficient de corrélation intéressant avec le rayonnement global est réparti selon un nuage de point très dispersé (fig 3.14).

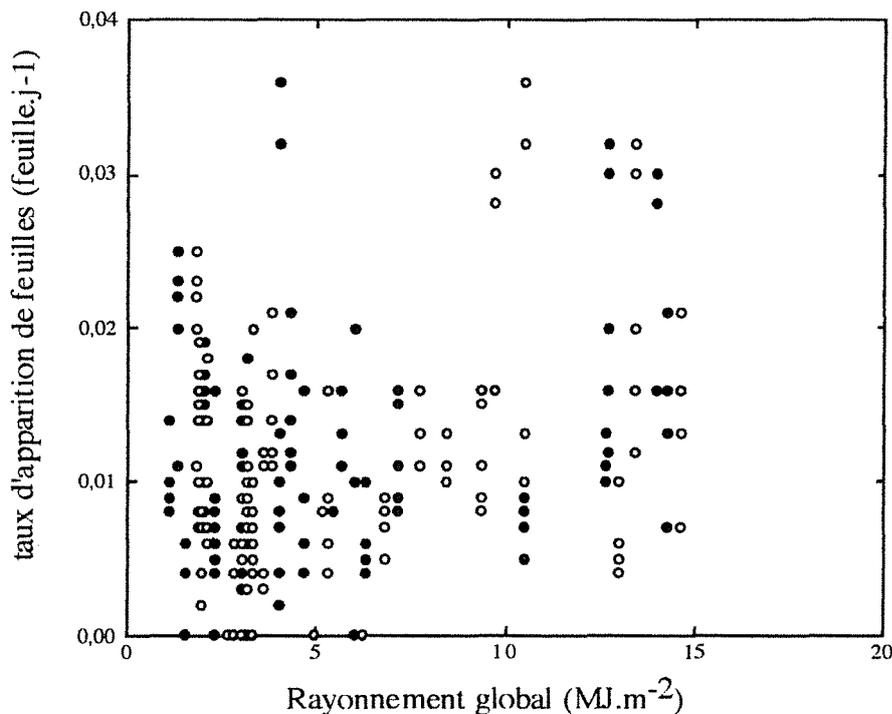


Figure 3.14 : Taux d'apparition des feuilles en fonction du rayonnement global du jour de mesure ● ou moyen sur les 10 jours précédents la mesure ○. Chaque point représente une mesure.

Il en est de même avec la somme des températures en base 0°C ou en base 5°C (résultats non présentés). Par contre, en fonction de la température moyenne de l'air, le taux d'apparition des feuilles admet une courbe enveloppe (fig 3.15). Le principe de cette méthode est de différencier les situations expérimentales où un facteur particulier est limitant, parmi d'autres situations soumises à d'autres facteurs (Guckert *et al.*, 1983). Dans nos conditions d'expérience, nous pouvons dessiner une courbe limite pour une température de l'air de -8°C à +13°C. Tous les points situés sur la droite sont majoritairement limités par la température moyenne. Par contre, les points situés en dessous de la droite sont limités par des facteurs autres que la température. Ainsi, la température moyenne agit sur le taux d'apparition des feuilles mais n'est pas le seul facteur limitant cette grandeur en hiver.

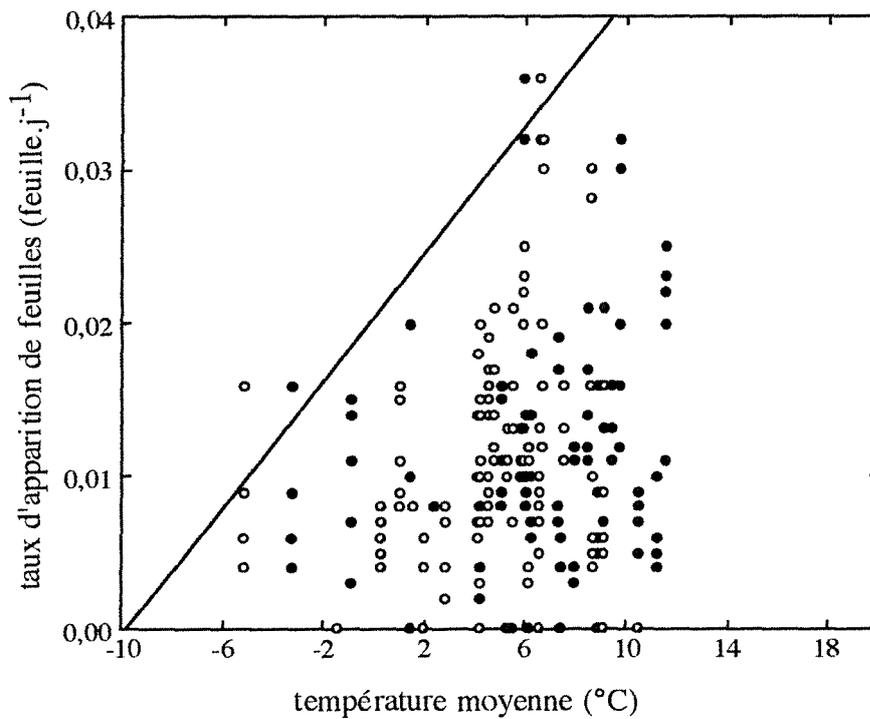


Figure 3.15 : Taux d'apparition des feuilles de trèfle blanc en hiver en fonction de la température moyenne de l'air du jour de mesure ● ou de la température moyenne des 10 jours écoulés avant la mesure ○ . Chaque point représente une mesure. La droite représente la limite de la courbe enveloppe.

La relation entre les sucres des feuilles ou des stolons et l'amidon des mêmes organes n'est pas très évidente (fig 3.16 A et B). Lorsque l'amidon est hydrolysé, on n'observe pas simultanément un pic de sucres solubles, la relation n'est pas linéaire mais semble plus logarithmique.

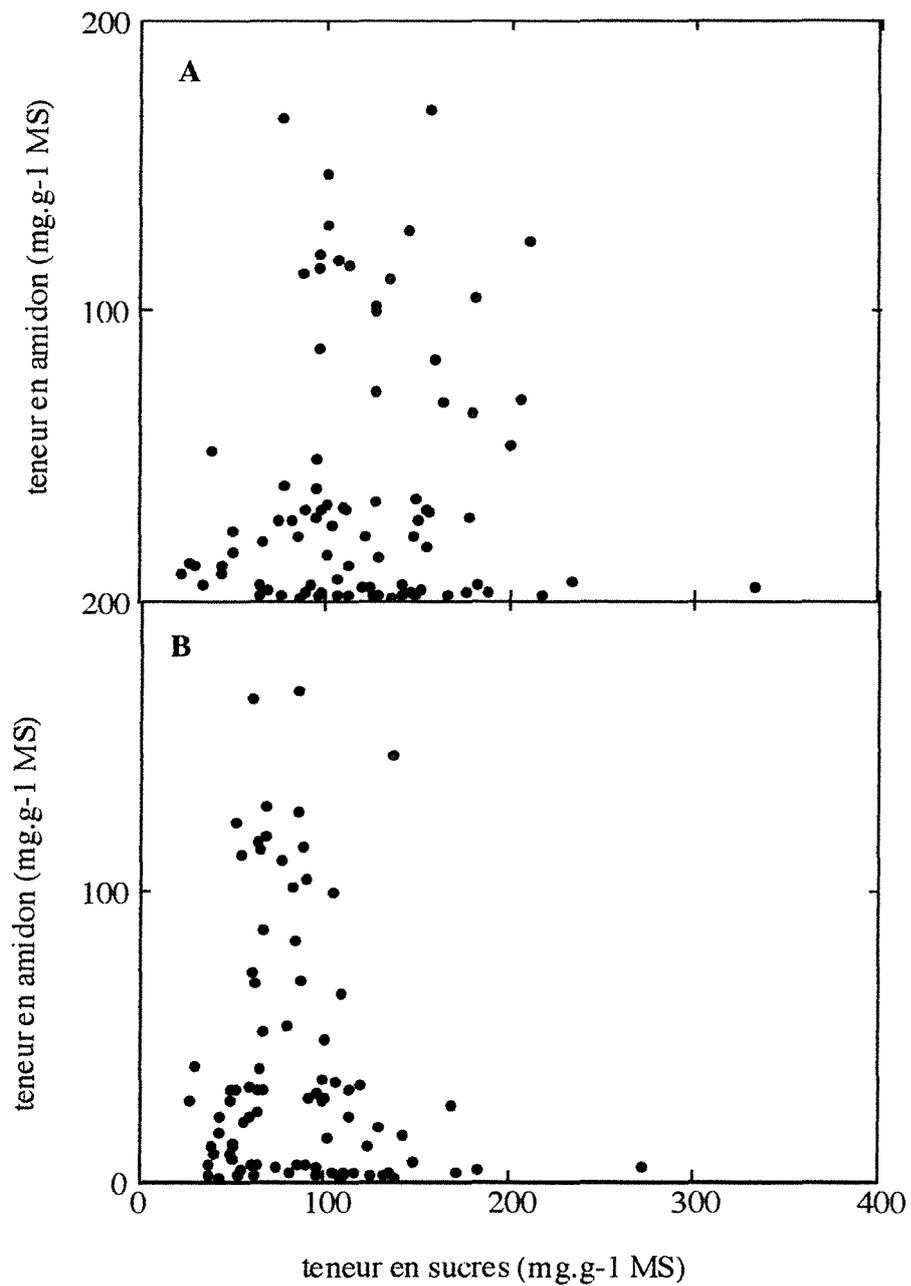


Figure 3.16 : Relations entre la teneur en sucres et la teneur en amidon des stolons (A) et des feuilles (B) chez le trèfle blanc en hiver. Chaque point représente une mesure.

Par contre, il existe une relation entre la teneur en amidon des feuilles et des stolons et la somme des températures à partir de la date de la dernière coupe (fig 3.17).

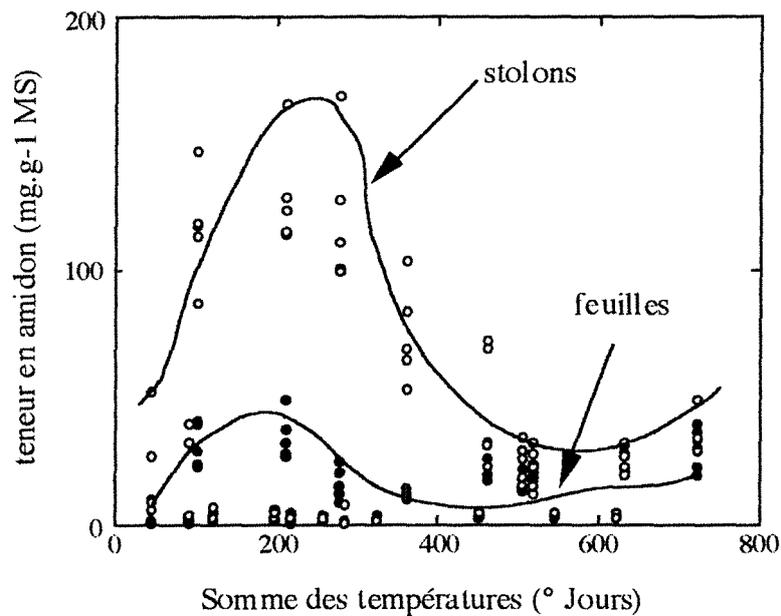


Figure 3.17 : Teneur en amidon des feuilles ● et des stolons ○ de trèfle blanc, en hiver, en fonction de la somme des températures en base 0°C à partir de la date de la dernière coupe. Chaque point représente une mesure.

Cette représentation montre qu'à partir de la dernière coupe, l'amidon s'accumule jusqu'à environ 300°jours (jusqu'à la fin du mois de décembre environ), au-delà, l'amidon est hydrolysé, il semble s'accumuler de nouveau à partir de 600°jours (à partir du mois de mars). La relation est de type bi-modale.

Seul le bilan de croissance semble montrer qu'il existe une relation entre la morphogénèse et les réserves carbonées des stolons chez le trèfle blanc. La relation est de type asymptotique avec les sucres et l'amidon des stolons (fig 3.18 A et B). En dessous d'une concentration minimale en sucres ou en amidon, le bilan de croissance est négatif.

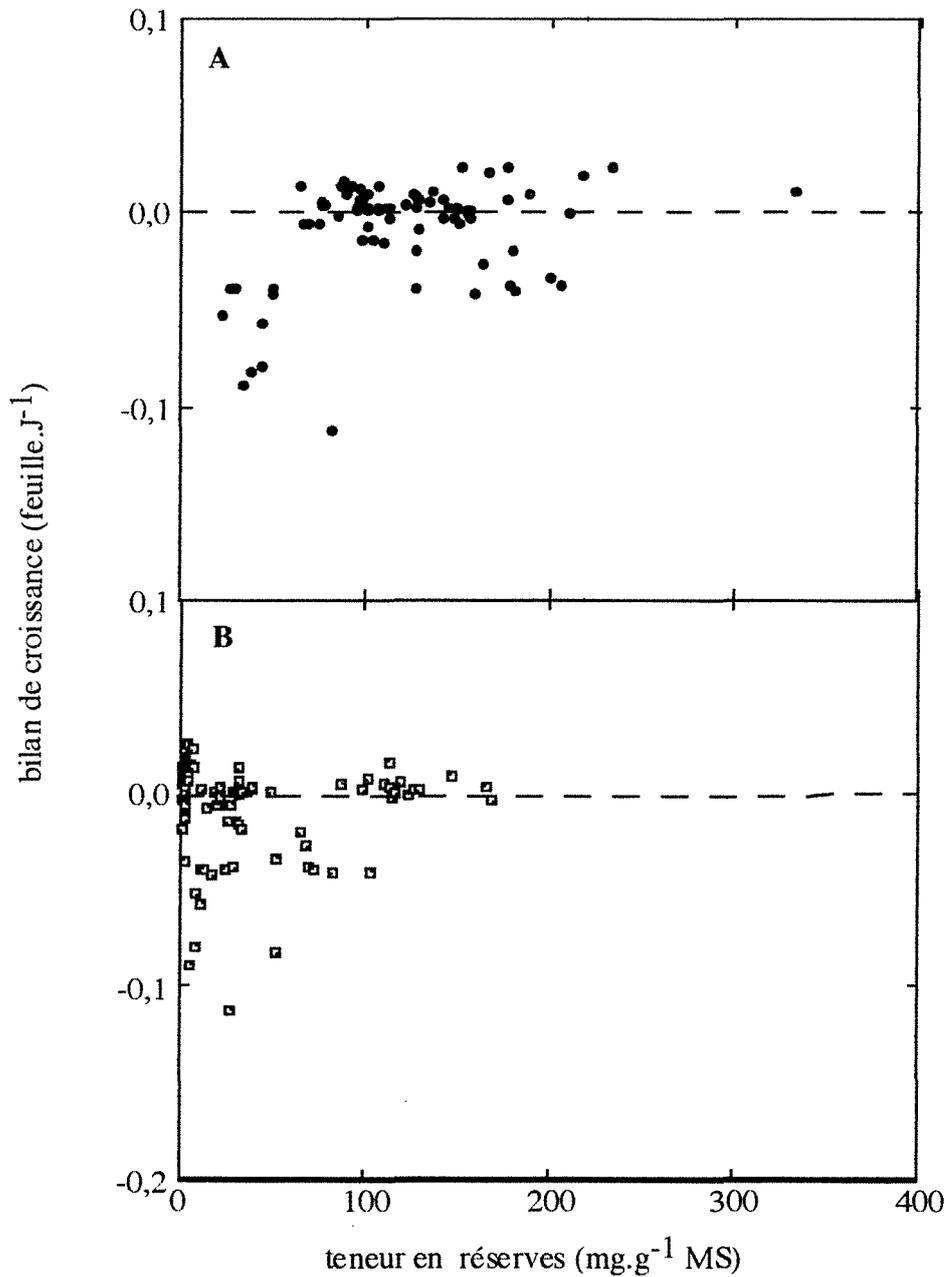


Figure 3.18. Bilan de croissance des feuilles de trèfle blanc en hiver en fonction de la teneur en sucres des stolons (A) et de la teneur en amidon des stolons (B). Chaque point représente une mesure.

La majorité des paramètres considérés dans cette étude ne montrent pas de relations linéaires entre eux. Cependant, la troisième étape de notre analyse consiste à réaliser des analyses de régressions linéaires en utilisant la procédure stepwise du logiciel SAS. Nous avons choisi arbitrairement de travailler en modèle linéaire car il permet d'obtenir des

résultats simplifiés, en évitant ainsi des modèles polynomiaux du 2^{ème} ou 3^{ème} degré. Nous rappelons ici que le but de cette analyse n'est pas la construction d'un modèle de prédiction mais d'une aide à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la tolérance au froid du trèfle blanc. La procédure stepwise de SAS prend en considération une à une les variables explicatives. Lorsque 50% de la variation du paramètre choisi est expliquée, la procédure s'arrête. Il est ensuite facile de hiérarchiser l'importance de chaque paramètre dans le modèle grâce aux coefficients de corrélations cumulés.

Cette dernière étape de notre analyse est une étape plus fine et plus précise. Nous devons donc sélectionner les variables explicatives. D'après les premières régressions calculées (résultats non montrés), il apparaît que les valeurs météorologiques moyennes des 10 jours précédant la mesure morphologique (10J) permettent d'obtenir des modèles plus significatifs qu'avec les données météorologiques du jour même de la mesure (J). Ainsi, pour le taux d'apparition, le r^2 cumulé est de 0,30 avec les valeurs J et de 0,37 avec les valeurs 10J. Pour le taux de mortalité on a un r^2 de 0,25 avec les valeurs J et de 0,35 avec les valeurs 10J. Les conditions climatiques des 10 jours précédant la mesure expliquent mieux la morphogénèse du trèfle blanc que les données du jour correspondant à la mesure. Ces résultats assez logiques nous ont conduit à présenter les modèles de régressions entre les paramètres en n'utilisant que les données météorologiques de la moyenne des 10 jours précédant la mesure.

Ainsi, pour le taux de mortalité des feuilles, on retrouve la température comme facteur principal. Il s'agit cependant plus de la température minimale du sol à 10cm, de la température minimale de l'air, de l'indice actinothermique, du nombre de jours présentant une amplitude supérieure à 15°C et de la somme des températures que la température moyenne de l'air (tab 3.8). D'autres paramètres climatiques sont inclus dans le modèle ; le vent et la pluie.

Pour le taux d'apparition, on retrouve comme dans la première ACP une influence du rayonnement global. Le facteur température est fortement présent dans ce modèle.

TAUX DE MORTALITE DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 PL10J	1	0.084	0.084	40.5	10.50	0.0016
2 T10CM10J	2	0.093	0.177	26.8	12.91	0.0005
3 SOMTEMP	3	0.072	0.249	16.8	10.78	0.0014
4 VT10J	4	0.034	0.283	13.1	5.36	0.0223
5 TMI10J	5	0.043	0.326	7.8	7.15	0.0086
6 ACT10J	6	0.012	0.338	7.8	1.99	0.1609
7 AMP15	7	0.018	0.356	6.8	3.05	0.0835

TAUX D'APPARITION DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 RT10J	1	0.131	0.131	35.2	17.31	0.0001
2 ACT10J	2	0.093	0.223	21.4	3.63	0.0003
3 T10CM10J	3	0.063	0.286	12.7	9.94	0.0021
4 AMP15	4	0.033	0.319	8.9	5.51	0.0206
5 VT10J	5	0.015	0.335	8.3	2.57	0.1117
6 TMI10J	6	0.026	0.361	5.9	4.44	0.0374
7 TMO10J	7	0.009	0.370	6.4	1.56	0.2133

BILAN DE CROISSANCE

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 PL10J	1	0.080	0.080	53.7	10.02	0.0020
2 SOMTEMP	2	0.129	0.209	32.2	18.70	0.0001
3 T10CM10J	3	0.082	0.292	19.3	13.19	0.0004
4 TMO10J	4	0.047	0.339	2.7	7.96	0.0056
5 VT10J	5	0.025	0.364	10.2	4.35	0.0392
6 AMP15	6	0.025	0.389	7.7	4.49	0.0362
7 RT10J	7	0.011	0.400	7.7	2.00	0.1599
8 TMI10J	8	0.007	0.407	8.4	1.26	0.2633
9 ACT10J	9	0.003	0.409	10.0	0.48	0.4877

Tableau 3.8. Résumé de la procédure par étape des régressions linéaires entre les variables

Le bilan de croissance est globalement expliqué par les mêmes paramètres climatiques que le taux d'apparition et de mortalité des feuilles. La somme des températures est un des paramètres le plus fortement relié à ce bilan. Bien que des relations soient mises en évidence entre la morphogénèse et les données météorologiques, seulement 35 à 40% de la morphogénèse est expliquée par le climat. Il reste encore 60% de cette variation à expliquer.

TENEUR EN SUCRES SOLUBLES DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 VT10J	1	0.080	0.080	15.6	6.60	0.0121
2 T10CM10J	2	0.083	0.163	9.50	7.48	0.0078
3 ACT10J	3	0.041	0.205	7.45	3.87	0.0526
4 PL10J	4	0.030	0.235	6.40	2.93	0.0908
5 SOMTEMP B0	5	0.056	0.292	2.90	5.75	0.0190
6 TMO10J	6	0.007	0.300	4.20	0.76	0.3833

TENEURS EN SUCRES SOLUBLES DES STOLONS

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 VT10J	1	0.157	0.157	29.51	14.19	0.0003
2 TMO10J	2	0.170	0.327	0.60	18.98	0.0001
3 SOMTEMP B0	3	0.052	0.380	6.13	6.28	0.0143
4 RT10J	4	0.030	0.410	4.37	3.78	0.0556
5 ACT10J	5	0.019	0.430	3.99	2.44	0.1221
6 T10CM10J	6	0.013	0.444	4.30	1.76	0.1888

TENEUR EN AMIDON DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 AMP15	1	0.269	0.269	43.06	32.78	0.0001
2 RT10J	2	0.123	0.392	23.11	17.86	0.0001
3 T10CM10J	3	0.098	0.491	7.53	16.89	0.0001
4 ACT10J	4	0.015	0.506	6.82	2.65	0.1071
5 SOMTEMP B0	5	0.017	0.524	5.68	3.14	0.0797
6 TMO10J	6	0.011	0.535	5.59	2.12	0.1485
7 TMI10J	7	0.004	0.540	6.74	0.86	0.3537
8 VT10J	8	0.003	0.544	8.08	0.66	0.4176

TENEUR EN AMIDON DES STOLONS

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 VT10J	1	0.044	0.044	61.14	4.20	0.0433
2 SOMTEMP B0	2	0.053	0.098	54.68	15.37	0.0227
3 AMP15	3	0.035	0.133	51.11	3.63	0.0597
4 RT10J	4	0.055	0.188	44.40	6.01	0.0161
5 T10CM10J	5	0.058	0.247	37.25	6.73	0.0111
6 ACT10J	6	0.167	0.414	12.96	24.57	0.0001
7 TMI10J	7	0.015	0.430	12.52	2.31	0.1318
8 TMO10J	8	0.025	0.455	10.52	3.92	0.0507
9 PL10J	9	0.016	0.472	10.00	2.52	0.1156

Tableau 3.9. Résumé de la procédure par étape des régressions linéaires entre les réserves carbonées (amidon et sucres solubles) des feuilles et stolons de trèfle blanc et les données météorologiques moyennes des 10 jours précédant la mesure à Mirecourt sur l'ensemble des hivers 1992-1993 et 1993-1994.

Les teneurs en sucres solubles des feuilles et des stolons sont reliés principalement à la température minimale du sol et de l'air (tab 3.9). La teneur en amidon des feuilles et des stolons est principalement corrélée au nombre de jours présentant une amplitude de

température supérieure à 15°C, ainsi qu'aux températures minimales de l'air et du sol. Le rayonnement global entre significativement dans le modèle.

Les pourcentages d'azote et de carbone total des feuilles sont corrélés à la somme des températures, au nombre de jours présentant une amplitude supérieure à 15°C et au rayonnement global (tab. 3.10). L'ensemble des variables climatiques considérées dans cette analyse n'expliquent pas plus de 60% de la variation des réserves.

Les régressions linéaires entre la morphogénèse du trèfle et les teneurs en sucres, amidon et azote des feuilles et des stolons montrent que le bilan de croissance est principalement corrélé à l'azote des feuilles et au carbone total des stolons (tab 3.11). L'apparition et la mortalité des feuilles sont faiblement corrélées à la quantité d'amidon des stolons du jour même de la mesure. Il est important de constater que moins de 30% de la variation de la morphogénèse est expliquée par les variations des réserves carbonées si l'on considère les valeurs correspondantes aux jours de la mesure.

Ces mêmes analyses réalisées entre la morphogénèse et la quantité de réserves 10 jours avant la mesure donnent des résultats légèrement différents (tab 3.11). De cette manière, les taux d'apparition et de mortalité des feuilles sont plus fortement corrélés à la quantité d'amidon et de sucres solubles dans les feuilles. Cependant, les réserves considérées n'expliquent que 20% de la variation de la morphogénèse.

TENEUR EN AZOTE DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 SOMTEMP B0	1	0.283	0.283	63.67	36.05	0.0001
2 RT10J	2	0.233	0.517	15.88	43.55	0.0001
3 VT10J	3	0.018	0.535	14.03	3.46	0.0659
4 ACT10J	4	0.008	0.543	14.27	1.59	0.2104
5 AMP15	5	0.011	0.555	13.79	2.27	0.1348
6 TMO10J	6	0.016	0.571	12.37	3.21	0.0766
7 TMI10J	7	0.030	0.602	7.81	6.57	0.0121
8 T10CM10J	8	0.007	0.609	8.30	1.52	0.2205

TENEUR EN AZOTE DES STOLONS

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 RT10J	1	0.254	0.254	23.07	30.72	0.0001
2 VT10J	2	0.025	0.280	21.23	3.19	0.0775
3 SOMTEMP B0	3	0.017	0.298	20.57	2.23	0.1386
4 T10CM10J	4	0.021	0.320	19.31	2.80	0.0977
5 ACT10J	5	0.073	0.393	10.43	10.35	0.0018
6 TMO10J	6	0.016	0.409	10.02	2.32	0.1308
7 TMI10J	7	0.039	0.449	6.10	6.05	0.0159

TENEUR EN CARBONE DES FEUILLES

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 SOMTEMP B0	1	0.252	0.252	37.47	30.71	0.0001
2 AMP15	2	0.121	0.373	19.00	17.37	0.0001
3 RT10J	3	0.018	0.391	7.94	2.65	0.1070
4 VT10J	4	0.014	0.406	17.49	2.14	0.1465
5 PL10J	5	0.083	0.489	5.44	14.14	0.0003
6 TMO10J	6	0.007	0.496	6.22	1.23	0.2703
7 ACT10J	7	0.009	0.505	6.63	1.61	0.2070
8 T10CM10J	8	0.003	0.508	8.114	0.52	0.4718

TENEUR EN CARBONE DES STOLONS

Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1 AMP15	1	0.090	0.090	35.32	8.97	0.0035
2 RT10J	2	0.163	0.254	15.12	9.53	0.0001
3 VT10J	3	0.041	0.295	11.51	5.16	0.0254
4 SOMTEMP B0	4	0.035	0.331	8.65	4.66	0.0335
5 TMI10J	5	0.007	0.338	9.64	0.95	0.3300
6 T10CM10J	6	0.039	0.378	6.27	5.41	0.0223
7 TMO10J	7	0.009	0.388	6.95	1.33	0.2510
8 ACT10J	8	0.003	0.391	8.47	0.48	0.4892
9 PL10J	9	0.003	0.395	10.00	0.47	0.4915

Tableau 3.10 . Résumé de la procédure par étape des régressions linéaires entre les teneurs en carbone et azote total des feuilles et stolons de trèfle blanc et les données météorologiques moyennes des 10 jours précédant la mesure à Mirecourt sur l'ensemble des hivers 1992-1993 et 1993-1994.

TAUX D'APPARITION DES FEUILLES

	Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1	CS	1	0.172	0.172	4.96	16.88	0.0001
2	AMIS	2	0.077	0.249	-0.85	8.21	0.0053
3	CF	3	0.009	0.259	0.14	1.04	0.3089
4	NF	4	0.008	0.267	1.30	0.89	0.3483

TAUX DE MORTALITE DES FEUILLES

	Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1	NF	1	0.093	0.093	9.98	8.36	0.0049
2	CS	2	0.029	0.123	9.09	2.68	0.1053
3	AMIS	3	0.046	0.169	6.48	4.46	0.0377
4	NS	4	0.042	0.212	4.30	4.22	0.0432
5	SUCF	5	0.014	0.226	4.91	1.40	0.2392
6	CF	6	0.013	0.239	5.63	1.30	0.2564
7	AMIF	7	0.006	0.246	7.02	0.61	0.4342

BILAN DE CROISSANCE DES FEUILLES

	Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1	NF	1	0.110	0.110	8.38	10.10	0.0021
2	CS	2	0.060	0.171	4.40	5.87	0.0176
3	NS	3	0.033	0.205	3.09	3.35	0.0709
4	AMIS	4	0.021	0.226	3.02	2.12	0.1492
5	SUCF	5	0.016	0.243	3.39	1.68	0.1979

Tableau 3.11. Résumé de la procédure par étape des régressions linéaires entre les données morphologiques et les teneurs en amidon, sucres solubles, azote total et carbone total des feuilles et des stolons du trèfle blanc sur l'ensemble des hivers 1992-1993 et 1994-1995

TAUX D'APPARITION DES FEUILLES

	Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1	AMIF	1	0.126	0.126	1.53	11.02	0.0014
2	CF	2	0.045	0.176	-0.74	4.50	0.0371
3	AMIS	3	0.017	0.193	-0.27	1.61	0.2073
4	SUCF	4	0.006	0.200	1.16	0.59	0.4439

TAUX DE MORTALITE DES FEUILLES

	Variable	N°	R ² Partiel	R ² cumulé	C(p)	F	Prob>F
1	SUCF	1	0.127	0.127	4.67	11.08	0.0013
2	AMIF	2	0.052	0.179	1.93	4.80	0.0315
3	NF	3	0.032	0.211	1.05	3.00	0.0874
4	NS	4	0.010	0.222	2.14	0.95	0.3317

Tableau 3.12 : Résumé de la procédure par étape des régressions linéaires entre les données morphologiques et les teneurs en réserves des feuilles et des stolons du trèfle blanc 10 jours avant la mesure morphogénétique.

4. DISCUSSION

Cette étude a été entreprise dans le but de caractériser la morphogénèse et l'évolution des réserves en hiver et au printemps chez le trèfle blanc. La comparaison entre deux variétés est abordée dans le but d'identifier des différences dans la tolérance au froid. Cette étude n'a jamais été réalisée de manière aussi complète dans un climat semi-continental. Les principales données existant sur le comportement hivernal du trèfle blanc proviennent du Pays de Galles sous un climat océanique froid.

Les quatre hivers considérés n'ont jamais été rigoureux mais des périodes de froid ont été observées en novembre, janvier et février. Aucune couverture neigeuse conséquente et durable n'a été enregistrée. Cette remarque est très importante car pendant les périodes froides, les plantes ne disposaient d'aucune protection et étaient directement sujettes aux effets du gel. Les printemps ont également montré des gelées tardives.

Malgré l'absence de conditions hivernales rigoureuses, il apparaît que la morphogénèse et le métabolisme du trèfle blanc sont affectés pendant l'hiver.

Le bilan de croissance évolue entre des valeurs négatives et des valeurs positives, ce qui indique qu'il existe bien une production de nouvelles feuilles pendant l'hiver, même si de nombreuses feuilles disparaissent. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Davies et Evans (1982) au Pays de Galles. Ces auteurs observent un équilibre entre la production et la mortalité des feuilles pendant l'hiver. Pendant les trois hivers considérés, la vitesse moyenne d'apparition de feuilles est de 1 feuille toutes les 14 semaines alors que Davies et Evans observent la production de 1 feuille toutes les 7 à 8 semaines, ce qui est pratiquement 2 fois plus rapide. La température moyenne en hiver au Pays de Galles est de 6°C alors qu'elle n'est que de 3,5°C en Lorraine. De plus, les mois les plus froids au Pays de Galles présentent des températures de 3 à 4°C supérieures à celles que nous avons enregistrées. Ces résultats montrent qu'en climat continental, même modéré, la morphogénèse du trèfle est fortement réduite. Cette réduction s'observe également par le

nombre de bourgeons axillaires qui diminue au cours de l'hiver. Les bourgeons axillaires se développant ont été comptabilisés ultérieurement comme bourgeons terminaux.

Le facteur environnemental déterminant dans la morphogénèse du trèfle blanc en hiver est la température. Cependant, deux températures semblent plus importantes que la température de l'air :

- la température du sol à 10 cm
- l'indice actinothermique.

Ces résultats sont en accord avec Sackville Hamilton et Harper (1989) qui montrent que la température du sol à 10cm de profondeur a un effet sur la vitesse d'apparition des noeuds.

Les organes les plus sensibles aux conditions hivernales sont les feuilles. La matière sèche totale ainsi que la surface moyenne d'une feuille sont fortement réduites pendant les mois les plus froids ce qui est en accord avec les résultats de Woledge *et al.* (1990) et de Treillet (1981). Cette sensibilité des feuilles aux conditions hivernales peut être expliquée par la corrélation qui existe entre le taux de mortalité et l'indice actinothermique. En effet, ce paramètre représente la température minimale des feuilles pendant la nuit. La plupart du temps pendant l'hiver, cette température est négative, les feuilles sont donc directement exposées à des conditions de gel. Sachant que le gel induit une forte déshydratation des végétaux qui peut être létale (Hale et Orcutt, 1977 ; Yelenosky et Guy, 1989), on peut en conclure qu'un indice actinothermique faible est un facteur de risque pour la survie hivernale des feuilles de trèfle blanc.

La vitesse d'apparition des feuilles est également dépendante de la température. Cependant, un autre facteur environnemental influence cette activité ; il s'agit du rayonnement global comme l'ont également noté Eagles et Othman (1986). Dans notre étude, la reprise de croissance s'effectue en mars-avril quand les températures et le rayonnement augmentent et dépassent 7°C et 200 MJ.m⁻² respectivement. Certains auteurs ont constaté une reprise de croissance du trèfle blanc uniquement quand la température dépassait 9°C (Munro et Hughes, 1986), d'autres l'ont observé à 5°C (Menzi *et al.*, 1991). Nous pouvons conclure qu'en Lorraine, la reprise de croissance du trèfle blanc dépend principalement de

l'augmentation du rayonnement et de l'élévation de la température. Cependant, les faibles corrélations obtenues et l'absence de relations linéaires entre ces paramètres indiquent que d'autres facteurs que nous n'avons pas identifiés dans cette étude ont un effet sur le taux d'apparition des feuilles. D'autre part, ces résultats indiquent que c'est plus un ensemble de facteurs climatiques qui conditionnent la morphogénèse du trèfle blanc qu'un seul facteur isolé.

Pour les stolons, la réduction de la biomasse est beaucoup plus faible pendant l'hiver que chez les feuilles. Les stolons sont directement posés à la surface du sol et subissent moins les conditions de gel que les feuilles. De plus, la couverture induite par les feuilles peut avoir un effet protecteur sur les stolons. Nous n'avons pas observé d'enfouissement des stolons dans le sol. Ce phénomène est certainement dépendant de la composition granulométrique du sol. Nous avons observé une faible activité biologique dans le sol compte tenu de la forte teneur en argile (annexe 1).

Malgré l'absence de protection par le sol ou par la neige, la matière sèche des stolons n'a pas été significativement affectée par les conditions hivernales modérées que nous avons enregistrées. Ainsi, la répartition de la matière sèche est modifiée pendant l'hiver, au dépend des feuilles. Pendant l'hiver, le stolon représente alors la plus grande part de la matière sèche du trèfle blanc (Vez, 1961 ; Guckert *et al.*, 1983 ; Harris *et al.*, 1983). Dans notre cas, ils représentent 47% et 83% de la matière sèche aérienne en 93/94 et 94/95 respectivement.

La longueur des stolons n'évolue pas beaucoup pendant l'hiver, alors que de nouvelles feuilles apparaissent. Ceci peut être expliqué par le rythme ralenti de l'apparition des feuilles et la réduction de la longueur des entre-noeuds comme l'a déjà observé Nösberger (1983).

Les deux variétés étudiées semblent montrer un comportement différent uniquement au niveau du stolon. En effet, au cours du dernier hiver, les stolons de Aberherald sont plus denses que les stolons de Huia. Au printemps, on observe un rendement supérieur chez

Aberherald. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation significative entre la densité des stolons et le rendement de matière sèche étant donné que nous n'avons observé ce résultat que lors du dernier hiver. D'après la littérature, il semble que cette meilleure croissance puisse être attribuée à une quantité élevée d'amidon dans les stolons (Vez, 1961 ; Ashworth *et al.*, 1993). En effet, chez Aberherald, nous avons observé une quantité d'amidon par unité de longueur nettement supérieure à celle de Huia et l'accumulation printanière d'amidon est plus rapide chez Aberherald que chez Huia.

Cependant, les relations entre les réserves et la morphogénèse du trèfle blanc dans cette étude sont très faibles malgré les fortes fluctuations des sucres et de l'amidon. La concentration en amidon qui est élevée à l'automne devient très faible à la fin de l'hiver. Les sucres solubles qui montrent des pics de concentration au cours des périodes froides sont également à un niveau très faible au printemps. De nombreux auteurs ont déjà mentionné la forte consommation de ces composés pendant l'hiver (Lüscher, 1989 ; Vez, 1961). L'accumulation d'amidon pendant l'automne correspond à un mécanisme d'endurcissement (Vez, 1961 ; Cyr et Bewley, 1989). Cette accumulation est en partie dépendante de la température, au-delà d'un certain cumul de degrés jours, la concentration en amidon chute. Au printemps, la concentration en amidon suit à nouveau la courbe d'augmentation des températures. Les jours présentant une amplitude de température avec la veille supérieure à 15°C semblent fortement influencer la consommation hivernale d'amidon. D'après nos analyses, il semble comme pour la morphogénèse que la température soit l'un des facteurs les plus déterminant dans l'évolution des composés carbonés chez le trèfle blanc.

Les analyses en composantes principales et les représentations graphiques permettent de montrer que la relation entre l'amidon et les sucres solubles n'est pas directe. Contrairement aux travaux de nombreux auteurs (Cyr et Bewley, 1989 ; Volenec *et al.*, 1991), notre étude montre que la diminution de l'amidon qui conduit à une libération de mono et disaccharides n'est pas directement visualisable. Les sucres solubles obtenus

semblent directement utilisés par la plante et ne sont pas détectés dans les analyses quantitatives des teneurs en sucres solubles. Malgré ces résultats, on observe une accumulation importante de sucres solubles pendant les périodes froides. Les principaux sucres rencontrés l'hiver dans le trèfle blanc sont du saccharose, du fructose, du glucose, du maltose et du raffinose (Beinhart, 1964). Les plus fortes concentrations en saccharose sont observées après les périodes de froid. Nos analyses montrent que les sucres solubles sont corrélés aux températures minimales de l'air et du sol. Certains auteurs ont trouvé du pinitol dans le trèfle blanc (Davis et Nordin, 1983). Nous en avons également détecté mais en faibles quantités. Cette molécule n'est pas actuellement reconnue comme essentielle à la survie hivernale du trèfle blanc.

Malgré les relations entre les teneurs en réserves carbonées et les données météorologiques hivernales, il est difficile d'attribuer un rôle précis de ces composés dans le maintien de la morphogénèse du trèfle blanc. Vingt pourcent seulement de la variation de la morphogénèse du trèfle blanc au cours de l'hiver est expliquée par l'évolution des réserves carbonées (sucres et amidon). Il semblerait donc que les réserves carbonées ne soient pas les seules molécules déterminantes dans la survie hivernale du trèfle et dans sa reprise printanière (Yelenosky et Guy, 1989 ; Bertrand et Paquin, 1991 ; Thomas et James, 1993 ; Tronsmo *et al.*, 1993). D'autres substances comme des composés azotés stockés dans les stolons comme protéines ou acides aminés pourraient jouer un rôle dans la survie hivernale du trèfle blanc (Cyr et Bewley, 1989 ; Corre *et al.*, 1994). Ces hypothèses sont justifiées par la réduction du pourcentage en azote total des feuilles et des stolons au printemps. Cependant, cette diminution peut aussi être expliquée par une faible fixation azotée lorsque les températures sont faibles (Guckert *et al.*, 1983).

Le printemps est une période déterminante pour la survie du trèfle blanc. En effet, une forte mortalité de feuilles est observée pendant cette période. Les feuilles les plus vieilles qui étaient présentes pendant tout l'hiver meurent (observation in situ), lorsque la

production de nouvelles feuilles a commencé. Parallèlement, une importante mortalité des stolons se produit au printemps (20% de mortalité en mars). Cette sensibilité printanière a déjà été observée par Collins *et al.* (1991) et par Hay *et al.* (1987). La mortalité accrue au printemps est souvent expliquée dans la littérature par une forte consommation des réserves pendant l'hiver ce qui réduit la fourniture d'énergie pour la repousse au printemps (Ashworth *et al.*, 1993). Cependant, des regressions calculées entre la morphogénèse au printemps et le niveau de réserves ne permettent pas de conclure sur un rôle plus déterminant des réserves à cette époque de la saison. Par contre, il est important de considérer que la température minimale du sol à 10 cm de profondeur et l'indice actinothermique sont des températures qui influencent le taux de mortalité des feuilles. Ainsi, les gelées tardives du printemps peuvent être responsables de la forte mortalité des feuilles et des stolons.

3.5. CONCLUSION

Cette étude conduite sur 4 hivers montre que la morphogénèse du trèfle blanc est **principalement affectée par la température**. Il s'agit alors de la température minimale de l'air, de l'indice actinothermique et de la température minimale du sol à 10cm de profondeur. Le taux d'apparition des feuilles est également influencé par le rayonnement global, ce qui laisse certainement envisager des effets indirects via l'assimilation nette du CO₂.

Parmi les résultats obtenus, nous pouvons identifier deux effets principaux de l'hiver, et notamment du froid sur le trèfle blanc. Les premiers sont des effets directs :

- **forte mortalité des feuilles en périodes froides ;**
- **nombreuses nécroses apicales en périodes printanières, au moment des gelées tardives ;**

- **production de petites feuilles et réduction du nombre et de la longueur des entre-noeuds ;**

Les seconds sont des effets indirects du froid :

- **consommation de l'amidon pendant les périodes froides et accumulation de mono et disaccharides ;**
- **modification de la répartition de la biomasse ;**

D'après les analyses des relations entre les différents paramètres, nous pouvons émettre deux hypothèses i) les réserves carbonées ne sont pas les seuls déterminants de l'activité morphogénétique hivernale du trèfle blanc ii) les paramètres choisis et les méthodes utilisées ne nous permettent pas dans nos conditions expérimentales de mettre en évidence toutes les relations.

En effet, nous avons choisi d'utiliser des méthodes linéaires de caractérisation des relations entre nos différents paramètres, il est fort probable que les relations entre la morphogénèse du trèfle blanc et le métabolisme carboné ne soient pas de type linéaires.

Le nombre de facteurs environnementaux est considérable en plein champ et rend l'étude très compliquée. Nous avons observé que le paramètre principal qui détermine la morphogénèse et l'évolution des réserves du trèfle blanc est la température. Il est donc indispensable pour mieux étudier les effets des faibles températures sur le trèfle blanc de maîtriser leurs variations ainsi que les interactions avec les autres facteurs environnementaux. Nous utiliserons alors pour la suite de notre étude des méthodes expérimentales en conditions contrôlées en ne faisant varier que la température. Nous aborderons la morphogénèse du trèfle blanc et son métabolisme carboné et azoté, sous différents traitements de température et affineront ainsi la compréhension globale des mécanismes impliqués dans la survie hivernale du trèfle blanc et dans sa reprise printanière.

**CHAPITRE IV. ANALYSE DE LA REPONSE AU
FROID DU TREFLE BLANC**

SOMMAIRE PARTIE 4

1. EFFETS D'UNE ACCLIMATATION AU FROID SUR L'ETAT HYDRIQUE ET LES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES DU TREFLE BLANC SOUMIS À DES FAIBLES TEMPERATURES POSITIVES OU À DES GELS SUCCESSIFS	P 113
1.1. Protocole expérimental	
1.1.1. <i>Matériel végétal et conditions de culture</i>	
1.1.2. <i>Traitements</i>	
1.1.3. <i>Paramètres mesurés</i>	
1.2. Résultats	
1.2.1. <i>Réponse des plantes à l'acclimatation</i>	
1.2.2. <i>Réponse des plantes au froid (5/0°C) et au gel nocturne à -5°C</i>	
1.3. Discussion	
1.4. Conclusion	
2. EFFET DES BASSES TEMPERATURES ET DE LA REPOUSSE SUR L'EVOLUTION DES RESERVES CARBONEES ET SUR LA MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC. IMPORTANCE DU CULTIVAR.	P 127
2.1. Objectifs de l'étude	
2.2. Matériels et méthodes	
2.3. Résultats	
2.4. Discussion	
2.5. Conclusion	

ANALYSE DE LA REPONSE AU FROID DU TREFLE BLANC

Nous avons vu dans le chapitre III que la morphogénèse du trèfle blanc était fortement réduite pendant l'hiver. Cependant, il subsiste une activité méristématique qui conduit à maintenir un nombre de feuille minimum (2 feuilles par axe) pendant les mois les plus rigoureux de l'hiver. Les réserves accumulées pendant l'automne dans les feuilles et les stolons résultent en un durcissement du trèfle, ces réserves sont ensuite consommées pendant l'hiver. En plein champ, la relation existant entre le devenir des réserves et l'évolution morphologique est très faible. Cependant, de nombreux auteurs attribuent aux réserves carbonées (amidon et sucres solubles) un rôle important dans la résistance au froid (Vez *et al.*, 1961 ; Yelenosky et Guy, 1977 ; Ashworth *et al.* 1993). Ces composés carbonés semblent agir comme des cryoprotecteurs et permettre ainsi de lutter contre les effets déshydratants du froid et du gel. L'état hydrique d'une plante soumise à de faibles températures est un paramètre important à considérer. Cependant, peu de données nous renseignent sur les évolutions de cet état hydrique chez le trèfle blanc soumis au froid.

La première étude, réalisée en conditions contrôlées a pour but de préciser l'évolution des composés carbonés et de l'état hydrique du trèfle soumis à de faibles températures. De plus, nous tenterons de déterminer les mécanismes qui se développent pendant la phase d'endurcissement automnal et les conséquences de cette acclimatation sur la tolérance du trèfle blanc au froid et au gel.

La deuxième étude abordera le rôle des composés carbonés dans les mécanismes de tolérance ou de résistance au froid du trèfle blanc. Nous intégrerons alors l'effet variétal étudié en plein champ pour tenter d'expliquer les différences de reprises constatées lors du dernier hiver d'observation à Mirecourt. Ces deux études sont conduites en conditions contrôlées dans le but de maximiser les chances d'observer des effets des basses températures sur le trèfle blanc. Différents traitements de température sont imposés alors que les variations des autres facteurs sont minimisées (photopériode, intensité lumineuse, humidité)

1. EFFETS D'UNE ACCLIMATATION AU FROID SUR L'ETAT HYDRIQUE ET LES RESERVES CARBONEES ET AZOTEES DU TREFLE BLANC SOUMIS A DES FAIBLES TEMPERATURES POSITIVES OU A DES GELS SUCCESSIFS :

1.1. Protocole expérimental :

Les conditions expérimentales ont été définies lors d'expériences préliminaires. Le choix de la température et de la méthode de mesure du potentiel osmotique sont détaillés en annexe 12 et 13.

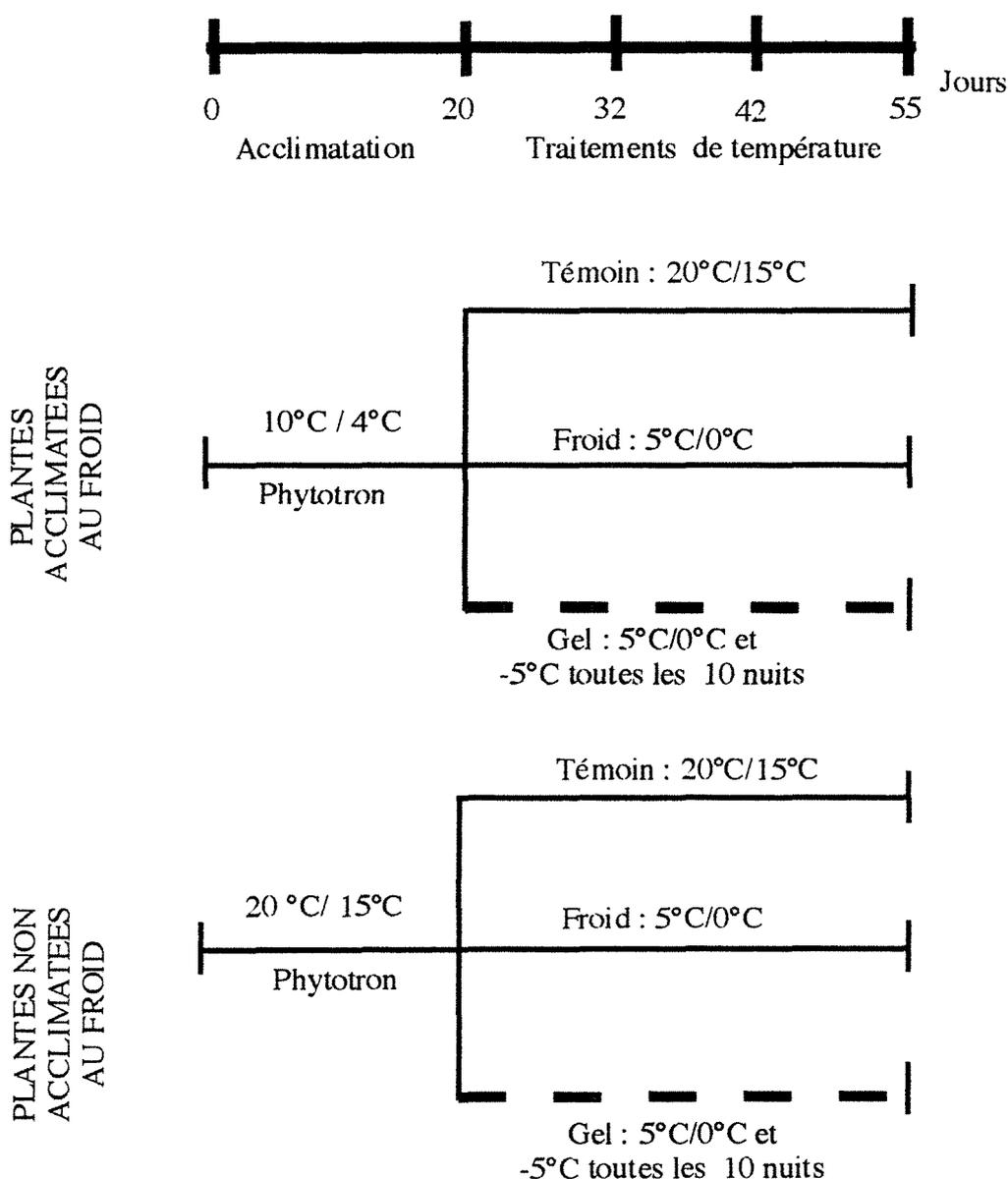


Figure 4.1. Dispositif expérimental de l'étude.

1.1.1. Matériel végétal et conditions de culture :

Nous avons travaillé sur 96 boutures de trèfle blanc (cv. Huia) réalisées comme décrit dans le chapitre 2. Les boutures ont été développées en serre pendant 15 semaines dans les conditions suivantes : photopériode : 14 heures et température minimale : 15°C.

1.1.2. Traitements :

Après les 15 semaines de développement en serre, les plantes sont placées en phytotron en deux lots :

- 49 plantes seront soumises à une acclimatation au froid à 10°C/4°C jour/nuit ;
- 49 plantes seront soumises à des conditions témoin à 20°/15°C jour/nuit ;

Après 20 jours d'acclimatation en phytotron; chaque lot de 49 plantes est soumis à 3 modalités de traitements de température (fig 4.1) :

- traitement 1 : témoin 20°/15°C
- traitement 2 : froid 5°/0°C
- traitement 3 : gels à -5°C lors des périodes nocturnes des 19, 31, 41 et 54 èmes jours à

partir de la mise en phytotron et froid à 5°/0°C entre deux gels.

Remarque / Les plantes soumises au gel sont placées le soir dans une chambre froide régulée à -5°C puis immédiatement replacées en conditions de froid (5°/0°C) le matin suivant la nuit de gel.

Pour tous les traitements, la photopériode est de 10 heures et l'humidité relative maintenue à 70% lorsque cela est possible (sauf pour le traitement froid la nuit et pour les gels).

1.1.3. Paramètres mesurés :

Les paramètres suivants ont été déterminés sur les feuilles et stolons :

- matières sèches ;
- teneur en eau relative (TER) des feuilles et stolons ;
- potentiel osmotique ;
- teneur en sucres solubles et en amidon ;
- teneur en azote total ;
- teneur en acides aminés (uniquement sur les feuilles des plantes acclimatées) ;

Les prélèvements ont été réalisés aux jours 20, 32, 42 et 55 sur les plantes entières.

1.2. Résultats :

Nous présentons ici les résultats observés à la fin de la période d'acclimatation à 10/4°C (J20) et les comparons aux plantes soumises pendant la même durée en phytotron à 20/15°C (non acclimatées au froid). Nous aborderons ensuite les résultats obtenus lors des traitements de température.

1.2.1. Réponse des plantes à l'acclimatation :

Etat hydrique : Au jour 20, le potentiel osmotique est significativement plus faible chez les feuilles acclimatées au froid que chez les feuilles non acclimatées (fig 4. 2). La teneur en eau relative des feuilles et des stolons n'est pas significativement affectée par l'acclimatation au froid (fig 4.3)

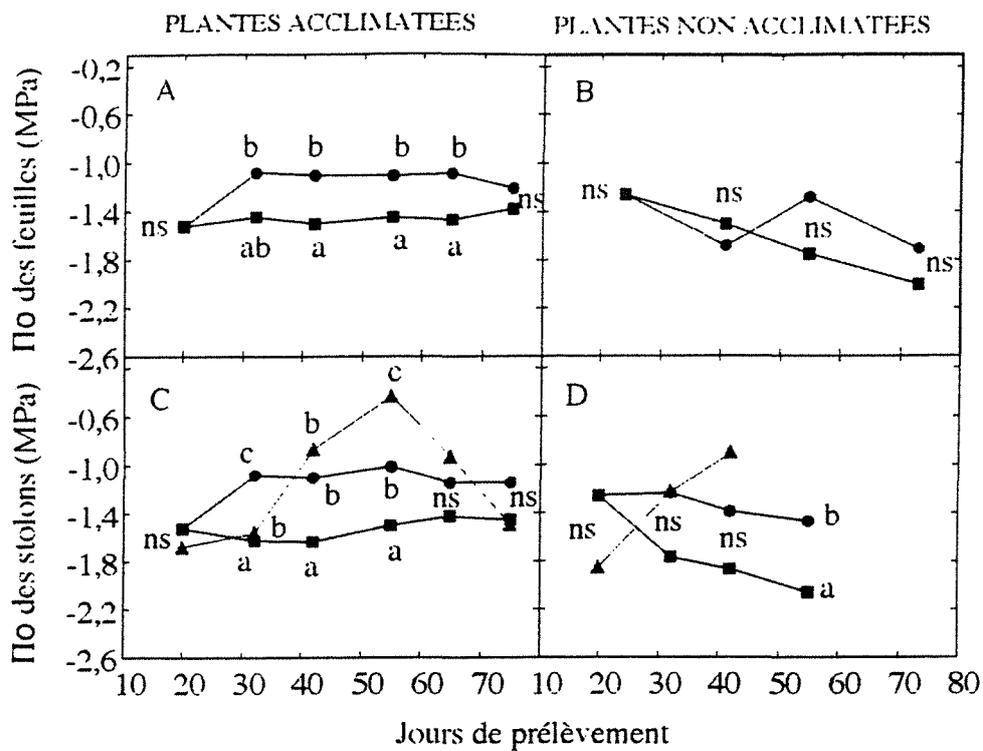


Fig 4.2. Potentiel osmotique des feuilles et des stolons de trèfle soumis aux températures : 20/15°C ● , 5/0°C ■ et à des nuits de gel à -5°C ▲ A: feuilles acclimatées, B: feuilles non acclimatées, C : stolons acclimatés, D : stolons non acclimatés . Les groupes significativement différents au seuil de 5% sont représentés par des lettres différentes selon le test de Bonferroni.

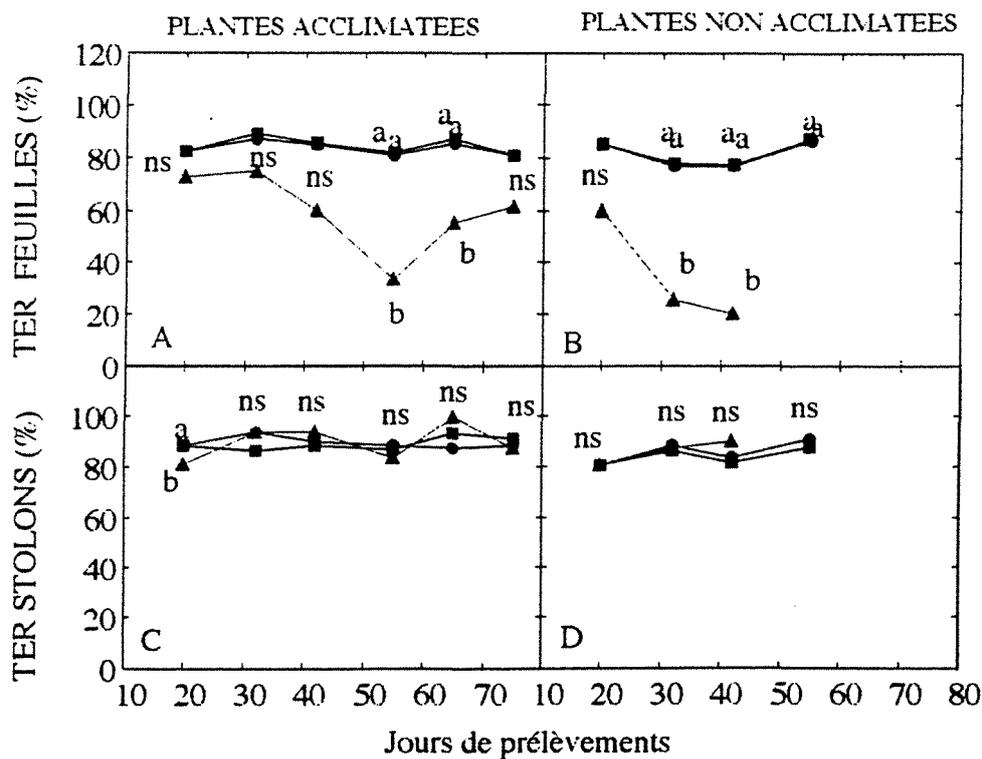


Figure 4.3 : Teneur en eau relative (TER) des feuilles et des stolons des trèfle acclimatés ou non soumis aux températures suivantes 20/15°C ● 5/0°C ■ ou à des séquences de gel à -5°C ▲ A: feuilles acclimatées, B: feuilles non acclimatées, C : stolons acclimatés, D : stolons non acclimatés . Les groupes significativement différents au seuil de 5% sont représentés par des lettres différentes selon le test de

Composés carbonés : A la fin de l'acclimatation, la teneur en sucres solubles et en amidon des feuilles et des stolons est plus élevée chez les plantes acclimatées au froid que chez les plantes non acclimatées (tab 4.1).

			Non acclimatées			Acclimatées			effet acclimatation			
			témoin	froid	gel	témoin	froid	gel	témoin	froid	gel	
Feuilles	Sucres (mg.g-1MS)	j20	63a	63a	51a	12a	12a	20a	ns	ns	ns	
		j32	45b	137a	115a	39a	75a	62a	ns	ns	ns	
		j42	57a	126a	149a	33b	133a	42b	ns	ns	ns	
		j55	70a	90a	122a	41b	96a	–	ns	ns	–	
	Amidon (mg.g-1MS)	j20	54a	54a	18b	15a	15a	12a	s	s	ns	
		j32	14a	39a	34a	16b	50a	10b	ns	ns	ns	
		j42	13a	51a	22a	28a	96b	8a	s	ns	ns	
		j55	12a	51a	13a	59b	100a	–	s	s	–	
	Stolons	Sucres (mg.g-1MS)	j20	46a	46a	48a	9a	9a	25b	ns	ns	s
			j32	49b	81ab	83a	29b	102a	39b	ns	s	ns
j42			55b	84a	66b	52b	96a	25c	ns	ns	ns	
j55			56a	73a	48a	42b	111a	–	ns	s	–	
Amidon (mg.g-1MS)		j20	81a	81a	64a	44a	44a	45a	ns	ns	ns	
		j32	26b	81a	68a	79ab	134a	20b	ns	ns	s	
		j42	31b	128a	94a	79ab	150a	6b	ns	ns	s	
		j55	34b	108a	87ab	80a	90a	–	s	ns	–	

Tableau 4.1. Réserves carbonées des feuilles et des stolons de trèfle blanc acclimaté ou non au froid et soumis au froid (5/0°C), au gel (-5°C) ou aux conditions témoins (20/15°C). J20 = fin de l'acclimatation, j20, j32, j42 et j55 = dates de prélèvement. Les différences entre températures pour chaque catégorie de plantes sont données par les lettres. Les données n'ayant pas la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Bonferroni. Les différences pour chaque température entre plantes acclimatées ou non (effet acclimatation) sont significatives à $p < 0,05$: s ou non significatives : ns.

Composés azotés : La teneur en azote total des feuilles est significativement plus faible après l'acclimatation au froid et passe de 4,8% à 3,8% de la matière sèche (fig. 4.4). La diminution n'est pas significative chez les stolons. La teneur en acides aminés des feuilles diminue également pendant l'acclimatation et passe de 0,59 à 0,42 mg.g⁻¹ MS (fig. 4.5). Par contre, la teneur en proline reste constante pendant l'acclimatation au froid.

Répartition de la matière sèche : Au 20ème jour, les stolons des plantes soumises à l'acclimatation ont accumulé beaucoup plus de biomasse que les stolons des plantes non acclimatées au froid (tab 4.2).

1.2.2. Réponse des plantes au froid (5/0°C) et au gel nocturne à -5°C

Etat hydrique : Le traitement froid à 5/0°C n'a pas modifié la teneur en eau des feuilles et des stolons par rapport aux plantes témoin pendant toute la durée de l'expérimentation, que les plantes soient acclimatées au froid ou non (fig. 4.3).

Par contre, chez les plantes acclimatées, le gel a induit une déshydratation des stolons de 10% la première nuit. Ensuite, la teneur en eau des stolons des deux types de plantes n'a pas été modifiée par le gel. La plus forte déshydratation s'observe sur les feuilles des plantes acclimatées au froid et non acclimatées. Les valeurs minimales de TER sont obtenues après la quatrième nuit de gel chez les plantes acclimatées (TER = 34%) et après la troisième nuit de gel chez les plantes non acclimatées (TER = 20%) (fig. 4.3 A & B). Ensuite, les feuilles des plantes acclimatées au froid se sont réhydratées progressivement pour revenir à un niveau de TER proche des témoins, alors que les feuilles des plantes non acclimatées n'ont pas survécu à cette forte déshydratation et sont mortes. Ces plantes ont alors été transférées en serre ou elles ont initié de nouvelles feuilles.

Chez les plantes acclimatées au froid, le potentiel osmotique des feuilles et des stolons soumis à 5/0°C est plus bas que chez les témoins (fig. 4.2 A & C). Cette diminution indique le développement d'un ajustement osmotique puisque les feuilles et les stolons ne perdent pas d'eau. Les nuits de gel ont d'abord induit une augmentation du potentiel osmotique puis une diminution (fig 4.2 C).

Chez les plantes non acclimatées au froid, la différence de potentiel osmotique entre les stolons soumis au traitement à 5/0°C et les témoins n'est significative qu'à la fin de l'expérimentation (fig. 4.2 C & D). Aucune différence significative de potentiel osmotique n'a pu être mise en évidence chez les feuilles entre les plantes soumises à -5°C et les plantes témoin.

Le potentiel osmotique n'a pas pu être mesuré chez les feuilles soumises au gel car le volume de sève était insuffisant.

Réserves carbonées : La concentration en sucres solubles des feuilles augmente rapidement chez les plantes soumises à 5/0°C et au gel, qu'elles soient acclimatées au froid ou non (tab. 4.1). Dans le traitement au froid, à J42 chez les feuilles, la teneur en sucres solubles des plantes non acclimatées est similaire à celle du J32 des plantes acclimatées. Les gels successifs induisent une augmentation de sucres solubles moins intense chez les plantes acclimatées que chez les plantes non acclimatées au froid.

A la fin de l'expérimentation, chez les plantes acclimatées, il n'existe plus de différence significative dans les teneurs en sucres entre les traitements gel et froid à 5/0°C, pour les feuilles et les stolons.

Le retour en conditions témoins des plantes préalablement acclimatées au froid induit d'abord une diminution de la teneur en sucres des feuilles et des stolons, puis, une réaccumulation de ces composés carbonés .

L'amidon augmente dans les stolons des plantes soumises à 5/0°C, de manière moins intense chez les plantes acclimatées que chez les plantes non acclimatées (tab. 4.1). Dans les feuilles, l'amidon augmente uniquement chez les plantes non acclimatées soumises à 5/0°C. Lors des périodes entre gel, on observe une augmentation de la teneur en amidon des stolons chez les plantes acclimatées au froid alors que la réaction inverse est observée chez les plantes non acclimatées au froid. A la fin de la 4ème nuit de gel, il ne reste plus dans les feuilles et stolons de ces plantes que 8 et 6 mg.g⁻¹ MS d'amidon.

Le retour en conditions témoins des plantes acclimatées au froid induit une diminution de la teneur en amidon des feuilles et des stolons, alors que dans les plantes témoin non acclimatées, on observe une augmentation progressive de la teneur en amidon des feuilles et des stolons.

Composés azotés : La teneur en azote total reste faible dans les feuilles soumises à 5/0°C et au gel, chez les plantes acclimatées ou non (fig. 4.4). Par contre, dans les stolons, la teneur en azote

total diminue encore jusqu'à J32 puis réaugmente progressivement pour les trois traitements dans les deux types de plantes. Dans les feuilles des plantes non acclimatées au froid et soumises au gel, on observe une augmentation de la teneur en azote après le J32.

Le retour en conditions témoins des plantes acclimatées au froid induit une augmentation puis une stabilisation de la teneur en azote total des feuilles et une augmentation progressive et continue de l'azote total des stolons.

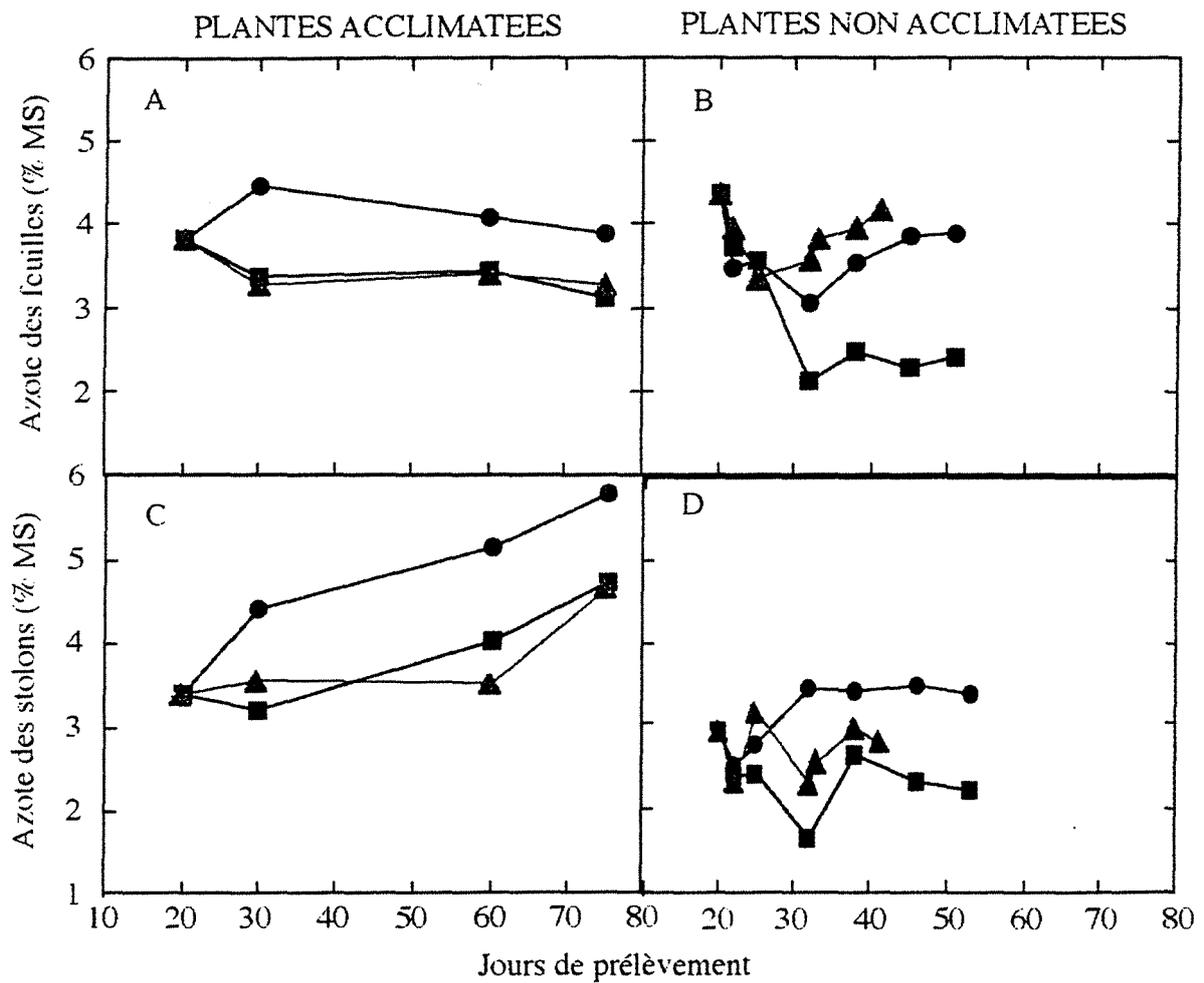


Figure 4.4 : Azote total (% MS) des feuilles et des stolons des trèfles acclimatés ou non soumis aux températures suivantes 20/15°C ● 5/0°C ■ ou à des séquences de gel à -5°C ▲ .A : Feuilles acclimatées, B : Feuilles non acclimatées, C : Stolons acclimatés, D : Stolons non acclimatés

La teneur en acides aminés n'a été déterminée que pour les feuilles des plantes acclimatées soumises au froid à 5/0°C (fig 4.5). La concentration en acides aminés diminue chez les plantes soumises au froid et chez les témoins. Par contre, il n'existe aucune variation significative de la teneur en proline.

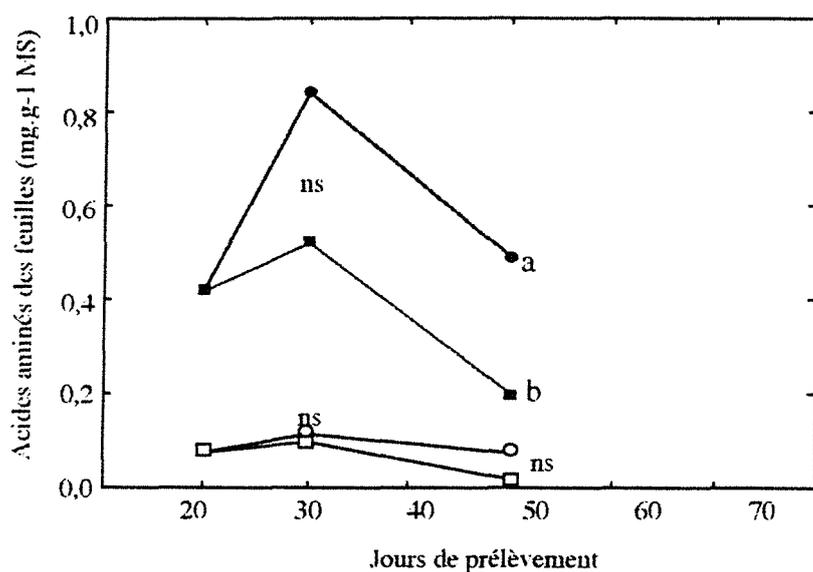


Figure 4.5. Acides aminés (symboles fermés) et proline (symboles ouverts) des feuilles de trèfle blanc acclimatés au froid et soumis aux températures 5/0°C et 20/15°C. Acides aminés à 20/15°C : ● , Acides aminés à 5/0°C : ■ , Proline à 20/15°C : ○ Proline à 5/0°C □. Les groupes significativement différents entre eux au seuil de 5% sont représentés par des lettres différentes selon le test de Bonferoni, ns : non significativement différents.

Répartition de la matière sèche : La proportion de matière sèche investie dans les stolons augmente lors du traitement au froid à 5/0°C chez les plantes acclimatées et non acclimatées (tab. 4.2). Les gels successifs n'ont pas modifié la répartition de la matière sèche.

		Acclimatées au froid			Non acclimatées			effet acclimatation			
		témoin	froid	gel	témoin	froid	gel	témoin	froid	gel	
Feuilles	(%plante)	j20	64a	64a	67a	74a	74a	76a	s	s	ns
		j32	74a	74a	57a	72a	66a	77a	ns	ns	ns
		j42	70a	56b	70a	70ab	65b	73a	ns	s	ns
		j55	69a	56b	71a	71a	61b		ns	ns	
Stolons	(%plante)	j20	35a	35a	33a	26a	26a	24a	s	s	ns
		j32	26a	26a	43a	28a	34a	23a	ns	ns	ns
		j42	30b	44a	30b	30ab	35a	27b	ns	s	ns
		j55	30b	44a	29b	29b	39a		ns	ns	

Tableau 4.2. Répartition de la matière sèche des feuilles et des stolons de trèfle blanc acclimaté ou non au froid et soumis au froid (5/0°C), au gel (-5°C) ou aux conditions témoins (20/15°C). J20 = fin de l'acclimatation, j20, j32, j42 et j55 = dates de prélèvement. Les différences entre températures pour chaque catégorie de plantes sont données par les lettres. Les données n'ayant pas la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Bonferroni. Les différences entre plantes acclimatées et non acclimatées sont significatives à $p < 0,05$: s ou non significatives : ns.

1.3 Discussion :

Cette étude conduite en conditions contrôlées, sous une photopériode constante, aborde les effets d'une acclimatation au froid sur la physiologie du trèfle blanc avant un traitement au froid ou des séquences intermittentes de gel et dégel. Les résultats obtenus sur une période de 6 semaines permettent de proposer des hypothèses à long terme sur les mécanismes impliqués dans la survie hivernale du trèfle blanc.

Cette étude montre que l'un des aspects liés à la résistance au gel du trèfle blanc dépend de la **capacité à éviter la déshydratation** induite par le gel. Chez les plantes non acclimatées, le gel a provoqué une forte déshydratation des feuilles puisque la teneur en eau relative a chuté jusqu'à 20%. Une telle déshydratation est considérée comme létale (Yelenosky et Guy, 1989). La déshydratation induite par le gel est l'un des symptômes majeurs des effets du gel sur les plantes (Hale et Orcutt, 1987). Ceci est vérifié dans notre étude puisque les feuilles des plantes non acclimatées au froid n'ont pas supporté plus de 4 nuits de gel. Par contre, les plantes acclimatées au froid ont maintenu un meilleur état hydrique. Une réhydratation est même observée dans les

feuilles après la 6ème nuit de gel. Ces résultats montrent que les trèfles acclimatés au froid tolèrent mieux le gel que les trèfles non acclimatés en maintenant leurs feuilles vivantes.

Un second aspect de la survie hivernale du trèfle blanc est lié à **l'évolution des réserves carbonées**, qui fournissent du carbone par hydrolyse de l'amidon, pour assurer des mécanismes de régulation osmotique, de croissance ou de maintien métabolique (Vez, 1961 ; Ashworth, 1993 ; Rosnes et al., 1993).

Entre deux nuits de gel, lorsque les plantes sont placées à 5/0°C, on observe une accumulation de sucres solubles et d'amidon dans les stolons. Ces périodes de gel/dégel ont certainement permis aux plantes acclimatées au froid de reconstituer un stock de réserves correspondant à un second mécanisme d'endurcissement. Des auteurs norvégiens (Juntilla et al., 1990) ont déjà avancé l'hypothèse que de rapides expositions à des températures inférieures à 0°C pouvaient induire un endurcissement chez le trèfle blanc. De plus, ils ont également démontré qu'une acclimatation au froid améliorerait la tolérance au gel du trèfle blanc. Seules les plantes ayant subi la période d'acclimatation montrent une teneur en amidon plus élevée dans leurs stolons, après les nuits de gel. Il semble qu'une forte teneur en amidon soit indispensable à la survie hivernale du trèfle blanc (Vez, 1961 ; Boller et Nösberger, 1983), sachant que l'amidon est hydrolysé en petites molécules carbonées qui fourniront l'énergie nécessaire au maintien du métabolisme et à la repousse printanière, lorsque la photosynthèse n'est pas encore assez efficace pour fournir suffisamment de carbone. Cette réaction a déjà été observée chez des trèfles en situation de repousse après une coupe (Dankwerts et Gordon, 1989).

L'endurcissement observé chez les trèfles qui sont placés 20 jours à 10/4°C est un mécanisme réversible. En effet, l'amidon accumulé dans les feuilles et les stolons pendant cette période diminue lorsque les plantes sont replacées en conditions favorables (20/15°C). Ceci indique que ces composés ont pu être utilisés pour la repousse des parties aériennes, comme l'ont observé Ashworth *et al.* (1993). La diminution immédiate de la teneur en sucres dans les feuilles correspond à une perte d'endurcissement quand les plantes sont replacées dans des conditions non limitantes (Gay et Eagles, 1991 ; Ashworth *et al.*, 1993). Lorsque cette reprise est bien

amorcée, les plantes accumulent à nouveau des sucres pour reconstituer un pool de réserves (Laperrière, 1984).

L'un des résultats les plus importants observé chez les plantes à 5/0°C est **le développement d'un ajustement osmotique (0,4 MPa) chez les plantes endurcies au froid**, alors qu'il n'est pas significatif chez les plantes non endurcies. Certains auteurs ont déjà observé un ajustement osmotique chez des plantes soumises à de faibles températures (Yelenosky et Guy, 1989 ; Thomas et James, 1993). Cependant, aucune corrélation n'a encore été démontrée entre cet ajustement osmotique et la résistance au froid ou au gel chez ces plantes (Bertrand et Paquin, 1991 ; Thomas et James, 1993). Un ajustement osmotique est dû à une accumulation de solutés dans la cellule, sans observer de déshydratation, et son rôle est de diminuer le point de congélation de ces cellules (Gonzalez *et al.*, 1990 ; Tronsmo *et al.*, 1993). Cette réaction permet alors à la plante de maintenir de l'eau dans ses cellules et une turgescence positive (Steponkus, 1984).

Les sucres solubles sont des constituants impliqués dans les variations du potentiel osmotique (Gonzalez *et al.*, 1990). Dans notre étude, la régression linéaire entre le potentiel osmotique et la teneur en sucres dans les feuilles des plantes acclimatées soumises à 5/0°C ne montre pas de résultat significatif ($r^2 = 0,057$) (fig. 4. 6). Un calcul basé sur la variation des sucres solubles par rapport à la variation du potentiel osmotique démontre que les sucres solubles contribuent seulement pour une part représentant 20 à 30% de la diminution du potentiel osmotique. Ce type de résultat est encore très rare dans la littérature. Tronsmo *et al* (1993) montrent que les sucres n'ont pas uniquement un effet osmotique dans les cellules. Ces composés carbonés facilement transportables dans la plante pourraient fournir rapidement de l'énergie et permettre ainsi de diminuer le point de congélation par simple effet colligatif (cohésion entre les molécules). Cependant, même si cette hypothèse permet de justifier l'absence de rôle prédominant des sucres dans l'ajustement osmotique, elle ne peut pas à elle seule expliquer la résistance au froid. De nombreux auteurs avancent l'hypothèse que d'autres composés peuvent intervenir de manière très importante, comme les composés azotés (Cyr et Bewley, 1990).

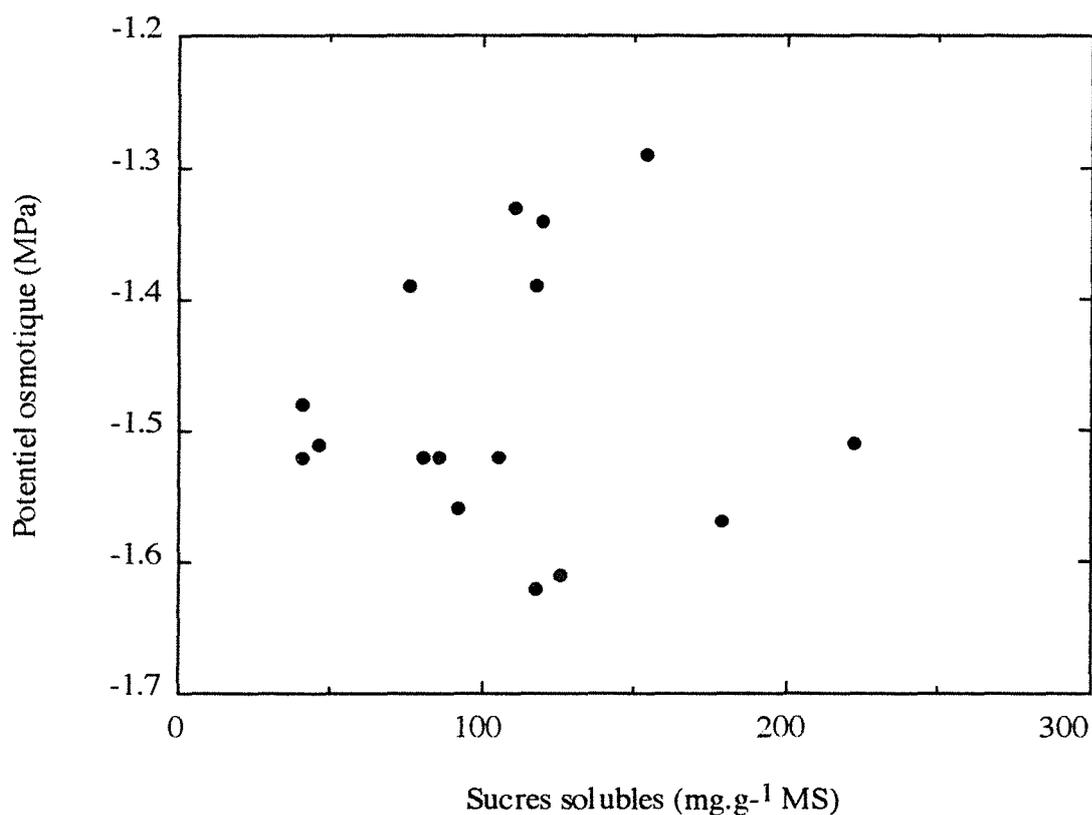


Figure 4.6 : Relation entre les sucres solubles et la variation du potentiel osmotique des feuilles de trèfle blanc acclimaté au froid et soumis à 5/0°C.

Cependant, dans notre étude, les résultats obtenus avec les acides aminés et l'azote total ne nous permettent pas de conclure dans ce sens. Nous n'observons pas de modification de la teneur en proline alors que cet acide aminé a déjà été identifié comme osmorégulateur en cas de froid (Sandli *et al.*, 1993). La diminution de la teneur en azote total et des acides aminés peut s'expliquer par une fixation d'azote réduite par le froid (Guckert *et al.*, 1983). Nous n'avons pas observé le pool protéique dans cette étude. Nos déterminations relatives aux composés azotés n'ont été réalisées qu'une fois, nos conclusions sont donc à considérer avec précaution.

Il apparaît ainsi que la diminution du potentiel osmotique observée chez les plantes endurcies soumises au froid peut être due à d'autres composés tels que les éléments minéraux (Santarius, 1994).

Dans notre étude, les plantes non acclimatées au froid et soumises à 5/0°C montrent un durcissement progressif. Au jour 42, ces plantes ont la même quantité de sucres et amidon que les plantes acclimatées au jour 32. Ainsi, le froid modéré à 5/0°C induit lui aussi un durcissement chez le trèfle blanc. Cet durcissement a provoqué une augmentation de la teneur en composés carbonés ainsi qu'une modification de la répartition de la matière sèche en comparaison avec les plantes à 20/15°C, non acclimatées. Ces résultats sont en accord avec Levitt (1980).

1.4. Conclusion :

Cette étude nous apporte trois éléments importants pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la survie hivernale du trèfle :

- La consommation de l'amidon en hiver, observée en plein champ est plus une réponse aux alternances de gel/dégel qu'à une faible température moyenne ;

- La tolérance au gel du trèfle blanc est conditionnée par sa capacité à maintenir une hydratation suffisante, cette capacité est améliorée par un durcissement au froid ;

- Lorsque le trèfle blanc acclimaté au froid est soumis à de faibles températures supérieures à 0°C, il développe un ajustement osmotique. Le rôle de cet ajustement osmotique et les composés impliqués ne sont pas encore très bien définis.

2. EFFET DES BASSES TEMPERATURES ET DE LA REPOUSSE SUR L'EVOLUTION DES RESERVES CARBONEES ET SUR LA MORPHOGENESE DU TREFLE BLANC. IMPORTANCE DU CULTIVAR.

2.1. Objectifs de l'étude :

En plein champ, la comparaison des deux variétés montre que Aberherald accumule plus de réserves dans ses stolons et qu'elle semble présenter un potentiel de repousse plus fort que la variété Huia. En conditions contrôlées, nous avons observé le développement d'un ajustement osmotique chez le trèfle soumis aux températures basses positives ainsi qu'une meilleure tolérance au gel des plantes ayant subi une phase d'endurcissement. Les sucres solubles et l'amidon sont impliqués dans l'évolution de la morphogénèse du trèfle en plein champ, dans les phénomènes d'endurcissement ainsi que dans l'ajustement osmotique observé, cependant nous n'avons pas encore clairement défini leur rôle.

L'objectif de l'expérimentation qui suit est dans un premier temps de mettre en évidence le rôle des réserves carbonées dans la survie hivernale du trèfle. Nous aborderons les échanges gazeux du trèfle blanc soumis à des températures basses positives. Des mesures de morphogénèse et d'évolution des réserves seront réalisées de manière à relier les trois paramètres : assimilation du carbone, gestion du carbone, et morphogénèse.

Nous travaillerons sur des plantes modèles à 0 feuille dépliée ou à 2 feuilles dépliées adultes.

Les objectifs de ce traitement sont les suivants :

- plantes à 0 feuille : placer les plantes en situation de déficit d'assimilation de CO₂ et solliciter les réserves carbonées à basse température. Au champ, cette situation est rencontrée lorsque les plantes ont subi un gel brutal en début d'hiver.

- plantes à 2 feuilles : simuler la situation hivernale rencontrée en plein champ, où les plantes ne présentent pas plus de 2 feuilles dépliées en moyenne par axe.

Dans un deuxième temps, nos objectifs sont de travailler en conditions de reprise printanière sur l'ensemble des plantes.

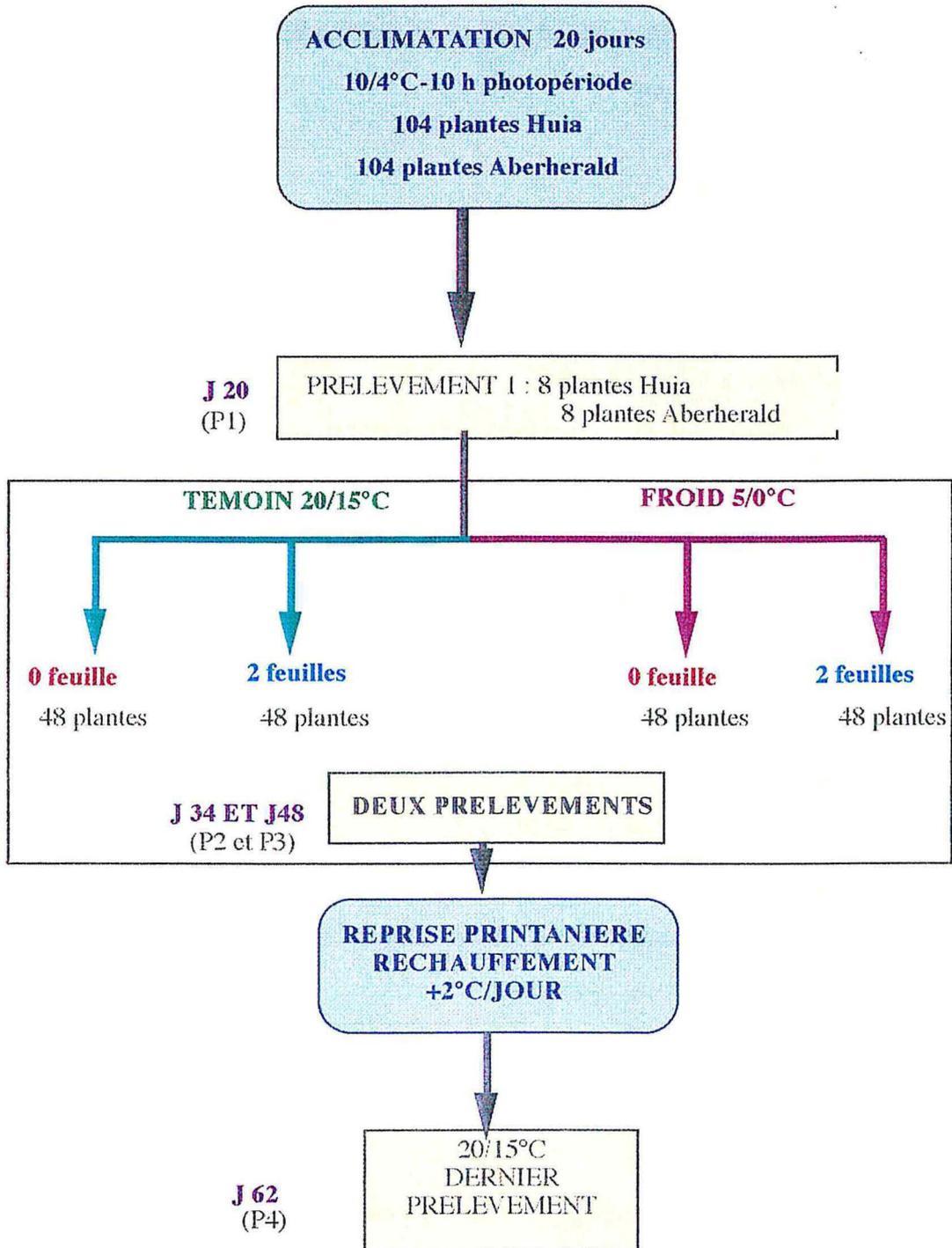


Figure 4.7. Schéma du dispositif expérimental

Un réchauffement progressif sera appliqué jusqu'à atteindre une température moyenne de 20/15°C jour/nuit. L'objectif de ce traitement est d'étudier la contribution du carbone de réserves

dans la repousse printanière du trèfle blanc. A l'issue des résultats des expérimentations en plein champ, (chapitre 3), il est nécessaire d'intégrer une comparaison variétale entre Huia et Aberherald. Celle-ci permettra de caractériser ces deux variétés dans leurs potentialités de survie hivernale et de reprise printanière.

2.2. Matériels et méthodes :

Nous avons travaillé sur 208 plantes, 104 cv. Huia et 104 cv. Aberherald, obtenues comme décrit au chapitre 2. Les plantes ont été développées en serre pendant 10 semaines dans les conditions suivantes : photopériode 14 heures et température minimale 15°C.

Traitements :

Après les 10 semaines de développement en serre, toutes les plantes sont placées en phytotron pour y être endurcies au froid pendant 20 jours à 10/4°C jour/nuit, 10 heures de photopériode. Après cette acclimatation, les plantes de Huia et Aberherald sont séparées en deux lots de température (fig 4.7) :

- 20/15°C jour/nuit : conditions témoin ;
- 5/0°C jour/nuit : conditions de froid ;

Dans chaque lot de température, les plantes sont à nouveau séparées en deux lots :

- plantes à 0 feuille ;
- plantes à 2 feuilles adultes

Toutes les plantes sont maintenues avec un axe principal, les ramifications étant supprimées au fur et à mesure de leur apparition de manière à garder un modèle simple. Les plantes à 0 feuille adulte dépliée sont obtenues en coupant régulièrement les feuilles présentant un stade de développement supérieur à 0,7 sur l'échelle de Carlson (Carlson, 1966) (Annexe 14). Les plantes à 2 feuilles présentent 2 feuilles dépliées (stade 1) à l'apex du stolon.

Après 28 jours de traitement de température, toutes les feuilles des plantes à 2 feuilles dépliées sont supprimées et le lot de plantes à 5/0°C subit un réchauffement progressif de 2°C/jour jusqu'à atteindre la température 20/15°C jour/nuit, soit en 7 jours. Les plantes sont maintenues à cette température jusqu'à ce que le rythme d'apparition des feuilles des plantes ayant subi les températures froides soit équivalent au rythme des plantes témoin.

Paramètres mesurés :

Un prélèvement est effectué à la fin de la période d'acclimatation, puis 2 prélèvements sont réalisés pendant le traitement de température et un prélèvement à la fin de la période de repousse (soit 14 jours après le début de la repousse). Chaque prélèvement comprend 4 plantes par température, par variété et par coupe.

Morphogénèse : à la fin de la période d'acclimatation, 4 plantes par traitement sont baguées à l'aide de peinture blanche ("tipex") à l'aisselle de la deuxième feuille adulte dépliée depuis l'apex. Le rythme d'émission des feuilles est alors déterminé jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Paramètres morphologiques : les plantes sont constamment maintenues soit à 2 feuilles, soit à 0 feuille adulte dépliée. Chaque jour, les feuilles supplémentaires sont coupées, la surface des feuilles et la longueur des pétioles sont mesurées. Les feuilles coupées sont ensuite conservées pour la détermination de la matière sèche du compartiment feuille à la fin du traitement de températures et à la fin de la période de repousse.

A chaque prélèvement destructif, les mesures suivantes sont réalisées :

- surface des feuilles présentes ;
- longueur des pétioles ;
- longueur totale des stolons jusqu'à la bague ;

D'après les biomasses mesurées, la masse linéique des stolons (mg.cm^{-1}) est déterminée.

Assimilation nette du carbone, et fluorescence chlorophyllienne : avant chaque prélèvement, des mesures d'assimilation nette de CO₂ et de fluorescence chlorophyllienne sont effectuées sur les

plantes à 2 feuilles, à raison de 4 répétitions par variété et par température. Le principe de chaque mesure est détaillé au chapitre 2.

Réserves carbonées : Les stolons et les racines sont prélevés pour la détermination des réserves carbonées selon la méthode décrite au chapitre 2.

Analyses statistiques : les données sont analysées par analyse de variance suivant le modèle d'expérimentation en split-plot factoriel à trois facteurs étudiés.

2.3. Résultats :

Taux d'émission des feuilles : Le froid diminue significativement le taux d'apparition des feuilles (tab. 4.3). Le taux d'apparition des feuilles moyen pendant toute la période expérimentale, y compris pendant la repousse est de $0,22 \text{ feuille.j}^{-1}$ chez les plantes témoin et de $0,02 \text{ feuille.j}^{-1}$ chez les plantes soumises au froid. A la fin du traitement de température (première phase), chez les témoins à 2 feuilles, le taux d'apparition foliaire est supérieur à celui des plantes à 0 feuille. Pour le traitement froid, on n'observe pas d'effet de la coupe. Lors de la repousse, la variété Huia à 0 feuille du traitement témoin montre un taux d'apparition plus faible que les autres plantes. Chez les plantes issues du traitement froid, Aberherald à 2 feuilles tend à repousser plus vite que les autres plantes.

Le nombre total de feuilles émises est diminué par le froid. Chez les plantes témoin, le nombre total de feuilles émises est plus élevé chez les plantes à 2 feuilles que chez les plantes totalement défoliées. Aucune différence variétale n'est observée pour les deux températures considérées.

	TEMOIN (20/15°C)		FROID (5/0°C)	
	0F	2F	0F	2F
Première phase (feuilles.j ⁻¹) : J20-J48				
HUIA	0,21(b)	0,27(a)	0,03(a)	0,02(a)
ABERHERALD	0,22(b)	0,27(a)	0,03(a)	0,02(a)
<i>effet température : ***</i>				
Repousse (feuilles.j ⁻¹) : J48-J62				
HUIA	0,10(b)	0,21(a)	0,17(b)	0,18(ab)
ABERHERALD	0,17(a)	0,27(a)	0,17(b)	0,21(a)
<i>effet température : ns</i>				
Nombre total de feuilles émises				
HUIA	7,45(b)	10,72(a)	3,25(a)	3,31(a)
ABERHERALD	8,79(b)	11,14(a)	3,26(a)	3,64(a)
<i>effet température : ***</i>				

Tableau 4.3. Taux d'émission des feuilles et nombre total de feuilles émises chez le trèfle blanc, variété Huia et Aberherald, acclimatés au froid et soumis aux températures témoin 20/15°C et froides 5/0°C (1ère phase) puis en situation de repousse (+2°C/jour pour les plantes du traitement froid) après une défoliation. Nombre total de feuilles émises depuis le début de l'expérimentation. Les effets de température sont significatifs à $p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** et $p < 0,05$: * et non significatifs : ns d'après le test de Student. Les lettres différentes représentent des groupes de moyenne significativement différents entre eux au seuil de 5% pour chaque lot de température

Données morphologiques : La longueur totale des pétioles est réduite par le froid de manière significative (tab. 4.4). Dans le traitement froid, les plantes à 0 feuille adulte dépliée ont des pétioles aussi longs que les plantes à 2 feuilles. Aucune différence variétale ne s'exprime pendant le traitement de température. A l'issue de la repousse, les pétioles des plantes à 2 feuilles sont plus longs que ceux des plantes à 0 feuille, quelle que soit la température. La température subie par les plantes avant la repousse n'a pas d'effet sur la longueur des pétioles pendant cette période. Cependant, chez les plantes issues du froid, Aberherald à 2 feuilles montre des pétioles plus longs que Huia. La surface totale des feuilles est réduite par le froid (tab 4.4).

		TEMOIN (20/15°C)		FROID (5/0°C)	
Prélèvement		0F	2F	0F	2F
<u>Longueur des pétioles (mm)</u>					
Première phase	HUIA	241(b)	855(a)	176(a)	179(a)
	ABERHERALD	228(b)	860(a)	159(a)	201(a)
		<i>effet température : ***</i>			
Repousse	HUIA	18(b)	140(a)	29(c)	138(b)
	ABERHERALD	10(b)	161(a)	34(c)	192(a)
		<i>effet température : ns</i>			
Total	HUIA	241(c)	1003(b)	179(c)	290(b)
	ABERHERALD	267(c)	1227(a)	231(c)	376(a)
		<i>effet température : ***</i>			
<u>Surface foliaire totale (cm². plante⁻¹)</u>					
Première phase	HUIA	26(b)	71(a)	21(b)	20(b)
	ABERHERALD	29(b)	89(a)	19(b)	31(a)
		<i>effet température : ***</i>			
Repousse	HUIA	1(c)	16(b)	3(c)	17(b)
	ABERHERALD	1(c)	23(a)	4(c)	23(a)
		<i>effet température : ns</i>			
Total	HUIA	25(c)	86(b)	21(c)	36(b)
	ABERHERALD	34(c)	138(a)	27(bc)	54(a)
		<i>effet température : **</i>			
<u>Longueur totale des stolons (mm)</u>					
Première phase	HUIA	69(b)	196(a)	35(a)	40(a)
	ABERHERALD	95(b)	215(a)	33(a)	46(a)
		<i>effet température : ***</i>			
Repousse		ND	ND	ND	ND
Total	HUIA	79(d)	231(b)	37(b)	53(b)
	ABERHERALD	161(c)	267(a)	43(b)	80(a)
		<i>effet température : ***</i>			

Tableau 4.4. Longueur des pétioles et du stolon et surface foliaire totale du trèfle blanc variété Huia et Aberherald, acclimatés au froid et soumis aux températures témoins 20/15°C et froides 5/0°C (première phase) puis en situation de repousse (+2°C/jour pour les plantes du traitement froid) et cumul depuis le début de l'expérience (total). Les effets de température sont significatifs à $p < 0,0001$: *** ; $p < 0,01$: ** et $p < 0,05$: * et non significatifs : ns d'après le test de Student. Les lettres différentes représentent des groupes significativement différents entre eux au seuil de 5% pour chaque lot de température et pour chaque date de prélèvement. ND : non déterminé.

Pendant les deux phases de traitement (au froid et pendant la repousse) Aberherald à 2 feuilles montre une surface totale plus élevée que Huia. Il n'y a pas de différence variétale significative lorsque la plante est totalement défoliée.

La longueur des stolons est réduite par le traitement froid même après la période de repousse (tab. 4.4). Les stolons des plantes témoin à 0 feuille sont plus courts que ceux des plantes témoin à 2 feuilles pendant toute la durée de l'expérimentation (-30 à -40% de longueur chez les plantes à 0 feuille par rapport aux plantes à 2 feuilles). Cette différence entre coupe n'est pas significative chez les plantes soumises au froid. A la fin de l'expérimentation, les plantes à deux feuilles ont des stolons plus longs que les plantes qui avaient été maintenues à 0 feuille, sauf pour la variété Huia issue du froid. Aberherald montre en général des stolons plus longs que Huia (+ 40 à 50% chez les plantes à 0 feuille et + 15 à 20% chez les plantes à 2 feuilles respectivement). Cette différence s'explique surtout par une réduction de la longueur des entrenœuds plus importante chez Huia puisque le nombre de feuilles n'est pas différent entre les deux variétés.

La masse linéique des stolons augmente chez les plantes soumises au froid et reste constante chez les témoin (tab 4.5). Chez les plantes soumises au froid à la fin du traitement de température, les stolons de Aberherald à 2 feuilles sont plus épais que ceux des autres plantes. Après la période de repousse, la masse linéique des stolons des plantes issues du traitement froid a chuté et atteint des valeurs voisines de 15 mg.cm^{-1} . Elle reste supérieure aux autres chez Aberherald et Huia à deux feuilles.

La matière sèche totale des plantes n'est pas significativement affectée par le froid (tab 4.5). Aucune différence entre variétés ni entre coupe ne s'observe pendant la période de froid. A la fin de l'expérimentation, les plantes à 2 feuilles ont une matière sèche significativement plus élevée que les plantes à 0 feuilles. Aberherald montre une matière sèche toujours plus importante que Huia, quelle que soit la coupe considérée.

		TEMOIN (20/15°C)		FROID(5/0°C)	
		0F	2F	0F	2F
<u>Masse linéique des stolons (mg.cm⁻¹)</u>					
Première phase	HUIA	9,6(a)	8,2(a)	16,5(b)	22,5(b)
	ABERHERALD	11,0(a)	8,5(a)	20,1(b)	30,4(a)
<i>effet température : ***</i>					
Total	HUIA	7,5(a)	6,3(a)	11,4(b)	13(ab)
	ABERHERALD	8,6(a)	7,9(a)	16,6(a)	16,4(a)
<i>effet température : **</i>					
<u>Masse totale de la plante (mg de MS.plante⁻¹)</u>					
Première phase	HUIA	363(b)	585(a)	455(b)	595(b)
	ABERHERALD	408(b)	660(a)	453(b)	823(a)
<i>effet température : ns</i>					
Total	HUIA	343(c)	775(ab)	380(c)	595(b)
	ABERHERALD	568(bc)	1088(a)	570(b)	960(a)
<i>effet température : ns</i>					

Tableau 4.5 : Masse linéique des stolons de trèfle blanc et masse totale de la plante, Huia et Aberherald à la fin du traitement de température (première phase) et de l'expérimentation (total). Les effets de température sont significatifs à $p < 0,001$: *** ; $p < 0,01$: ** et $p < 0,05$: * et non significatifs : ns d'après le test de Student. Les lettres différentes représentent des groupes significativement différents entre eux au seuil de 5% pour chaque lot de température et chaque date de prélèvement.

Echanges gazeux : Le froid diminue l'assimilation nette de manière significative pour les deux variétés (tab 4.6). Lors de la repousse, l'assimilation nette des plantes soumises au froid est supérieure à celle des plantes témoin. L'assimilation nette n'est pas significativement différente entre les deux variétés.

L'efficacité de la photosynthèse n'est pas modifiée pendant les traitements de température (fig. 4. 8). Par contre, lors de la période de repousse, les plantes issues du traitement froid montrent une efficacité de photosynthèse plus élevée que les plantes issues du traitement témoin et Huia a tendance à montrer une efficacité de photosynthèse plus élevée que Aberherald.

	TEMOIN		FROID	
	HUIA	ABERHERALD	HUIA	ABERHERALD
Assimilation nette ($\mu\text{moles CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)				
P1	15,4(a)	15,9(a)	15,4(a)	15,9(a)
P2	17,2(a)	17,6(a)	13,2(a)	5,1(b)
P3	14,9(a)	14,0(ab)	5,5(b)	8,0(ab)
P4	17,9(a)	15,2(a)	17,1(a)	18,6(a)

Tableau 4.6 Assimilation nette des feuilles de trèfle blanc variété Huia et Aberherald, maintenues à 2 feuilles et soumises à deux températures : témoin : 20/15°C et froid : 5/0°C (P1, P2 et P3 : prélèvements) et après la période de repousse (P4). Les lettres différentes représentent les groupes de valeurs significativement différents entre eux selon le test de student au seuil de 5% (date par date).

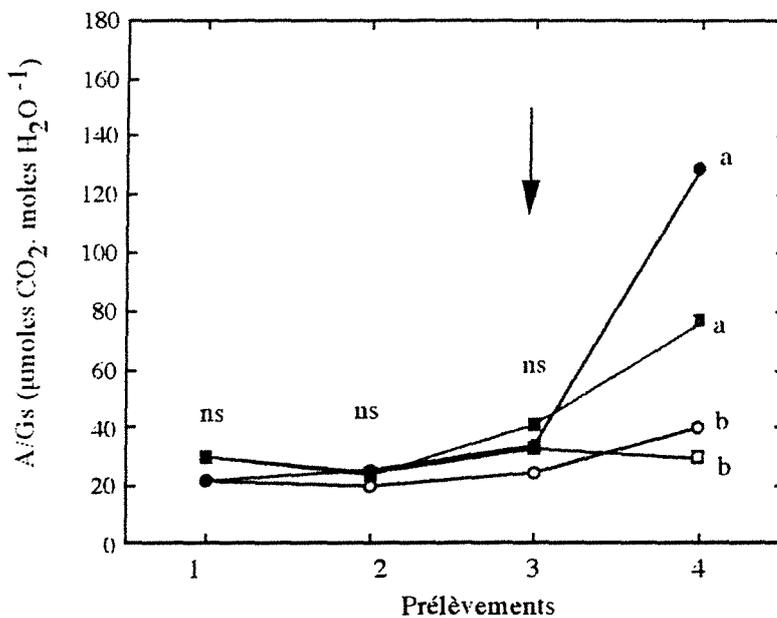


Figure 4.8. Efficacité de la photosynthèse des plantes de trèfle Huia ○ et Aberherald □ acclimatés au froid et soumis à deux températures : témoin (20/15°C) (symboles ouverts) et froid (5/0°C) (symboles fermés). L'efficacité est déterminée par le rapport de l'assimilation nette (A) sur la conductance (Gs). La flèche indique le début de la période de repousse. Les lettres différentes indiquent les groupes statistiquement différents entre eux au seuil de 5% selon le test de Student, ns : non significativement différent.

Fluorescence chlorophyllienne : le rapport F_v/F_m mesuré à l'obscurité diminue chez les plantes soumises au froid de manière significative et reste constant chez les plantes témoin (fig. 4.9 A). Il passe de 0,85 chez les plantes témoin à une moyenne de 0,70 chez les plantes soumises au froid. Bien que les variétés ne soient pas différentes entre elles, au troisième prélèvement, le rapport F_v/F_m a tendance à être plus faible chez Huia que chez Aberherald. Lors de la repousse, le rapport F_v/F_m des plantes soumises au froid est équivalent à celui des plantes témoin.

Le rapport dF/F_m diminue également chez les plantes soumises au froid et reste constant chez les plantes témoin (fig. 4.9 B). A la fin de la période de traitement de température, chez les plantes soumises au froid, la variété Huia montre un rapport significativement plus faible que pour Aberherald (0,4 contre 0,6 respectivement). Lors de la repousse, les plantes soumises au froid retrouvent un niveau équivalent au plantes témoin et aucune différence variétale n'est observable.

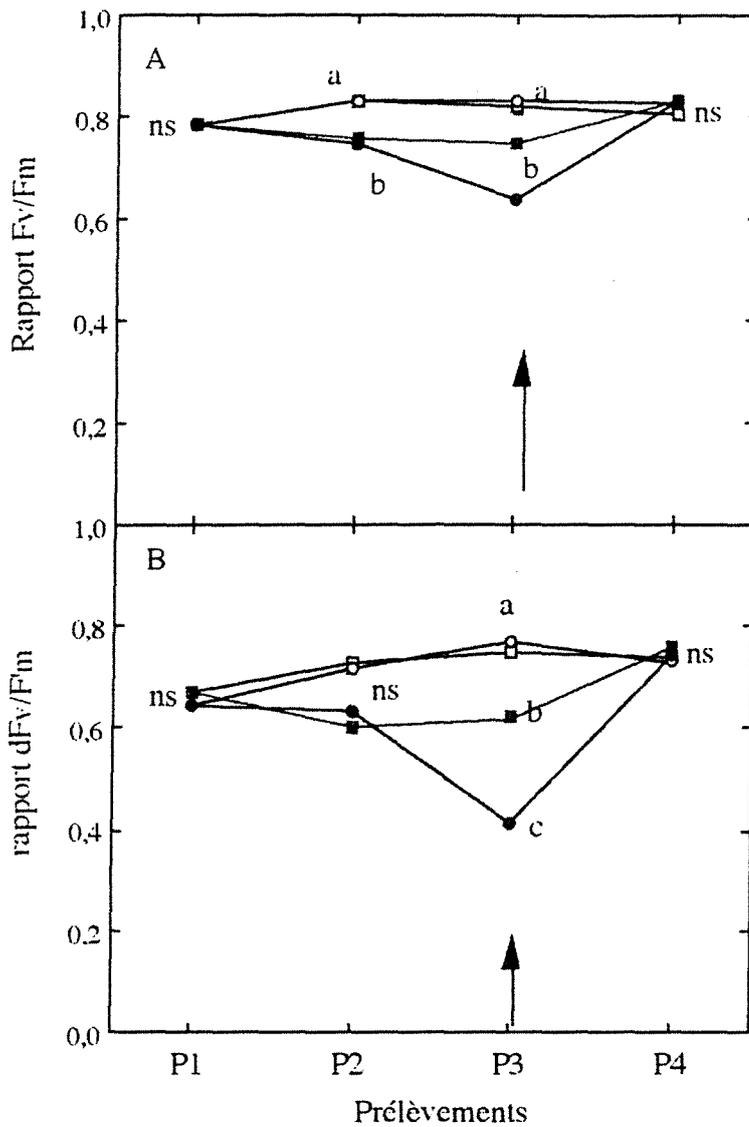


Figure 4.9. Mesures de fluorescence chlorophyllienne des feuilles de trèfle variété Huia \circ et Aberherald \square soumis à deux températures : témoin (20/15°C) (symboles ouverts) et froids (5/0°C) (symboles fermés) et à un réchauffement de 2°C/heure après le troisième prélèvement (flèches noires). Les résultats sont exprimés en rapport F_v/F_m et dF_v/F_m . Les groupes statistiquement différents entre eux sont représentés par des lettres différentes selon le test de Student au seuil de 5% , ns : non significatif.

Réserves carbonées : La teneur en amidon des stolons et des racines diminue plus vite chez les plantes soumises au froid que chez les plantes témoins (40 mg.g⁻¹ MS et 74 mg.g⁻¹ MS dans les stolons froid et témoin respectivement) (fig 4.10).

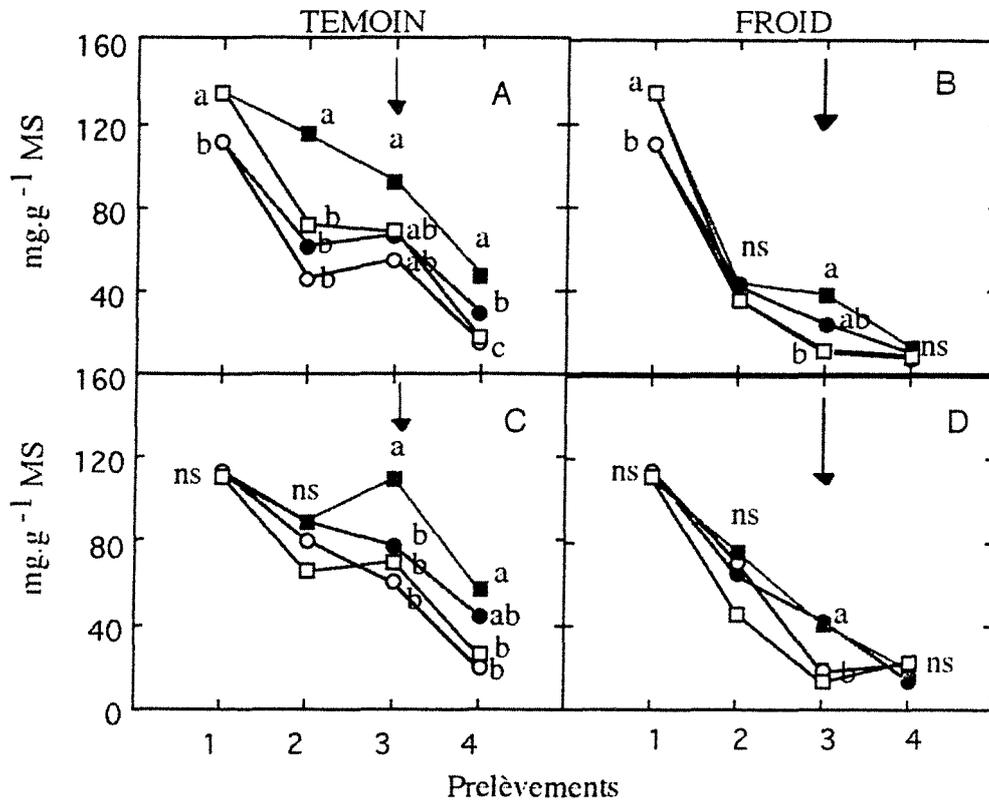


Figure 4.10. Teneurs en amidon des stolons (A et B) et des racines (C et D) de trèfle blanc variété Huia O et Aberherald □ soumis à deux températures : témoin (20/15°C) et froid (5/0°C) puis à un réchauffement de +2°C/heure à partir du troisième prélèvement jusqu'à la température témoin (flèches noires). Les plantes sont maintenues au stade 2 feuilles (symboles fermés) ou au stade 0 feuille (symbole ouvert). Les lettres différentes représentent les groupes de valeurs statistiquement différents entre eux, selon le test de Student au seuil de 5%, ns : non significatif.

La variété Aberherald présente plus d'amidon que la variété Huia dans ses stolons mais uniquement chez les plantes témoin. Les plantes à 2 feuilles possèdent en général plus d'amidon que les plantes à 0 feuille, lors des traitements de température.

Lors de la repousse, l'amidon est consommé aussi bien chez les plantes issues des conditions témoin que chez les plantes issues du froid. La teneur moyenne en amidon des stolons est de 28

mg.g-1 MS dans les stolons des plantes témoin et de 11 mg.g-1 MS dans les stolons des plantes issues du froid à la fin de la période de repousse. Elle est moins forte chez les plantes à 2 feuilles issues du traitement témoin que chez les plantes à 0 feuille. L'évolution et la quantité d'amidon dans les racines sont similaires à celle des stolons quels que soient les traitements considérés.

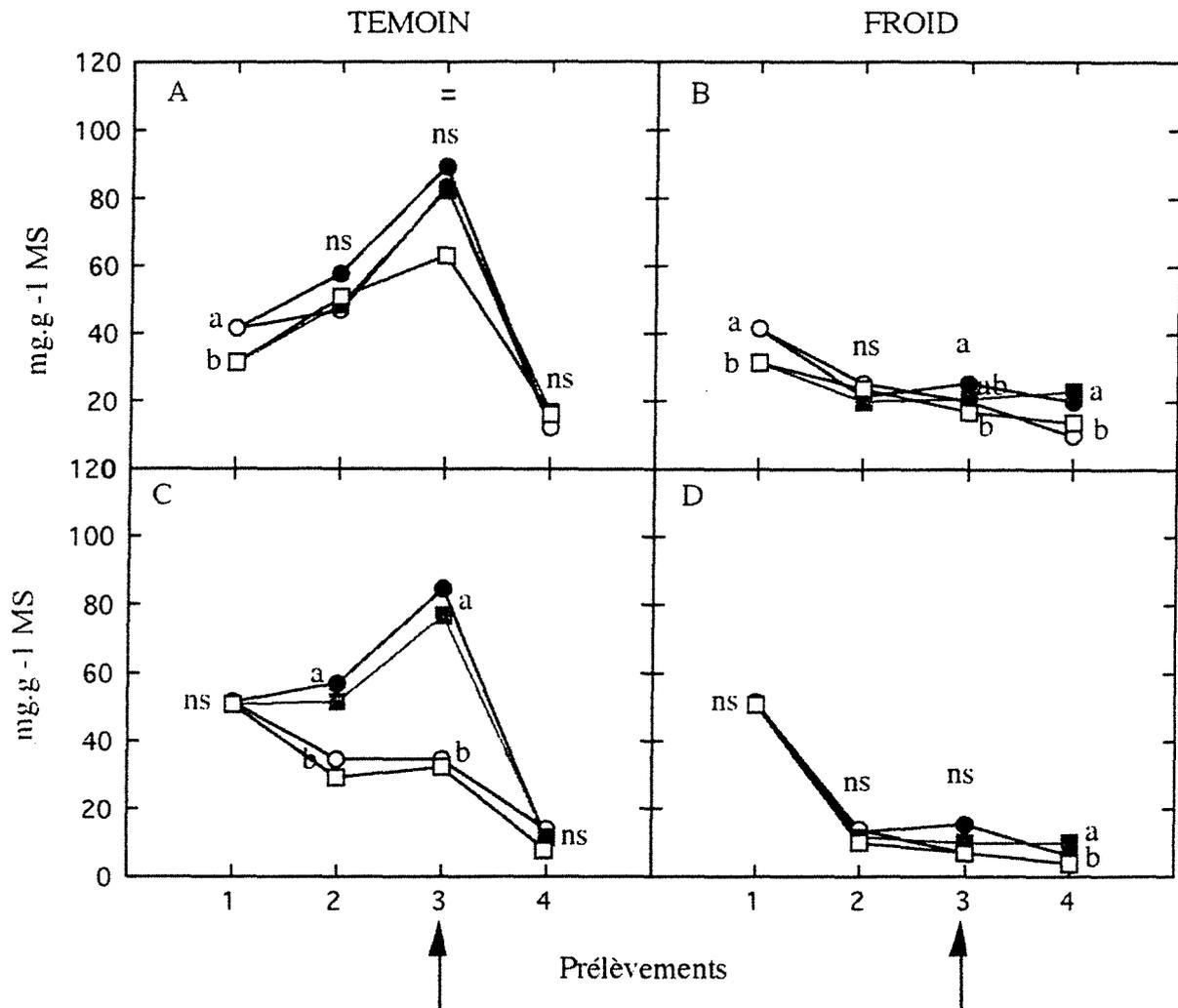


Figure 4.11. Teneurs en sucres solubles des stolons (A et B) et des racines (C et D) de trèfle blanc variété Huia \circ et Aberherald \square soumis à deux températures : témoin (20/15°C) et froid (5/0°C) puis à un réchauffement de +2°C/heure à partir du troisième prélèvement jusqu'à la température témoin (flèches noires). Les plantes sont maintenues au stade 2 feuilles (symboles fermés) ou au stade 0 feuille (symbole ouvert). Les lettres différentes représentent les groupes de valeurs statistiquement différents entre eux selon le test de student au seuil de 5% , ns : non significatif.

La teneur en sucres des stolons et des racines diminue chez les plantes soumises au froid et augmente chez les plantes soumises aux conditions témoin pendant toute la durée du traitement de température (fig 4.11). Dans les racines témoin, les plantes à 2 feuilles ont significativement plus de sucres que les plantes à 0 feuille. Aucune différence variétale n'est observée pendant les traitements de température.

Lors de la repousse, les teneurs en sucres des stolons et des racines des plantes témoin diminuent et atteignent le niveau des plantes issues du froid (20 mg.g⁻¹ MS) qui lui, n'est pas modifié par l'augmentation de température et la défoliation. Chez les plantes issues du froid, les plantes à 2 feuilles possèdent plus de sucres dans leurs stolons et racines que les plantes à 0 feuille à la fin de la période de repousse.

2.4. Discussion :

Effet du froid sur la morphogénèse, les échanges gazeux et les réserves carbonées du trèfle blanc :

Le taux d'émission des feuilles est ralenti en période froide et nos résultats sont similaires à ceux de Davies et Evans (1982) qui observent la production d'une nouvelle feuille tous les 50 jours en hiver en plein champ. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la réduction du taux d'apparition des feuilles du trèfle blanc en période froide :

i) Le carbone récent est limitant ; le froid limite la photosynthèse nette de la plante (Woledge et Tewson, 1989 ; Koscielniak, 1993). Nos résultats confirment cette première hypothèse. Il en résulte une diminution de l'entrée globale de carbone dans la plante sous l'effet du froid. D'après les mesures de fluorescence chlorophyllienne, la diminution de l'assimilation nette de CO₂ peut provenir d'une altération de l'efficacité photochimique du photosystème 2 (PSII) induite par le froid, reconnue par une diminution du rapport Fv/Fm (Tyystjärvi *et al.*, 1994). La diminution du rapport dF/F'm, mesurée à la lumière montre que le rendement

photochimique du PSII diminue et qu'une partie de l'énergie est dissipée sous une forme différente de la fluorescence, sous forme thermique par exemple.

-ii) les réserves sont limitantes pour la production de nouveaux tissus : d'après nos résultats, lors du traitement froid, l'amidon et les sucres solubles de réserves des stolons et des racines sont consommés, ceci peut limiter la fourniture de carbone pour la production de nouveaux tissus ; le ratio de l'offre/demande en carbone semble donc modifié par le froid (Vez, 1961 ; Boller et Nösberger, 1983 ; Côme, 1992). Cependant, la teneur en amidon ne semble pas expliquer le taux d'apparition des feuilles. En effet, la fourniture en carbone néoassimilé et en carbone de réserves, supérieure chez les plantes à 2 feuilles, n'implique pas de différence dans le taux d'émission des feuilles. Le carbone assimilé par les plantes en période froide ainsi que le carbone de réserves (amidon et sucres solubles) ne sont pas uniquement destinés à la synthèse de nouveaux tissus. L'hypothèse du carbone de réserve limitant le taux d'apparition des feuilles de trèfle blanc pendant une période froide ne semble donc pas vérifiée par nos résultats. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que les sucres étaient impliqués en partie dans la protection osmotique des cellules de trèfle blanc contre le froid. Le carbone mis en réserves par la plante et consommé pendant le froid a donc bien d'autres rôles à jouer que la fourniture d'assimilats pour la croissance de la plante. Il peut également être utilisé pour le maintien du métabolisme. Une autre hypothèse que nous ne pouvons pas vérifier ici serait que la vitesse de transport des assimilats soit réduite par les faibles températures, le flux de carbone des organes de réserves vers les organes de croissance serait trop faible pour permettre un développement du trèfle.

Enfin, nous pouvons émettre une autre hypothèse ne faisant pas intervenir le rôle des réserves carbonées dans la réduction de la production des feuilles, il s'agirait d'un effet direct des basses températures sur l'activité des méristèmes qui conduirait alors à un ralentissement du rythme d'émission des feuilles (Côme, 1992).

Repousse du trèfle après une période de froid :

L'objectif de cette période de repousse était d'observer la contribution des réserves carbonées dans la reprise de la morphogénèse. La reprise de morphogénèse du trèfle blanc se caractérise par une augmentation de la photosynthèse, et une meilleure efficacité de cette photosynthèse chez les plantes issues du froid, une augmentation du taux d'émission des feuilles, de la taille des pétioles et des feuilles.

Nous pouvons émettre les mêmes hypothèses que pendant l'exposition des plantes au froid quant à l'existence d'un rôle des composés carbonés dans la repousse du trèfle blanc. Ces composés carbonés sont alors soit limitants, soit non limitants pour la morphogénèse du trèfle. Dans l'hypothèse où ils ne sont pas limitants, on peut supposer que la fourniture de carbone par photosynthèse soit suffisante pour permettre la croissance des nouveaux tissus. Cependant, les réserves accumulées dans les stolons et les racines sont consommées pendant la période de repousse comme l'ont observé Eagles et Othman, 1986 ; Côme, 1992. Deux hypothèses peuvent expliquer la consommation des réserves que nous observons pendant la période de repousse, i) cette consommation correspond à une fourniture d'énergie pour la reprise du métabolisme après le froid, lorsque l'offre en assimilats par photosynthèse n'est pas encore suffisante (Eagles et Othman, 1988 ; Ashworth *et al.*, 1993). ii) elle correspond à la mobilisation des réserves après la défoliation puisque les plantes témoin montrent également une consommation de l'amidon et des sucres (Chapman *et al.*, 1991). Cette consommation a déjà été observée chez le trèfle après une coupe, et ce, jusqu'à ce que les produits de la photosynthèse soient suffisants pour assurer la fourniture d'énergie nécessaire au métabolisme (Danckwerts et Gordon, 1989). D'après nos résultats, il semble que les deux hypothèses se vérifient, l'amidon stocké dans les stolons est utilisé dans les deux cas : lors d'une repousse après défoliation et lors d'une repousse après une période de froid.

Malgré cette consommation des réserves observée pendant la période de repousse, la teneur en amidon des stolons et des racines ne semble pas limiter la morphogénèse du trèfle blanc. En effet, les plantes présentant une forte teneur en amidon (variété Aberherald et plantes à 2

feuilles) ne montrent pas de différences dans les taux d'émission des feuilles. Par contre, la teneur en amidon semble plus impliquée dans la morphologie du trèfle blanc puisque les plantes qui sont le mieux pourvues en amidon montrent des feuilles plus grosses, des pétioles plus longs et des matières sèches totales plus fortes. Ces caractéristiques morphologiques sont reconnues comme déterminantes dans les potentialités de repousse printanière (Davies et Evans, 1982). Des rendements élevés en matière sèche chez le trèfle après la période hivernale peuvent donc s'expliquer en partie par des plantes à forte teneur en amidon. Cependant, l'effet variétal peut également influencer la reprise printanière du trèfle blanc. La variété Aberherald montre un développement de ses organes supérieur à Huia, ce qui peut laisser envisager des différences de rendement printanier en plein champ. Comme l'avaient déjà observé Boller et Nösberger (1983), des différences de taille des feuilles et de pétioles entre variété peuvent conduire à des rendements supérieurs et définir ainsi une meilleure survie aux conditions hivernales.

Ces résultats montrent donc que la quantité de réserves présente dans les stolons et les racines du trèfle blanc avant une période de repousse ne conditionne pas le fonctionnement des méristèmes mais plus la morphologie de la plante.

Les effets du froid sur la morphogénèse et la morphologie du trèfle blanc sont réversibles. En effet, la croissance des plantes ayant subi la période de froid est identique à celle des plantes issues des conditions témoin. L'élévation de la température semble donc agir comme une levée de dormance des méristèmes qui reprennent leur activité sans arrière effet du froid.

2.5. Conclusion :

Cette expérimentation a permis dans un premier temps d'aborder des notions d'écophysiologie du trèfle blanc. Les résultats observés en plein champ et lors des premières expérimentations en conditions contrôlées sont confirmés. La diminution du taux d'émission des feuilles induite par le froid peut être expliquée par une **réduction de l'assimilation nette de CO₂** (fig 4.12). Celle-ci semble provenir essentiellement d'une perte de rendement photochimique du PSII. Il apparaît clairement que **l'amidon et les sucres solubles sont impliqués dans les phénomènes de**

repousse. Nos résultats ne nous permettent pas encore de déterminer le rôle des sucres solubles dans la repousse du trèfle. Nous avons pu montrer que l'amidon contribuait à la repousse du trèfle blanc par la fourniture de carbone, cependant nous n'avons pas accès à la dynamique des sucres solubles libérés par hydrolyse. Des analyses plus fines, de mobilisation des sucres et de suivi de flux à travers la plante sont indispensables pour accéder à ce genre de résultat.

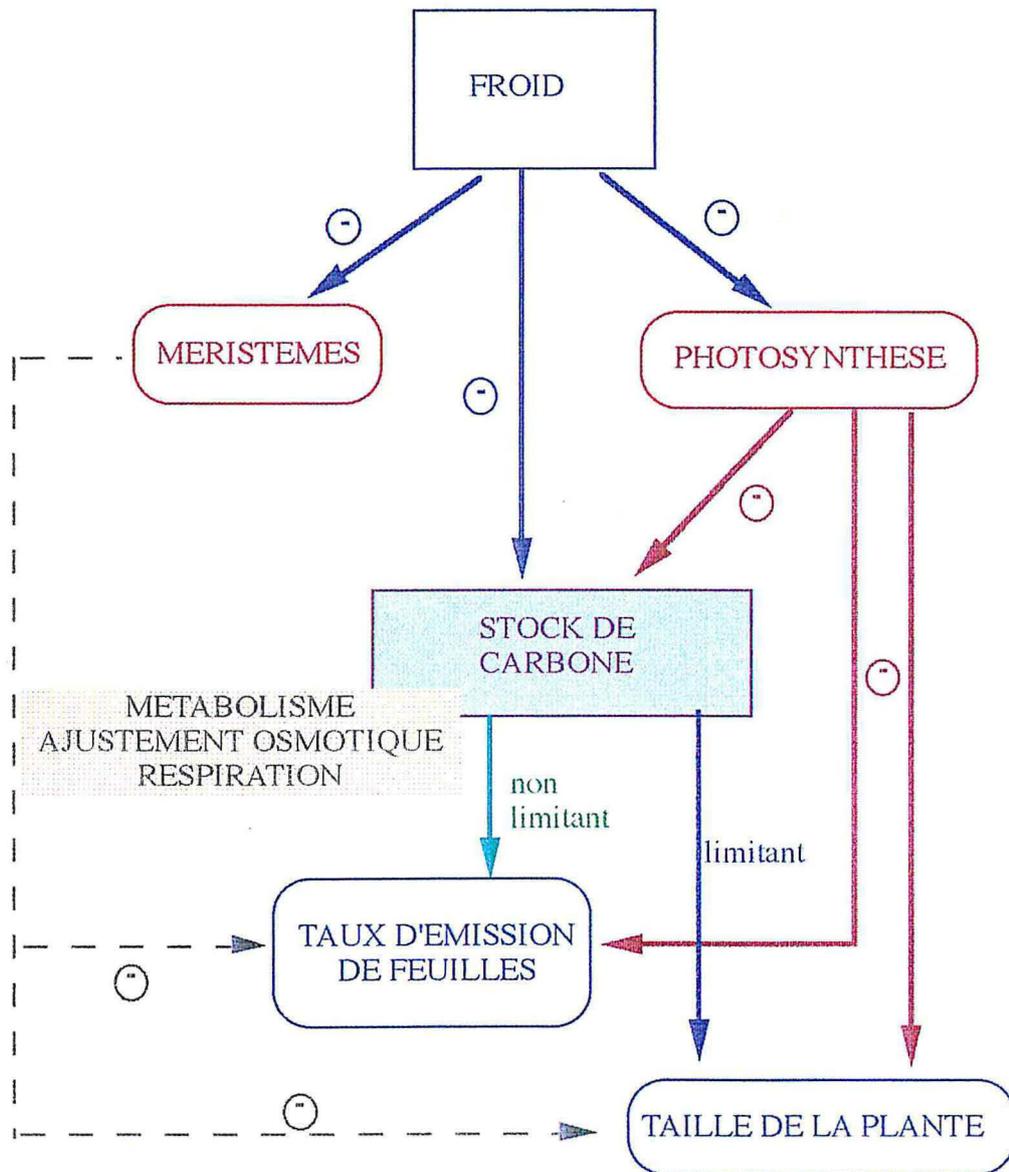


Figure 4.12 : Schéma de synthèse des effets du froid sur le développement du trèfle blanc. Rôle du stock de carbone dans la morphogénèse et le métabolisme.

Dans un deuxième temps, nous pouvons considérer nos résultats d'un point de vue agronomique. Au début du printemps, des feuilles larges et des pétioles longs permettront à la plante d'accroître l'entrée de carbone total et détermineront un potentiel de rendement printanier supérieur. La variété Aberherald semble donc présenter un potentiel de repousse printanière supérieur à Huia, elle semble donc bien indiquée pour une utilisation dans les climats tempérés froids.

CHAPITRE V. CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail est de répondre aux questions soulevées principalement à l'issue de la revue bibliographique : les composés carbonés qui s'accumulent en automne dans les stolons et les racines du trèfle blanc contribuent-ils à la survie hivernale du trèfle blanc ? Il s'agissait aussi de caractériser le comportement hivernal du trèfle blanc sur de longues périodes avec des fréquences de prélèvement rapprochées. En rappelant tout d'abord les effets du froid sur le trèfle blanc que nous avons observé, nous évoquerons ensuite la reprise printanière. Nous essaierons ensuite d'analyser les effets du froid sur le trèfle blanc: en réponse au froid, les mécanismes mis en place sont-ils de la tolérance, de la résistance ou des évitements? Peut on parler d'adaptation du trèfle blanc aux basses températures ? Une dernière partie de ce chapitre sera consacrée aux perspectives qui peuvent être élaborées à partir des résultats.

Les principales modifications morphologiques enregistrées chez le trèfle blanc pendant l'hiver en climat semi-tempéré (nos conditions) sont :

- une réduction des rythmes d'apparition des feuilles,
- un ralentissement de l'allongement des stolons
- une diminution de la surface foliaire.
- un accroissement de la masse linéique des stolons

Les modifications métaboliques que nous avons mises en évidence sont l'accumulation de composés carbonés (amidon et sucres solubles) à l'automne et leur consommation pendant l'hiver.

Les analyses en composantes principales et les régressions linéaires nous ont permis de montrer que la vitesse d'apparition des feuilles est sous la dépendance de la température.

Cependant, d'autres facteurs environnementaux influencent la morphogénèse du trèfle : le rayonnement global, la pluviométrie... Grâce aux expérimentations conduites en conditions contrôlées, certains effets propres aux basses températures ont été identifiés sur la morphogénèse et le métabolisme du trèfle.

Nous avons alors observé que les périodes de gel/dégel simulées en conditions contrôlées conduisaient aux mêmes modifications morphologiques et biochimiques chez le trèfle blanc que celles observées en plein champ : réduction de la biomasse des feuilles, consommation d'amidon et de sucres solubles pendant l'hiver. Ainsi, l'évolution des paramètres morphologiques et physiologiques chez le trèfle blanc en hiver est plus une réponse à une alternance de périodes de gel/dégel qu'à un effet prolongé des basses températures supérieures à 0°C. Des gelées moyennes mais brutales (que nous avons appliquées en conditions contrôlées), qui surviennent après une période prolongée de redoux risquent donc d'être plus sévères que des gelées intenses mais progressives. Nous pouvons donc conclure que les gelées précoces et intenses que nous avons observées en novembre 1993 sont à l'origine de la forte mortalité des feuilles relevée après cette période de froid précoce et que les périodes de froid survenues en janvier ou en février lors des autres hivers n'ont pas de conséquences aussi néfastes puisqu'elles apparaissent plus progressivement. Nous soulignons donc ici le rôle de l'endurcissement automnal qui se produit chez le trèfle et qui montre que le trèfle est une plante adaptée aux modifications saisonnières de climat. La simple chute des températures permet cet endurcissement en conditions contrôlées alors que la photopériode et l'intensité restent constantes.

En hiver, le nombre moyen de feuilles par axe de stolon que nous avons dénombré est de 1,6. Les expérimentations conduites en phytotron nous montrent que la situation à 2 feuilles n'est pas limitante pour la survie hivernale ni pour la reprise printanière. L'activité photosynthétique existe encore même si elle est fortement ralentie. Les résultats de cette expérimentation se rapprochent beaucoup de ceux que nous avons obtenus en plein champ, en ce qui concerne la consommation des réserves.

Un deuxième facteur vient donc s'ajouter à la notion de cycles de gel/dégels, il s'agit de la situation morphologique du trèfle blanc en plein champ au moment où celui-ci aborde l'hiver.

Nos expérimentations ont intégré une comparaison variétale. La variété Huia est la plus utilisée en Europe. Aberherald a été sélectionné au Pays de Galles à partir de cultivars alpins, pour "une meilleure tolérance au froid et une meilleure reprise printanière". La variété Aberherald montre :

- une masse linéique des stolons élevée impliquant une plus forte teneur en amidon par unité de longueur ;
- des feuilles plus grosses permettant une entrée de carbone plus importante ;
- un potentiel de reprise printanière élevé ;

La variété Aberherald semble donc posséder une valeur adaptative supérieure à la variété Huia, vis à vis des basses températures. Dans les autres pays impliqués dans le programme COST, Aberherald ressort également comme une variété à plus forte croissance printanière que la variété Huia (rapports annuels de 1993 et 1994).

La période hivernale détermine donc les potentialités de rendement de la première coupe. La reprise de la morphogénèse est observée, dans nos conditions, lorsque la température dépasse 7°C. Les feuilles plus grosses, un allongement des pétioles plus fort que chez Huia ainsi qu'un taux d'apparition légèrement plus élevé expliquent les meilleurs rendements printaniers de Aberherald par rapport à Huia. Cette variété se retrouve alors en situation plus favorable de compétition avec le ray-grass au printemps et l'ensemble de ces avantages peut conduire à des différences de rendement non négligeables lors de la période de production.

Pendant la période de repousse, nous avons montré que les réserves présentes au printemps dans les stolons et les racines du trèfle blanc étaient impliquées dans la croissance des organes émis, avant que la photosynthèse soit suffisamment efficace pour assurer cette fonction. Mais la quantité des réserves présentes dans les stolons et les racines ne semble pas limitante. De plus, nous n'avons pas pu attribuer de rôle déterminant des sucres solubles dans la tolérance au froid du trèfle blanc, malgré un effet osmotique permettant de lutter contre le gel.

D'après nos résultats, nous pouvons énoncer quelques mécanismes développés chez le trèfle et impliqués dans la survie hivernale :

- la **capacité à s'endurcir** pendant l'automne par une accumulation de réserves carbonées que l'on peut résumer comme une **adaptation** aux modifications climatiques saisonnières ;
- la capacité à développer un ajustement osmotique pour assurer une protection des cellules et **éviter** les effets déshydratants du gel qui semble donc être un mécanisme actif de **résistance de la plante contre le gel**
- la capacité à maintenir un nombre de feuilles suffisant pour permettre une activité photosynthétique pendant l'hiver et limiter la consommation des réserves
- une **valeur adaptative** supérieure chez Aberherald qui conduit à une meilleure reprise printanière.

La figure 5.1 résume l'ensemble des résultats que nous avons obtenus lors de cette étude et les compare à la figure 1.12 qui avait été élaborée à partir des connaissances actuelles de la littérature.

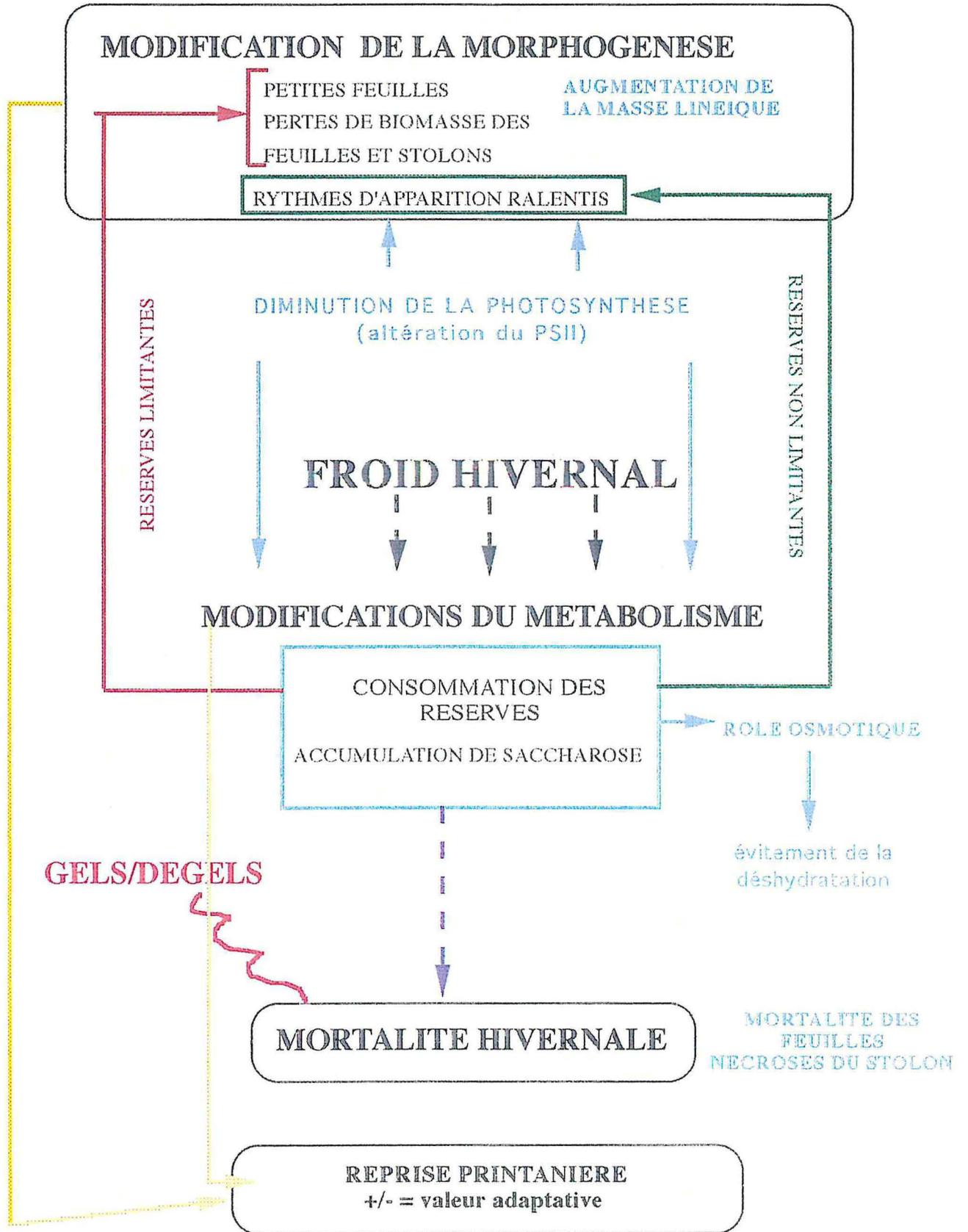


Figure 5.1. Effets des basses températures sur le trèfle blanc. Comparaison des résultats obtenus avec le schéma de synthèse bibliographique (fig 1.12).

D'un point de vue agronomique, cette démarche visant à caractériser les réponses du trèfle blanc aux conditions hivernales apparaît comme un préalable à des fins d'amélioration du matériel végétal. Des gènes de résistance au froid pourraient dans l'avenir être identifiés chez certaines variétés de trèfle blanc et permettre ainsi la création de nouveaux cultivars. Dans un objectif d'extensification des prairies, la persistance des espèces utilisées conduit à une diminution des coûts d'exploitation. De plus, des variétés à forte teneurs en glucides peuvent présenter un intérêt dans l'alimentation du bétail par une meilleure appétance du trèfle.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE :

Nos travaux nous ont permis d'avancer dans la description du comportement hivernal du trèfle blanc. L'absence de résultats confirmant le rôle des réserves carbonées dans la survie hivernale du trèfle blanc peut provenir de nos conditions expérimentales. Nous avons choisi de travailler sur des périodes longues de traitement, le nombre de répétitions était alors réduit compte tenu des contraintes d'espace mais également des exigences de prélèvement. L'ajustement osmotique a pu être observé chez les trèfles soumis au froid grâce à ces expérimentations à long terme. Il est donc nécessaire de continuer à travailler sur des expérimentations de longue durée mais on peut envisager de réduire le nombre de prélèvements. Ceci permettrait alors d'augmenter le nombre de répétitions par traitement, et d'obtenir ainsi des résultats plus significatifs.

Pour affiner le rôle des réserves carbonées dans la survie hivernale du trèfle blanc, un élargissement du nombre de variétés utilisées est envisagé en incluant les lignées issues des climats très contrastés, capables de survivre aux hivers très rigoureux de l'Islande, de la Finlande ou de la Suède. Les mécanismes mis en place par ces lignées pourront être

comparés avec les réponses des plantes moins adaptées. L'étude de l'interaction génotype / environnement pourrait alors faire apparaître des relations différentes entre les réserves carbonées et la morphogénèse pour chaque cultivar testé.

Une méthode serait tout à fait indiquée à l'issue de cette étude pour suivre la contribution des réserves carbonées dans la tolérance au froid du trèfle blanc et dans sa reprise de croissance. Il s'agirait de réaliser un bilan de carbone chez le trèfle blanc en période de froid ainsi que de suivre les flux de carbone entre les différents organes. Un marquage plante entière au carbone 14 réalisé au début de la période d'acclimatation nous permettrait de suivre la cinétique de mise en réserves de ce carbone. En appliquant ensuite des traitements de température similaires à ceux que nous avons pratiqué, nous pourrions suivre les flux de carbone dans la plante au cours d'une période froide et lors d'une repousse. Des expérimentations supplémentaires consistant en des marquages ponctuels, d'une jeune feuille adulte, au moment du traitement froid et de la repousse permettraient alors de comparer la mobilisation du carbone récent à celle du carbone provenant des réserves observée en première expérimentation.

Nos travaux ouvrent la voie à de nouvelles orientations dans l'étude écophysiological du développement du trèfle blanc en plein champ. Nous avons mis en évidence le développement d'un ajustement osmotique chez des plantes de trèfle endurcis au froid. Cependant, les sucres solubles ne semblent pas être les constituants majoritairement responsables de cette concentration en solutés de la cellule. Il serait alors intéressant d'approfondir l'étude par la détermination qualitative et quantitative des autres composés impliqués dans cet ajustement osmotique, notamment les acides aminés, les protéines de réserve et les éléments minéraux.

Une deuxième voie d'étude physiologique peut concerner le rôle des membranes dans la protection du trèfle contre le gel. Nous avons vu que les alternances de gel/dégel peuvent provoquer la mort des feuilles de trèfle. Les membranes sont reconnues par de nombreux

auteurs comme des barrières contre la formation de glace grâce à l'accumulation de protéines spécifiques. Ces protéines sont modifiées de manière quantitative mais également qualitative, il serait alors intéressant de déterminer ces modifications induites par le froid chez le trèfle blanc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGRESTE , "La statistique agricole annuelle, résultats provisoires de 1994, données chiffrées", *Ministère de l'agriculture et de la pêche*, 1994.
- ANDRIEU J., "Valeur alimentaire des associations graminées-trèfle blanc et prévision de leur valeur nutritive", *Supplément de la revue Fourrages*, 1983, **94-95** : 145-160.
- ARREGUI M.C. "Contribution à l'étude des facteurs morphogénétiques et trophiques (C,N) de la compétition dans les associations trèfle-blanc (*Trifolium repens* L.) - ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.)", 1990, *Thèse de doctorat de 3ème cycle. Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II)* .,
- ASHWORTH E.N. ; STIRM V.E. et VOLENEC J.J., "Seasonal variation in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L.", *Tree Physiology*, 1993, **13** : 379-399.
- BARNES J.D. ; WILSON J.M., "Effects of hormones on morphogenesis and cold resistance in Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.)", *Journal of Experimental botany*, 1986, **37 (183)** : 1542-1551.
- BEINHART G., "Free sugar concentration in White Clover, *Trifolium repens* L., grown at different temperatures and light intensities", *Crop Science*, 1964, **4** : 625-631.
- BERGMEYER H.U. ; BERNT E. ; SCHMITT F. et STORK H., "Methods of enzymatic analysis (H.U. Bergmeyer, ed)", *Academic Press, New York*, 1974, **3** : 1176-1179.
- BERTRAND A. et PAQUIN R., "Influence de la température d'endurcissement sur la tolérance au gel de la luzerne et sa teneur en sucres, amidon et proline", *Can.J.Plant Sci.*, 1991, **71** : 737-747.
- BESNARD A.; ARNAUD R. et LECONTE D., "Quels enseignements tirer des essais sur les prairies temporaires de graminées-trèfle blanc ?", *Fourrages*, 1983, **95** : 111-132.
- BIGOT J. ; LEFEVRE J. et BOUCAUD J., "Changes in the amide and amino acid composition of xylem exudate from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) during regrowth after defoliation", *Plant and Soil*, 1991, **136** : 59-64.

- BOLLER B.C. et NOSBERGER J. "Effects of temperature and photoperiod on stolon characteristics, dry matter partitioning, and nonstructural carbohydrate concentration of two white clover ecotypes", *Crop Science*, 1983, **23** : 1057-1062.
- BOYER J.S. et POTTER J.R., "Chloroplast response to low leaf water potentials; I. Role of turgor", *Plant Physiol*, 1973, **51** : 989-992.
- CAPELL B. et DÖRFFLING K., "Genotype specific differences in chilling tolerance of maize in relation to chilling-induced changes in water status and abscissic acid accumulation", *Physiol. Plant.*, 1993, **88** : 638-646.
- CARLSON G.E., "Growth of clover leaves after complete or partial leaf removal", *Crop Science*, 1966, **6** : 419-422.
- CASTONGUAY Y.; NADEAU P. et LABERGE S., "Freezing tolerance and alteration of translatable mRNAs in alfalfa hardened at subzero temperature", *Plant cell Physiol*, 1993, **34** (1) : 31-38.
- CHAPMAN D.F., "Natural re-seeding and *Trifolium repens* demography in grazed hill pastures. II. Seedling appearance and survival", *Journal of Applied Ecology*, 1987, **24** : 1037-1043.
- CHAPMAN D.F., ROBSON M.J. et SNAYDON R.W., "The influence of leaf position and defoliation on the assimilation and translocation of carbon in white clover (*Trifolium repens* L.) 1) Carbon distribution patterns.", *Annals of Botany*, 1991, **67** : 295-302.
- CHAREST C. et PHAN C.T., "Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*) : properties of enzymes involved in proline metabolism", *Physiol. Plant*, 1990, **80** : 159-168.
- COLLINS R.P. ; GLENDINING M.J. et RHODES I., "The relationships between stolon characteristics, winter survival and annual yields in white clover (*Trifolium repens* L.)", *Grass and Forage Science*, 1991, **46** : 51-61.
- COME D., "Les végétaux et le froid", *Collection Méthodes, Hermann, Editeurs des sciences et des arts*. 1992.

- CORRE N. ; OURRY A. ; BOUCAUD J. ; SALETTE J. et SIMON J.C., "Contribution of nitrogen of stolons to regrowth of nodulated white clover: quantification of N flow by N15 labelling and purification of proteins involved in storage" *15th General Meeting of the European Grassland Federation, Wageningen (The Netherlands)*, 1994
- CRUIZIAT P. "Measurement of Plant Water Status for Comparative Studies on Drought Resistance in Plants", *Proc. 21st Colloquium Int. Potash Institute, Bern* , 1989, 235-247.
- CULVENOR R.A. et SIMPSON R.J. "Mobilization of nitrogen in swards of *Trifolium repens* L. during regrowth after defoliation", *New Phytol.*, 1991, **117** : 81-90.
- CYR D.R. et BEWLEY J.D., "Carbon and nitrogen reserves of leafy spurge (*Euphorbia esula*) roots as related to overwintering strategy", *Physiol Plant*, 1989, **77** : 67-72.
- CYR D.R. et BEWLEY J.D., "Seasonal variation in nitrogen storage reserves in the roots of leafy spurge (*Euphorbia esula*) and responses to decapitation and defoliation", *Physiologia Plantarum*, 1990, **78** : 361-366.
- CYR D.R. ; BEWLEY J.D. et DUMBROFF E.B., "Seasonal dynamics of carbohydrate and nitrogenous components in the roots of perennial weed", *Plant cell and Environment*, 1990, **13** : 359-365.
- DANCKWERTS J.E. et GORDON A.J., "Long-term partitioning, storage and remobilization of ¹⁴C assimilated by *Trifolium repens* (cv. Blanca)", *Annals of Botany*, 1989, **64** : 533-544.
- DANSO S.K.A., "Herbage yield and nitrogen fixation in a triple species mixed sward of white clover, lotus and fescue", *Soil. Biol. Biochem.*, 1991, **23** (1) : 65-70.
- DAVIES S.A. et EVANS M.E., "The pattern of growth in swards of two contrasting varieties of white clover in winter and spring", *Grass and Forage Science*, 1982, **37** : 199-207.
- DAVIES S.A. et YOUNG N.R., "The characteristics of European, mediterranean and other population of white clover (*Trifolium repens* L.)", *Euphytica*, 1967, **16** : 330-340.

- DAVIS L.C. et NORDIN P., "Sugar and organic acid constituents in white clover", *Plant Physiol.*, 1983, **72** : 1051-1055.
- EAGLES C.F. et OTHMAN O.B., "Effect of temperature, irradiance and photoperiod on morphological characters of seedlings of contrasting white clover populations", *Ann. appl. Biol.*, 1986, **108** : 629-638.
- EAGLES C.F. et OTHMAN O.B., "Variation in growth of over (1988) Variation in growth of overwintered stolons of contrasting white clover populations in response to temperature, photoperiod and spring environment", *Ann. Appl. Biol.*, 1988, **112** : 563-574.
- EPRON D., "Effets des déficits hydriques et des forts éclaircissements sur la photosynthèse de jeunes semis de chêne en conditions contrôlées et de chênes adultes en conditions naturelles" 1993, *Doctorat de Sciences, Nancy I, INRA*, .
- ERITH A.G., "White clover. Monographs on agricultural plants J. Percival, ed.1924.
- FAW W.F. et JUNG G.A., "Electrophoretic protein patterns in relation to low temperature tolerance and growth regulation of alfalfa", *Cryobiology*, 1972, **9** : 548-555.
- FRAME J. et NEWBOULD P., "Agronomy of white clover", *Advances in Agronomy*, 1986, **40** : 1-88.
- FUKUDA. A. ; YAMATANI S. ; KOBATA T. et IMAKI T., "Decrease of leaf water potential and leaf injury of tea plant (*Thea sinensis* L.) subject to cold winter wind in Sanin region of Japan. I. Response of leaf water potential and leaf injury under field conditions", *Jpn. J. Crop. Sci.*, 1993, **62** (2) : 188-192.
- FUKUDA. A. ; YAMATANI S. ; KOBATA T. et IMAKI T., "Decrease of leaf water potential and leaf injury of tea plant (*Thea sinensis* L.) subject to cold winter wind in Sanin region of Japan. II. Increase of water flow resistance inside the plant contributes to decrease of leaf water potential", *Jpn. J. Crop. Sci.*, 1993, **62** (2) : 193-198.
- GAY A.P. et EAGLES C.F., "Quantitative analysis of cold hardening and dehardening in *Lolium*", *Ann. Bot.*, 1991, **67** : 339-345.

GENTY B. ; BRIANTAIS J.M. et BAKER N.R., "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence", *Biochim. biophys. Acta*, 1989, **990** : 87-92.

GERANT-SAUVAGE D., "Recherches sur la signification biologique des composés a-aminobutyriques des nodosités de *Medicago sativa*", *DEA de biologie et physiologie végétale, Université de Nancy I.*, 1982, 28-33.

GIRMA F.S. et KRIEG D.R., "Osmotic adjustment in sorghum. I. Mechanisms of diurnal osmotic potential changes", *Plant Physiol.*, 1992, **99** (2) : 577-582.

GOLDSTEIN G. et NOBEL P., "Water relations and Low-Temperature Acclimation for Cactus species Varying in Freezing Tolerance", *Plant Physiol.*, 1994, **104** : 675-681.

GONZALEZ B. ; BOUCAUD J. ; SALETTE J. et LANGLOIS J., "Fructan and cryoprotection in ryegrass (*Lolium perenne* L.)", *New phytol.*, 1990, **115** : 319-323.

GORDON A.J. ; MITCHELL D.F. ; RYLE G.J.A. et POWELL C.E. "Diurnal production and utilization of photosynthetate in nodulated white clover", *J. Exp. Bot.*, 1987, **38** : 84-98.

GRABER L.F. ; NELSON N.T. ; LUEKEL W.A. et ALBERT W.B. "Organic food reserves in relation to the growth of alfalfa and other perennial herbaceous plants", *Wisconsin Agr. Exp. Sta. Res. Bul.*, 1927, **80**.

GRAHAM D. et PATTERSON B.D., "Responses of plants to low, nonfreezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1982, **33** : 347-72.

GRANT S.A. ; BARTHAM G.T. et MARIOTT C.A., "The influence of sward conditions and nitrogen supply on the performance of white clover in continuously stocked grass clover swards. Grassland facing the energy crisis", *Proceedings of 11th general meeting of the European Grassland Federation, Troia (Portugal)*, 1986, 352-356.

GUCKERT A. ; DAMAY J. ; TREILLET L. ; BALANDREAU J. ; BARDIN R. et CHALAMET A., "Etude au champ de la fixation d'azote par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.)", *Supplément de la revue Fourrages*, 1983, **94-95** : 61-86.

- HALE M.G. et ORCUTT D.M., "The physiology of plants under stress" *A whiley-interscience publication, John Wiley and Sons. New York, 1987.*
- HANDA S. ; BRESSAN R.A. ; HANDA A.K. ; CARPITA N.C. et HASEGAWA P.M., "Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress", *Plant Physiol.*, 1983, **73** : 834-843.
- HARRIS W. ; RHODES I. et MEE S.S., "Observations on environmental and genotypic influences on the overwintering of white clover", *Journal of Applied Ecology*, 1983, **20** : 609-624.
- HARRIS W., "Population dynamics and competition", *In White clover, CAB International (Oxon)*, 1987, 203-299.
- HAY M.J.M. ; CHAPMAN D.F. ; HAY R.J.M. ; PENNEL C.G.L. ; WOODS P.W. et FLECHTER R.H., "Seasonal variation in the vertical distribution of white clover stolons in grazed swards", *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1987, **30** : 1-8.
- HODGSON H.J. et BULA R.J., "Hardening behavior of sweet clover (*Melilotus* spp.) varieties in a subarctic environment", *Agronomy Journal*, 1955, **48** (4) : 157-160.
- HUNER N.P.A. ; ÖQUIST G. ; HURRY V.M. ; KROL M. ; FALK S. ; GRIFFITH M., "Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants", *Photosynthesis Research*, 1993, **37** : 19-39.
- ILKER R. ; BREIDENBACH R.W. et LYONS J.M., "Sequence of ultrastructural changes in the tomato cotyledons during short periods of chilling". *In J.M.Lyons, D Graham and J.K.Raison (Eds.), Low temperature stress in crop plants_ The role of the membrane . Academic, New York, 1979, 97-113.*
- JUNG G.A. ; SHIH S.C. et SHELTON D.C., "Seasonal changes in soluble protein, nucleic acids and tissue pH related to cold hardiness of alfalfa", *Cryobiology*, 1967, **4** (1) : 11-16.
- JUNTTILA O. ; SVENNING M.M. et SOLHEIM B., "Effects of temperature and photoperiod on frost resistance of white clover (*Trifolium repens*) ecotypes", *Physiologia Plantarum*, 1990, **79** : 435-438.

- KACPERSKA A. et SZANIAWSKI R.K., "Frost resistance and water status of winter rape leaves as affected by differential shoot/root temperature", *Physiologia Plantarum*, 1993, **89** : 775-782.
- KLOSSON R.P. et KRAUSE G.H., "Freezing injury in Cold-acclimated and Unhardened spinach leaves. I. Photosynthetic reactions of thylakoids isolated from Frost-damaged leaves", *Planta*, 1981, **151** : 339-346.
- KOSCIELNIAK J., "Effect of low night temperatures on photosynthetic activity of the maize seedlings (*Zea mays* L.)", *J. Agronomy and Crop Sciences*, 1993, **171** : 73-81.
- KOSTER K.L. et LYNCH D.V., "Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of Puma Rye", *Plant Physiol.*, 1992, **98** : 108-113.
- KRALL J.P. et EDWARDS G.E., "PEP carboxylases from two C4 species of *Panicum* with markedly different susceptibilities to cold inactivation", *Plant Cell. Physiol.*, 1993, **34** (1) : 1-11.
- KRISTJANSDOTTIR I.S. et MERKER A., "Temperature-related changes in chlorophyll fluorescence and contents of chlorophyll and carotenoids in andean and european potato clones", *Plant Breeding*, 1993, **111** : 148-154.
- KUNG BENOIT A., "Croissance printanière de la prairie permanente en Lorraine: lois de croissance potentielle", *Fourrages*, 1991, **127** : 273-286.
- LAPERRIERE C. "Etude de la fixation de l'azote par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.): aspects biologiques et agronomiques", *Doctorat de l'INPL (Nancy)*, 1984.
- LARSEN A., "Breeding winter hardy grasses", *Euphytica*, 1994, **77** : 231-237.
- LEVITT J., "Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1 : Chilling, freezing and high temperature stresses", *Academic press, New York*, 1980.
- LI B. ; GEIGER D.R. et SHIEH W.J. "Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves", *Plant Physiol.*, 1992, **99** : 1393-1399.
- LÜSCHER A., "Überwinterung und frühlingaufwuchs von weissklee (*Trifolium repens* L.). Dynamik der kohlenhydratreserven und der biologischen N₂-fixierung", *Diss, ETH Nr.8977*, 1989.

- LYM R.G. et MESSERSMITH C.G., "Fall cultivation and fertilisation to reduce winter hardiness of Leafy Spurge (*Euphorbia esula*)", *Weed Science*, 1993, **41** : 441-446.
- MAÎTRE J.P. ; ASSEMAT L. et JACQUARD P., "Croissance du trèfle violet (*Trifolium pratense* L.) en association avec du ray-grass d'Italie (*Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum*) : II. Démographie des organes, biomasse et interférences biologiques", *Agronomie*, 1985, **5** (4) : 297-304.
- MARRIOT C.A. et SMITH M., "Senescence and decomposition of white clover stolons in grazed upland grass/clover swards", *Plant and Soil*, 1992, **139**: 219-227.
- MARSHALL A.H. ; HOLLINGTON P.A. et HIDES D.H., "Spring defoliation of white clover seed crops. 2. Potential harvestable seed yield and seed yield components of contrasting white clover cultivars", *Grass and Forage Science*, 1993, **48** : 310-316.
- MAY L.H., "The utilization of carbohydrate reserves in pasture plant after defoliation", *Herbage Abstracts*, 1960, **30** (4) : 239-245.
- MENZI H. ; BLUM H. et NOSBERGER J., "Relationship between climatic factors and the dry matter production of swards of different composition at two latitudes", *Grass and Forage Science*, 1991, **46** : 223-230.
- MORTON J.D., "Effect of seed coating on establishment and yield of grasses on a west coast Pakihi soil", *N.Z.J. exp. agric.*, 1985, **13** (4) : 403-405.
- MUNNS R., "Why measure osmotic adjustment?", *Aust. J. Plant Physiol.*, 1988, **15** : 717-726.
- MUNRO J. et HUGHES R., "White clover and hill land improvement", *Journal of the British Grassland Society*, 1966, **21** : 224-230.
- NOSBERGER J., "Quelques aspects de la biologie et de la physiologie du trèfle blanc", *Supplément de la revue Fourrages*, 1983, **94-95** : 49-59.
- ODLUM K.D. ; BLAKE T.J. ; KIM Y.T. et GLERUM C., " Influence of photoperiod and temperature on frost hardiness and free amino acid concentrations in black spruce seedling", *Tree Physiol.*, 1993, **13** : 275-282.

- OLIEN C.R. et CLARK J.L. "Changes in soluble carbohydrate composition of barley, wheat and rye during winter", *Agronomy Journal*, 1993, **85** : 21-29.
- OLLERENSHAW J.H. et BAKER R.H., "Low temperature growth in a controlled environment of *Trifolium repens* plants from northern latitudes" *Journal of Applied Ecology*, 1981, **18** : 229-239.
- OLLERENSHAW J.H. et HAYCOCK R., "Variation in the low temperature growth and frost tolerance of natural genotypes of *Trifolium repens* L. from Britain and Norway", *J. Agric. Sci. Camb.* 1984, **102**, 11-21.
- OQUIST G. ; HURRY V.M. ; OQUIST M.G. et HUNER N.P.A., "Differential resistance of frost-hardened and non-hardened winter rye to photoinhibition of photosynthesis is due to an increase capacity of frost-hardened rye to keep QA oxidized under similar irradiance and temperature", *Photosynthetica*, 1992, **27** (1-2) : 231-235.
- PHILIPPS D.V. ; WILSON D.O. et DOUGHERTY D.E., "Soluble carbonhydrates in legumes and nodulated nonlegumes", *J. Agric. of Food Chemistry*, 1984, **32** : 1289-1291.
- ROBIN C. ; CHONE T. et GUCKERT A., "Rôle de la position de la feuille dans l'assimilation et le transport du carbone chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.)", *Agronomie*, 1987, **7** (8) : 599-605.
- ROSNES K., JUNTILLA O., ERNSTSEN A. et SANDLI N., "Development of cold tolerance in white clover (*Trifolium repens* L.) in relation to carbohydrate and free amino acid content", *Acta Agric. Scand. Sect B, Soil and Plant Sci.*, 1993, **43** : 151-155.
- ROSNITSCHER-SCHIMMEL I., "Seasonal dynamics of nitrogenous compounds in a nitrophilic weed. I. Changes in inorganic and organic nitrogen fractions of the different plant parts of *Urtica dioica*", *Plant Cell Physiol.*, 1985, **26** (1) : 169-176.
- RUTTEN D. et SANTARIUS K.A., "Osmotic potentials of water-saturated mosses", *J. Plant Physiol.*, 1993, **141** : 739-744.

SACKVILLE HAMILTON N.R. et HARPER J.L., "The dynamics of *Trifolium repens* in a permanent pasture I. The population dynamics of leaves and nodes per shoot axis", *Proc. R. Soc. Lond.*, 1989, **B 237** : 133-173.

SAGISAKA S., "Amino acid pools in herbaceous plants at the wintering stage and at the beginning of growth", *Plant Cell Physiol.*, 1987, **28** (1), 171-178.

SANDLI N. ; SVENNING M. ; ROSNES K. et JUNTILLA O., "Effects of nitrogen supply on frost resistance, nitrogen metabolism and carbohydrate content in white clover (*Trifolium repens*)", *Physiol. Plant.*, 1993, **88** : 661-667.

SAS INSTITUTE INC. SAS / STATTM, "Guide for personal computers, Version 6", *Edition Cary, NC : SAS INSTITUTE Inc.*, 1987, 1028 pp.

SANTARIUS K.A., " Apoplasmic water fractions and osmotic potential at full turgidity of some Bryidae", *Planta*, 1994, **193**, 32-37.

SIMON J.C. ; GASTAL F. et LEMAIRE G., "Compétition pour la lumière et morphologie du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : émission des feuilles et des ramifications", *Agronomie*, 1989, **9** : 383-389.

SIMON U. et PARK B.H., "A descriptive scheme for stages of development in Perennial Forage grasses", *Proceedings of the XIV International grassland Congress*, 1983.

SMITH D. et PHILLIPS D.V., "Influence of sequential prolonged periods of dark and light on pinitol concentration in clover and soybean tissue", *Physiol. Plant.*, 1982, **54** : 31-33.

STEFFEN K.L. ; ARORA R. et PALTA J.P., "Relative sensitivity of photosynthesis and respiration to freeze-thaw stress in herbaceous species", *Plant Physiol.*, 1989, **89** : 1372-1379.

STIRLING C.M. ; RODRIGO V.H. et EMBERRU J., "Chilling and photosynthetic productivity of field grown maize (*Zea mays*); changes in the parameters of the light-response curve, canopy leaf CO₂ assimilation rate and crop radiation-use efficiency", *Photosynthesis Research*, 1993, **38** : 125-133.

STOUT D.G. et STEPONKUS P.L., "Quantitative study of the importance of water permeability in plant cold hardiness", *Plant Physiol.*, 1977, **60** : 374-378.

TAKEDA T. et AGATA W., "Effect of temperature on organ formation in Ladino clover with special reference to photosynthetic organ formation", *Proc. Crop. Science Soc. Jap.*, 1966, **34** : 274.

THOMAS H et JAMES A.R., "Freezing tolerance and solutes changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought", *Annals of Botany*, 1993, **72** : 249-254.

THOMAS R.G., "The structure of the mature plant", *In White Clover*, eds M.J. BAKER and W.M. WILLIAMS, CAB International, 1987.

TREILLET L., "Contribution à l'étude de la fixation de l'azote par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) : la plante et son environnement", *Doctorat de l'INPL (Nancy)*, 1981.

TRONSMO A.M. ; KOBRO G. ; MORGENLIE S. et FLENGSRUD R., "Carbohydrate content and glycosidase activities following cold hardening in two grass species", *Physiologia Plantarum*, 1993, **88** : 689-695.

TYREE M.T., "Negative turgor pressure in plant cells : fact or fallacy?", *Can. J. Bot.*, 1976, **54** : 2738-2746.

TYYSTJÄRVI E. ; KETTUNEN R. et ARO E.M., "The rate constant of photoinhibition in vitro is independent of the antenna size of Photosystem II but depends on temperature", *Biochemica et Biophysica Acta*, 1994, **1186** : 177-185.

TYYSTJÄRVI E. ; MÄENPÄÄ P. et ARO E.M., "Mathematical modelling of photoinhibition and Photosystem II repair cycle. I. Photoinhibition and D1 protein degradation in vitro and in the absence of chloroplast protein synthesis in vivo", *Photosynthesis Research*, 1994, **41** : 439-449.

VAN HANDEL E., "Direct microdetermination of sucrose", *Analytical biochemistry*, 1968, **22** : 280-283.

VEZ., "Etude du développement du trèfle blanc en relation avec les fluctuations de quelques substances organiques", *Bulletin de la Société Botanique Suisse*, 1961, **71** : 118-173.

VOLENEC J.J. ; BOYCE P.J. et HENDERSHOT K.L., "Carbohydrate metabolism in taproots of *Medicago sativa* L. during winter adaptation and spring regrowth", *Plant Physiol.*, 1991, **96** : 786-793.

WAMPLE R.L.; SPAYD S.E. ; EVANS R.G. et STEVENS R.G., "Nitrogen fertilization of white riesling grapes in Washington : nitrogen seasonal effects on bud cold hardiness and carbohydrate reserves", *Am. J. Enol. Vitic.*, 1993, **44** (2) : 159-167.

WESTROOKS F.E. et TESAR M.B., "Tap root survival of Ladino clover", *Agronomy Journal*, 1955, **47** : 403-410.

WOLEDGE J. et TEWSON V., "Photosynthesis during winter in rye grass / white clover mixtures in the field" *New Phytol*, 1989, **113** : 275-281.

WOLEDGE J. ; DENNIS W.D., "The effect of temperature on the photosynthesis of rye-grass and white clover leaves", *Annals of Botany*, 1982, **50** : 25-35.

WOLEDGE J. ; TEWSON V. et DAVIDSON I.A., "Growth of grass/clover mixtures during winter", *Grass and Forage Science*, 1990, **45** : 191-201.

WOLEDGE J. ; UBBI A. et TEWSON V., "Photosynthesis of white clover petioles", *Photosynthetica*, 1990, **24**(1) : 56-62.

YELENOSKY G. et GUY C.L., "Freezing tolerance of Citrus, Spinach, and Petunia Leaf Tissue.I. Osmotic adjustment and sensitivity to freeze induced cellular dehydration", *Plant Physiol.*, 1989, **89** : 444-451.

YELENOSKY G. et GUY L., "Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'valencia' orange at progressively colder temperatures", *Bot. Gaz.*, 1977, **138** (1) : 13-17.

YEMM E.W. et COCKING E.C., "The determination of amino-acids with ninhydrin", *Analyst*, 1955, **80** : 209-214.

GLOSSAIRE

Ce glossaire regroupe un ensemble de définitions des termes utilisés au cours de ce travail. Ces définitions issues de la littérature sont utilisées et considérées comme référence dans la suite du travail.

Acclimatation = Endurcissement : Réponse induite par des changements environnementaux qui résulte en des modifications phénotypiques sur une seule génération sans modification du génotype (Huner *et al.*, 1993).

Adaptation : Réponse à des changements à long terme qui résulte en des modifications génétiques héréditaires. Celles-ci sont stables et se maintiendront dans les populations pendant des générations (Huner *et al.*, 1993).

Chilling temperatures : terme anglais sans équivalent français regroupant l'ensemble des températures proches de 0°C, ne provoquant pas de gel (Graham et Patterson, 1982). Pour ce document, nous l'avons traduit par : température basse positive (TBP).

Evitement : Capacité de la plante à empêcher le facteur de lésion de pénétrer dans les tissus.

Indice actinothermique : Température relevée par un thermomètre à minimum installé horizontalement dans un endroit bien dégagé et dont l'organe sensible est au niveau du sommet de la végétation (Dictionnaire encyclopédique d'agrométéorologie. INRA-Météo France).

Réserves : Glucides et composés azotés élaborés, stockés dans la plante et utilisés comme substrat pour sa maintenance et pour le développement des futurs bourgeons et racines (Graber *et al.* (1927); Weinman (1948) dans May (1960).

Résistance : capacité d'une plante à réagir de manière active contre les effets négatifs imposés par un facteur de stress en développant des mécanismes de protection.

Tolérance : capacité d'une plante à survivre à un stress avec des petites modifications ou sans modifications du tout; la capacité relative d'un organisme à croître, se développer ou survivre lorsque cet organisme est soumis à un facteur environnemental défavorable; la capacité à supporter les effets d'une maladie ou d'un stress sans mourir ou souffrir des altérations irréparables (Hale et Orcutt, 1987).

ABREVIATIONS

Générales :

ACP : Analyses en Composantes Principales

C : Carbone total

CPV : Courbe Pression-Volume

COST : Coopération

E.N. : Entre noeuds

N : Azote total

MF : Matière Fraîche

MFPT : Matière Fraîche à Pleine Turgescence

MS : Matière Sèche

SAU : Surface Agricole Utile

TER : Teneur en Eau Relative

TBP : Températures basses positives

PSI : Photosystème I

PSII : Photosystème II

Données météorologiques:

10J : Moyenne des 10 jours écoulés avant la mesure

IND ACT : Indice actinothermique

AMP15 : nombre de jours présentant une amplitude supérieure à 15°C

J : Jour de mesure

PL : Pluie

RT : Rayonnement

SOMTEMP : Somme des températures : BO = base 0°C

B5 = base 5°C

BN = base températures négatives

T10CM : Température minimale du sol à 10 cm de profondeur

TMI : Température minimale de l'air

TMO : Température moyenne de l'air

VT : Vent

NOMENCLATURE :

IIo : Potentiel osmotique (MPa)

ANNEXES

ANNEXE 1

ANALYSE DE TERRE SUR LES PARCELLES ESSAI DE MIRECOURT.

Résultats obtenus par le SADEF. Laboratoire agréé par le Ministère de l'Agriculture. Aspach-le-Bas.

FERTILITE

* pH eau	7,0
* Matière organique	36 g/kg
Azote total	2,1 g/kg
C/N	9,7
* Phosphore assimilable (P ₂ O ₅ ; méthode Dyer)	0,31 g/kg
* Capacité d'échange cationique	145 mEq/kg
* Cations échangeables	
Potassium (K ₂ O)	8,4 mEq/kg
Magnésium (MgO)	33,6 mEq/kg
Calcium (CaO)	108,5 mEq/kg
Sodium (Na ₂ O)	0,3 mEq/kg
* Taux de saturation	saturé
* Oligoéléments	
Fer (Fe)	66 mg/kg
Manganèse (Mn)	36,0 mg/kg
Cuivre (Cu)	1,4 mg/kg
Zinc (Zn)	1,9 mg/kg
Bore (B)	0,2 mg/kg

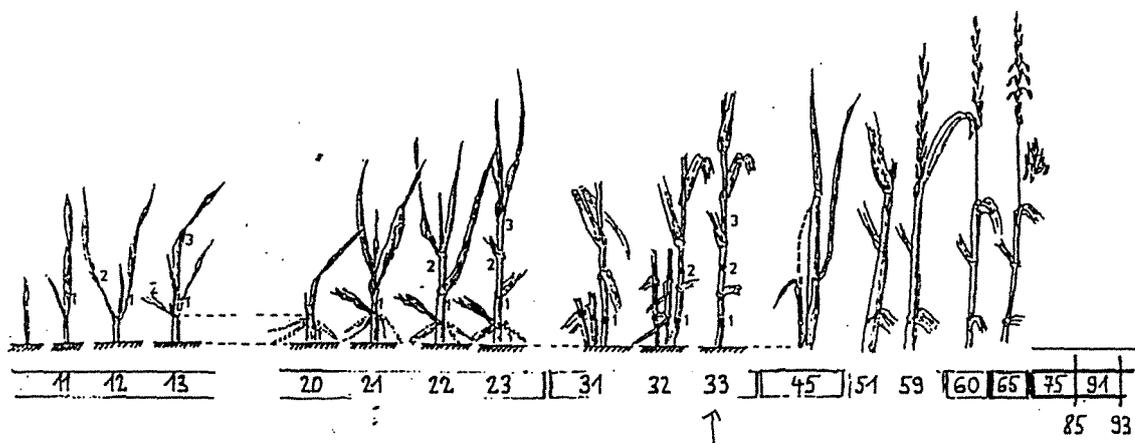
ETAT PHYSIQUE**LIMON ARGILO-SABLEUX**

* Carbonates totaux (CaCO ₃)	1%
* Argile : < 0,002 mm	25,7%
Limon fin : 0,002-0,02 mm	30,1
Limon grossier : 0,02-0,05 mm	17,2
Sable fin : 0,05-0,2 mm	14,1
Sable grossier : 0,2-2 mm	9,1

ANNEXE 2

STADES DE DEVELOPPEMENT DU RAY-GRASS (d'après Simon et Park, 1983)

La coupe de l'association trèfle / ray-grass doit être réalisée lorsque 50% des tiges de ray-grass ont atteint le stade 33.



ANNEXE 3

INOCULATION DU TREFLE BLANC AVEC UNE SOLUTION DE
RHIZOBIUM leguminosarum biovar trifolii

1. Préparation de la culture :

- * Préparer un milieu contenant 15g/l de mannitol et 5g/l d'extrait de levure, dans des flacons de 250ml
- * Autoclaver le milieu
- * Ensemencer le milieu refroidi avec la souche de Rhizobium
- * Placer 48 heures à l'étuve à 25°C en agitant le milieu 1 fois par jour

2. Inoculation

- * Centrifuger le milieu à 5000 rpm pendant 10 mn à 10°C
- * Récupérer le culot
- * Dissoudre l'ensemble des culots dans deux litres de solution nutritive (cf annexe 4)
- * Inoculer chaque plante avec environ 10 ml de solution

ANNEXE 4

SOLUTION NUTRITIVE POUR LE TREFLE BLANC CULTIVE EN POT
(Solution de Mac Knight modifiée par Robin et al., 1989).

1. Préparation des solutions mères (SM)

Element	mg/l sol. nutritive	g/l SM	conc SM
<u>Eléments majeurs et mineurs :</u>			
MgSO ₄ , 7H ₂ O	197,2	98,6	500
KCL	7,456	7,456	1000
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	230	230	1000
CaSO ₄ , 2H ₂ O	1500		
KNO ₃	505	252	500
<u>Oligoéléments : (à mélanger dans le même récipient sauf le fer)</u>			
H ₃ BO ₃	2,164	2,164	1000
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,979	1,979	1000
ZnCl ₂	0,110	0,110	1000
Na ₂ MOO ₄ , 2H ₂ O	0,103	0,103	1000
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,075	0,075	1000
FeEDTA	7,8	7,8	1000

Rq/ Le CaSO₄, 2H₂O est préparé au dernier moment pour éviter la précipitation. On peut ajouter du KNO₃ (7,4 mg/ml) dans le cas de trèfle non nodulés.

2. Préparation de la solution nutritive

Pour 20 litres de solution nutritive, prélever les volumes suivants de SM :

Oligoéléments (sauf fer):	20 ml
MgSO ₄ , 7H ₂ O	40 ml
FeEDTA	20 ml
KCL	20 ml
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	20 ml
KNO ₃	40 ml
CaSO ₄ , 2H ₂ O	30g

ANNEXE 5

EXTRACTION DES SUCRES SOLUBLES

- 1 - Peser 10 à 20 mg d'organe à extraire.
- 2 - Ajouter 1 ml d'éthanol à 80% (Si l'extraction est destinée à une analyse HPLC, rajouter du manitol à 1g/l comme étalon interne au premier alcool d'extraction)
- 3 - Chauffer à 80°C pendant 20 minutes (Agiter après 10 minutes).
- 4 - Séparer * : l'extrait alcoolique (sucres solubles) -> stockage au réfrigérateur.
* : le culot (amidon) -> congélateur.
- 5 - Rincer à nouveau le culot avec 0,5 ml d'éthanol, chauffer à 80°C (agiter après 10 minutes) et reprendre l'extrait alcoolique.
- 6 - Evaporer l'extrait alcoolique à l'évaporateur rotatif pendant 4 heures
- 7 - Reprendre dans 1 ml d'eau distillée.
- 8 - Laisser une nuit au réfrigérateur.
- 9 - Purifier au charbon actif en agitant pendant 30 à 45 minutes
- 10 - Centrifuger
- 11 - Filtrer sur filtre 0,2mm.
- 12 - Stocker au congélateur.

DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES

- 13 - Prélever 100µl de solution et ajouter 0,9 ml d'eau distillée
- 14 - Ajouter 2 ml d'anthrone (à 0,2% dans H₂SO₄ concentré).
- 15 - Agiter.
- 16 - Placer 7 minutes 30 au bain marie bouillant.
- 17 - Refroidir dans de l'eau glacée.
- 18 - Lire la densité optique à 630 nm.

ANNEXE 6

EXTRACTION ET DOSAGE DE L'AMIDON

- 1 - Après l'extraction alcoolique des sucres solubles, rincer le culot avec 1 ml d'éthanol à 20% pendant 20 minutes à 80°C (Agiter après 10 minutes). Eliminer l'extrait alcoolique.
- 2 - Ajouter 1 ml d'eau distillée.
- 3 - Autoclaver à 135°C pendant une heure.
- 4 - Stocker au congélateur si nécessaire.

HYDROLYSE

- 5 - Ajouter 0,5 ml de tampon acétate contenant 1 g/l d'amyloglucosidase
- 6 - Réaction une heure à 55°C (Après agitation).
- 7 - Arrêter la réaction en plongeant les tubes à 90°C pendant quelques minutes.

DOSAGE

- 8 - Préparer un volume de tampon TEA de manière à avoir 1 ml pour chaque dosage.
- 9 - Pour un dosage, ajouter au tampon :
 - 50µl ATP/NAD
 - 10µl d'hexokinase
 - 10µl de G6PDH
- 10 - Ajouter 1 ml du mélange tampon + enzymes.
- 11 - Agiter.
- 12 - Attendre 40 minutes à température ambiante.
- 13 - Lire la densité optique à 340 nm.

Lors du calcul de la concentration en amidon, multiplier le résultat final par 0,91, ce facteur est à prendre en compte car la liaison osidique libère de l'eau.

ANNEXE 7

**PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES ACIDES AMINES
(SELON BIGOT ET AL, 1991)****EXTRACTION**

1. Extraire les a.a. à partir de 50 mg de MS environ et 5 ml de méthanol 80% à 70°C pendant 1 h.
2. Ajouter 2,5 ml de chloroforme et 2,5 ml d'H₂O-ultra pure.
3. Agiter et séparer les deux phases en conservant la phase aqueuse.
4. Evaporer pendant environ 6h.
5. Dissoudre le résidu dans 2 ml d'H₂O-ultra pure.
6. Stocker à -25 °C

**SEPARATION DE LA FRACTION AMINEE SUR COLONNE ECHANGEUSE
D'IONS**Préparation de la résine cationique DOWEX H⁺

1. Placer la résine dans H₂O-ultra pure.
2. Passer une solution d'HCl 5% avec un temps de contact de 30 min
3. Rincer avec de l'H₂O-ultra pure (5 fois le volume de résine) sur du verre frité sans jamais assécher la résine.
4. Stocker à T°C ambiante sous une mince couche d'H₂O-ultra pure.

Préparation des colonnes

1. Dans des embouts de pipette 1000, placer un morceau de fibres de verre.

2. Homogénéiser la résine afin de prélever 0,5 ml pour chaque colonne
3. Remplir la colonne en évitant la formation de bulles d'air.
4. Maintenir la résine sous H₂O-ultra pure.

Séparation de la fraction aminée

1. Disposer 0,1 ml d'échantillon sur la colonne.
2. Laver la colonne avec 2,5 ml d'H₂O-ultra pure.
3. Eluer les acides aminés avec 3 ml de NH₄OH 2M.
4. Evaporer la solution d'élution pendant 6 h.
5. Dissoudre le résidu dans 3 ml d'H₂O-ultra pure

ANNEXE 8

DOSAGE DES ACIDES AMINES SELON YEMM ET COCKING (1955)

REACTIFS :

- **Methylcellosolve** ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{:CH}_2\text{OH}$): dilution au 1/2 par H_2O distillée et ajout de 10% d'iodure de K.
- **Tampon citrate pH 5 0,2M**: Dissoudre 21,008 g (10,504 g) d'acide citrique dans 200 ml (100 ml) d' H_2O distillée

Ajouter 200 ml (100 ml) de NaOH 1N, compléter à 500 ml (250 ml) avec de l' H_2O distillée et ajuster le pH

CONSERVER AU FROID AVEC UN PEU DE THYMOL

- **Cyanure de K 0,01 M**: Dissoudre 0,1628 g de cyanure de K dans 250 ml d' H_2O distillée.

CONSERVER A T°C AMBIANTE PENDANT 3 MOIS MAXIMUM

- **Solution A**: Diluer 5 ml (2,5 ml) de cyanure de K avec 250 ml (125) de méthylcellosolve.

PREPARER EXTRATEMPORAIREMENT

- **Solution B**: Dissoudre 5% de ninhydrine dans le méthylcellosolve

PREPARER EXTRATEMPORAIREMENT

- **Solution C**: Ajouter 250 ml (100 ml) de solution A à 50 ml (20 ml) de solution B.

PREPARER EXTRATEMPORAIREMENT

DOSAGE

- Mélanger 0,5 ml de solution à analyser à 0,25 ml de tampon citrate et 0,6 ml de solution C.
- Chauffer 15 min. à 100°C.
- Refroidir sous eau froide.
- Lire la DO à 570 nm (aa totaux) ou à 440 nm (proline et hydroxyproline)

COLORATION STABLE PENDANT 3 H.

ANNEXE 9

PRINCIPE DE DOSAGE DU CARBONE ET DE L'AZOTE

Le principe du dosage du carbone total et de l'azote total repose sur une séparation des deux constituants par chromatographie en phase gazeuse après combustion.

L'autoanalyseur CN est composé d'un passeur d'échantillon (fig A1 ; (1)) d'une colonne de combustion (2), d'une colonne de réduction (3), d'un piège à eau (4 et 5), d'une colonne de séparation chromatographique (6) et d'un détecteur à catharométrie (7). L'ensemble est relié à un intégrateur.

Colonne de combustion : elle est munie de deux catalyseurs (chrome sesquioxyde granulaire et oxyde de cobalt) et conduit à la formation des gaz CO_2 et N_2 à partir des composés carbonés et azotés de l'échantillon à analyser. Lors du passage des échantillons, un flash de combustion se produit sous flux d'oxygène à haute température (1030°C).

Colonne de réduction : associée à un four à 650°C , cette colonne contient du cuivre (Cu) qui servira à capter l'oxygène en excès libéré par la combustion. Les gaz sont poussés par un gaz vecteur qui est de l'hélium.

A la sortie des deux colonnes, les produits obtenus sont : N_2 , H_2O , et CO_2 .

Piège à eau : une colonne de verre est remplie de permanganate de potassium qui fixera l'eau libérée par les deux colonnes.

Détection : Les gaz N_2 et CO_2 sont ensuite conduits, grâce à l'hélium, à travers une colonne de chromatographie les sépare. Ils sont détectés en sortie par un catharomètre

(Pont de Wheatstone) qui mesure une différence de potentiel entre des résistances et la transforme en signal électrique. Grâce à une calibration au préalable, les pourcentages en carbone total et azote total en fonction de la matière sèche de l'échantillon sont calculés.

Un intégrateur équipé d'un logiciel d'acquisition de données permet de traiter automatiquement les résultats.

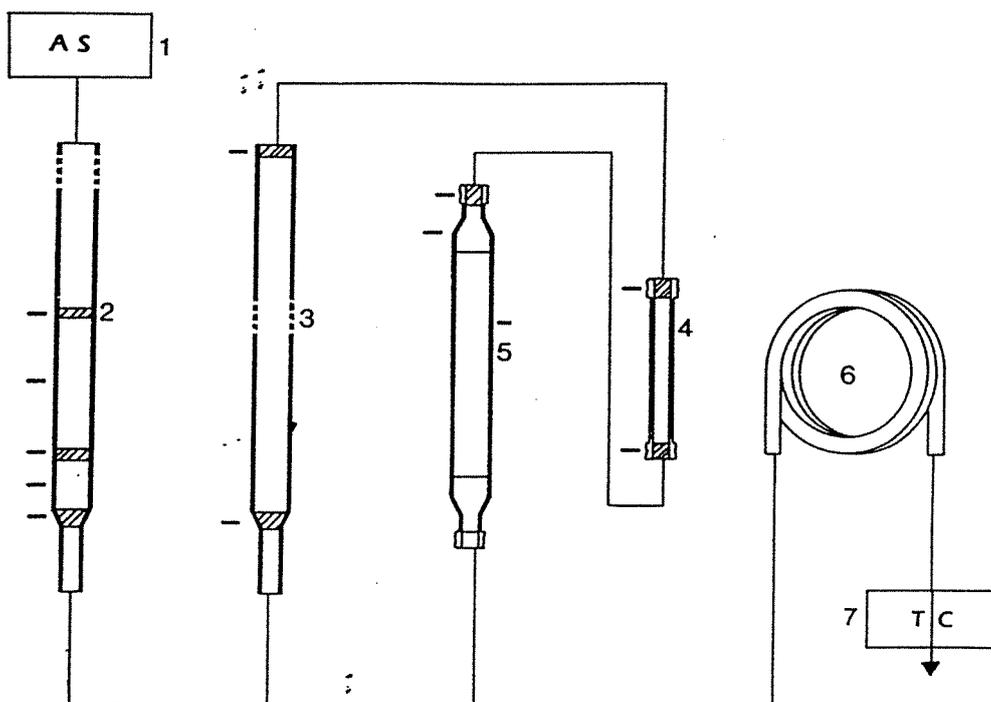


Figure A1 : Schéma de fonctionnement de l'autoanalyseur Carlo Erba, CN 1500. 1: Passeur d'échantillons, 2 : colonne de combustion, 3 : colonne de réduction, 4 et 5 : pièges à eau, 6 : colonne à chromatographie en phase gazeuse, 7 : détecteur à catharométrie.

ANNEXE 10

PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL DE MESURE DE LA PHOTOSYNTHESE A CIRCUIT OUVERT

L'appareil utilisé est un CIRAS, commercialisé par PPsystems. Cet appareil fonctionne à circuit ouvert, il est équipé de détecteurs de CO₂ et H₂O à infrarouge reliés à un microprocesseur permettant de stabiliser et mesurer le CO₂ et la vapeur d'eau.

Le CIRAS utilise 4 analyseurs de gaz à infrarouge, 2 pour le CO₂ et 2 pour l'eau. Une paire d'analyseur à CO₂ et H₂O est considérée comme référence, et l'autre paire est utilisée pour l'analyse des échanges gazeux de la plante. Dans un système à circuit ouvert, un flux d'air circule à travers le système (fig A2).

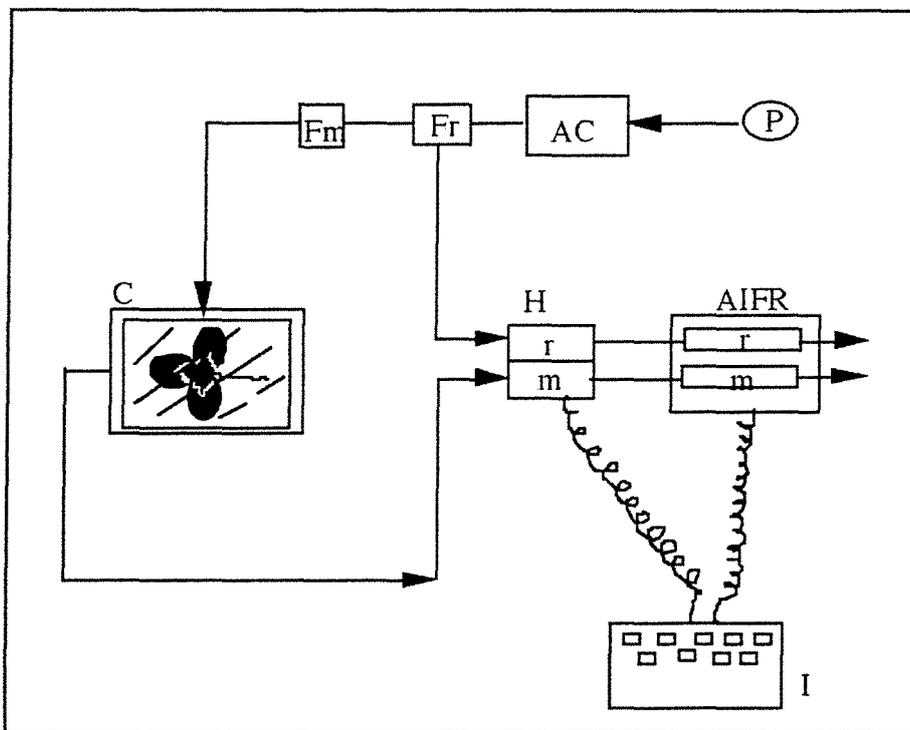


Figure A2 : Schéma de fonctionnement de l'appareil de mesure de photosynthèse à système ouvert. L'air est pompé par la pompe (P), passe à travers un conditionneur (AC) puis dans un débitmètre (Fm et Fr), il arrive dans la chambre où se trouve la feuille et passe ensuite dans un absorbeur d'humidité (H) pour être ensuite analysé par l'analyseur infra-rouge (AIFR). La différence de concentration en CO₂ entre le circuit de mesure (m) et le circuit de référence (r) est calculée dans l'intégrateur (I).

Les deux paires d'analyseurs sont utilisés pour mesurer une différence de fraction molaire entre l'entrée et la sortie de la chambre de mesure. L'air est d'abord assèché avant d'entrer dans la chambre, l'assimilation nette de CO₂ est alors estimée selon la formule: $A = f(c_e - c_s)/s$ ou s est la surface de la feuille mesurée.

ANNEXE 11

**PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL DE MESURE DE LA
FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE**

L'appareil utilisé est un appareil portable (PAM-2000 : pulse amplitude modulation) (fig A.3). La fluorescence du photosystème II est excitée brièvement mais fortement par des impulsions lumineuses courtes mais intenses, émises à partir de diodes émétrices de lumière (LED). Avec le PAM-2000, ces pulsions sont de 3 μ secondes et répétées à une fréquence de 600 ou 20000 Hz. La lumière émise par les diodes passe à travers un filtre ($\lambda < 670$ nm) et le photodétecteur est protégé par un filtre à grandes longueurs d'ondes ($\lambda > 700$ nm) et un filtre absorbant la chaleur. Un système amplificateur ne reçoit que les signaux de fluorescence émis pendant les 3 msec de pulsion. Le photodétecteur est équipé d'une photodiode capable de capter des signaux lumineux d'intensité très variable, ce système permet donc de déterminer correctement et dans toutes les conditions de travail (extérieur, altitude...) les rendements minimum et maximum de la fluorescence, F_0 et F_m . La fluorescence émise, captée par le photodétecteur est ensuite transmise à un enregistreur lui même intégré dans un ordinateur portable. Ce système présente l'avantage de fonctionner en autonomie grâce à des batteries et donc d'être utilisable en plein champ.

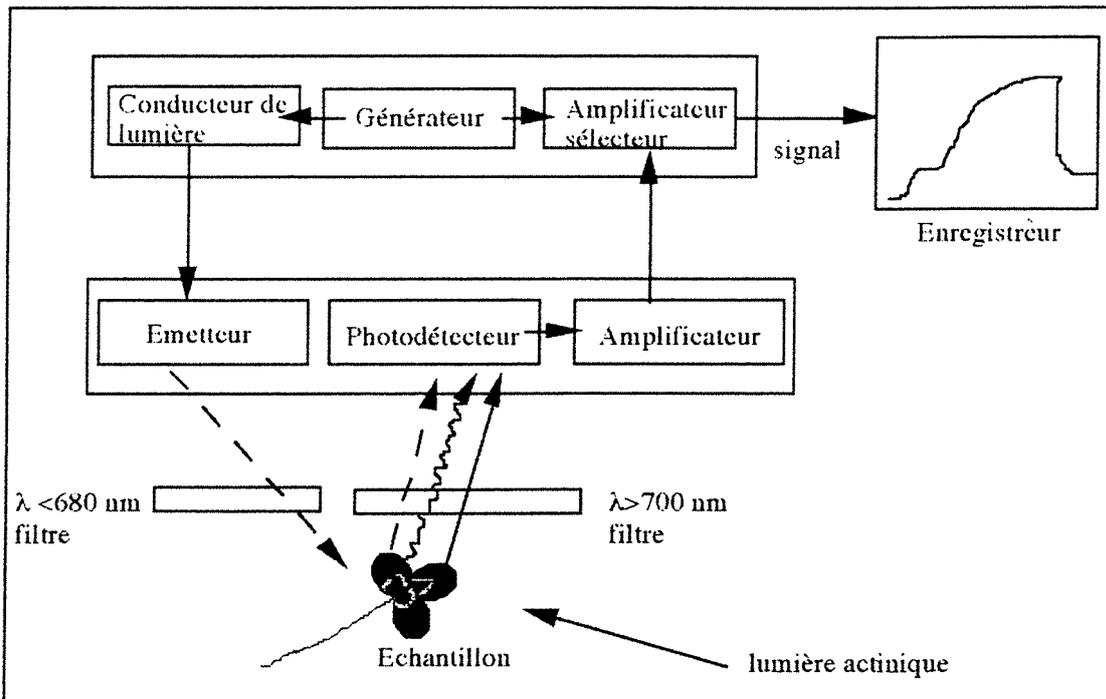


Figure A.3. Schéma descriptif de l'appareil de mesure de la fluorescence chlorophyllienne (PAM-2000).

ANNEXE 12

CHOIX DE LA TEMPERATURE UTILISEE EN PHYTOTRON

En général, le seuil limite de croissance du trèfle blanc est observé pour une température de l'air de 5°C (Menzi et al., 1991; Ollerenshaw et Baker, 1981). Cependant, en montagne, la croissance du trèfle blanc n'est vraiment effective que lorsque les températures dépassent 8°C et Munro et Hughes (1966) ont déterminé la température minimale comme étant de 9°C.

Notre but étant de comprendre les effets des basses températures sur le développement du trèfle blanc, il est indispensable de déterminer au préalable le seuil de température critique en dessous duquel les effets négatifs du froid sont visibles sur le trèfle blanc. Cette première expérience permettra également d'appréhender les effets du froid seuls sur la morphogénèse du trèfle blanc.

Matériel et méthodes :

Des boutures de trèfle blanc variété Huia ont été réalisées dans les conditions décrites au chapitre 2. Après 15 jours de développement en serre, les boutures ont été placées dans les conditions contrôlées suivantes : 10 h de photopériode; intensité lumineuse de 250 mmoles de photons.m⁻².s⁻¹; humidité relative de 70% et quatre niveaux de températures :

- + 5°C (+-2°C) jour/nuit
- + 8°C (+-2°C) jour/nuit
- + 13°C (+-2°C) jour/nuit
- + 20°C (+-2°C) jour/nuit

Chaque traitement est constitué de 30 plantes. Trois séries de mesure ont été réalisées à 10 jours d'intervalle sur chaque lot.

Les paramètres mesurés sont les suivants :

- nombre de feuilles développées (par plante) ;

- nombre de noeuds (par plante) ;
- surface foliaire sur une moyenne de 10 feuilles par plante ;
- biomasse des feuilles, stolons et racines après séchage à 80°C ;
pendant 24 heures à l'étuve ;

Résultats-Discussion :

Après 20 jours de croissance, les résultats obtenus pour chaque température sont très significativement différents (tab A.1). Entre 5 et 8°C, il existe très peu de différences tant pour l'apparition des feuilles ou des noeuds que pour la biomasse des organes. Au-delà de 8°C, les plantes commencent à croître et les valeurs deviennent très significativement supérieures à partir de 13°C.

	J 0		J 10				J 20			
	Serre	5°C	8°C	13°C	20°C	5°C	8°C	13°C	20°C	
nombre de feuilles	2,6 a	2,8 c	3,2 c	4 c	6,2 b	3,8 c	2,3 c	7 b	14 a	
nombre de noeuds	3,1 a	3 d	3,4 cd	5 bc	6 b	3 cd	3 cd	6,5 b	14,5 a	
surface foliaire totale (cm ²)	5 a	3 c	8 b	13 a	14 a	5 c	8 c	27 a	32 a	
BIOMASSES DES ORGANES (mg. Plante⁻¹)										
biomasse foliaire	20 a	35 cd	40 bcd	58 c	80 b	45 bcd	43 bcd	140 a	160 a	
biomasse stolons	15 a	20 bcd	25 bcd	20 bcd	40 b	12 bcd	38 bc	72 a	80 a	
biomasse racines	4 a	7 d	17 cd	18 cd	35 c	19 cd	25 c	55 b	85 a	

Tableau A.1 : Evolution des paramètres morphologiques du trèfle blanc soumis à 4 températures différentes, sur trois séries de mesures (J0, J10 et J20). Les lettres a,b,c,d, désignent les groupes statistiquement différents au seuil de 5% selon le test de Bonferoni.

Conclusion :

Les résultats très significatifs de cette étude montrent qu'en dessous de 8°C, la morphologie du trèfle blanc est affectée. Le rythme d'émission des feuilles est ralenti et leur surface totale est très réduite, le nombre de ramifications est également diminué. Globalement, la matière sèche de la plante est réduite par le froid, principalement celle des feuilles. De plus, dans nos conditions (10 h de photopériode, éclairage à 250 $\mu\text{moles de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), la température 5°C est celle qui limite le plus la croissance du trèfle blanc. Cette température a été définie par Côme (1992) comme la limite supérieure moyenne du froid. D'autres auteurs ont montré que la reprise de croissance du trèfle au printemps n'était effective que si la température devient supérieure à 5°C (Ollerenshaw et Baker, 1981 ; Menzi *et al.*, 1991). Pour la suite de nos expériences en conditions contrôlées, nous choisirons en conséquence de travailler à 5°C.

ANNEXE 13

CHOIX DE LA METHODE DE MESURE DU POTENTIEL OSMOTIQUE

Une partie de notre étude concerne l'état hydrique du trèfle blanc lorsqu'il est soumis à des faibles températures. Cet état hydrique sera caractérisé par la teneur en eau relative et par le potentiel osmotique Π_0 .

Deux méthodes existent pour mesurer ce Π_0 :

- la méthode à l'osmomètre ;
- la méthode des courbes pression-volume obtenue avec la bombe à pression de Schölander ;

La méthode à l'osmomètre est la plus rapide (cf principe de fonctionnement en chapitre 2). Mais elle a l'inconvénient de surestimer la pression osmotique car au cours de la collecte du suc cellulaire, la pression appliquée conduit à extraire en plus l'eau apoplastique. Ce volume d'eau mis en contact avec le liquide symplasmique va alors diluer la pression osmotique de ce dernier (Tyree et al., 1976).

La méthode des courbes pression-volume (CPV) évite cette erreur. Cette méthode permet de déterminer le potentiel hydrique ψ d'une feuille et ses composantes ; le potentiel osmotique Π_0 et le potentiel de turgescence Ψ_p en appliquant des pressions croissantes sur la feuille à l'intérieur d'une chambre à pression (Cruizat, 1989). En construisant une courbe de $1/\Psi$ en fonction du volume de sève recueilli, on peut alors déterminer le potentiel osmotique à pleine turgescence en extrapolant la courbe à $V=0$ (figure A.4). Cette méthode présente cependant l'inconvénient d'être très longue (environ 1 heure par échantillon). Elle est par conséquent difficile à mettre en oeuvre dans notre cas, étant donné le nombre de répétitions par traitement et le nombre de prélèvements que nous avons planifiés.

L'étude préliminaire présentée ici consiste à vérifier si les résultats que nous obtenons avec l'osmomètre sont corrects ou si le facteur dilution mis en cause est trop important pour valider nos mesures. Nous allons donc comparer les potentiels osmotiques mesurés avec l'osmomètre à ceux déterminés par les courbes pression-volume sur des feuilles de trèfle soumis à des températures froides. Cette étude nous permettra également d'appréhender les effets du froid sur le potentiel osmotique du trèfle blanc.

Matériel et méthodes :

Des boutures de trèfle blanc variété Huia sont conduites comme précédemment en serre et élevées pendant 4 semaines. Les plantes obtenues sont ensuite transférées en phytotrons dans deux conditions de température :

- froid : 5°C jour/nuit ;
- témoin : 20°C /15°C jour/nuit ;

Les conditions d'éclairage, photopériode et humidité sont les mêmes que précédemment.

Dès le transfert, un prélèvement est effectué une fois par semaine pendant 4 semaines. Chaque prélèvement est constitué de 4 répétitions par traitement.

Les mesures de potentiel osmotique sont effectuées selon les deux méthodes. Nous détaillerons ici uniquement la méthode des courbes pression-volume, celle à l'osmomètre étant déjà décrite en chapitre 2.

Une feuille de trèfle est placée dans la chambre à pression, le pétiole vers le haut. En augmentant progressivement la pression dans l'enceinte, un ménisque de sève apparaît à l'extrémité du pétiole. Cette sève est recueillie successivement à l'aide d'un papier absorbant et pesée pour chaque pression appliquée. La collecte est terminée lorsque l'on ne recueille plus de sève à l'extrémité du pétiole. Avant le début de la mesure, le poids frais initial de la feuille (P_i) est déterminé. Pour chaque pression appliquée, la quantité de sève recueillie P_r est soustraite à P_i . On obtient alors P' . Lorsque la mesure est terminée la matière sèche (P_s) de la feuille est déterminée.

On peut alors faire le rapport entre la sève restante dans la feuille et la sève totale recueillie :

$$Rs = \frac{\text{Sève restante}}{\text{Sève totale}}$$

$$Rs = \frac{P' - P_i}{P_i - P_s}$$

et tracer la courbe pression-volume de $1/P$ en fonction de $100-Rs$ (fig A. 4)).

Remarque / Nous avons transformé Rs en $100-Rs$ pour des raisons de facilité de lecture de la courbe.

La courbe obtenue nous permet de déterminer les composantes hydriques de la plante (fig A.4). Cette courbe est composée de deux parties. Dans la première partie, les deux composantes osmotiques et de turgescence apparaissent. Dans la seconde partie, qui est linéaire, seule la composante osmotique apparaît car la pression de turgescence est nulle (Cruizat et al., 1989). L'extrapolation de la droite à $100-Rs = 0$ permet d'estimer $1/FP_{100}$ (potentiel osmotique à pleine turgescence).

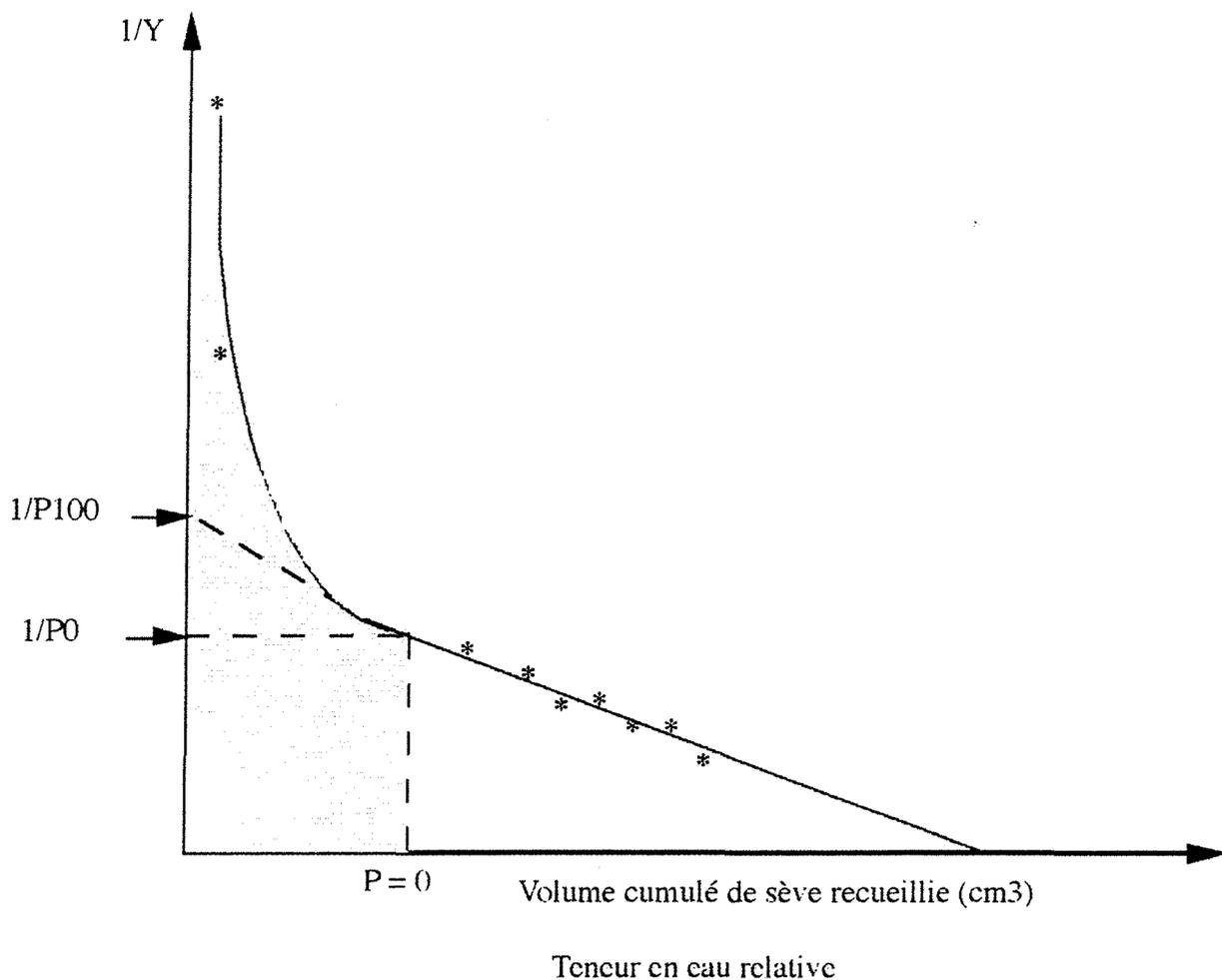


Figure A. 4. : Diagramme d'une courbe pression volume (CPV) typique *i.e* relation entre $1/Y$ et le volume cumulé de sève recueillie. V_s est le volume de l'eau apoplastique, TER = teneur en eau relative de l'échantillon, $1/p_{100}$ et $1/p_0$ sont les inverses du potentiel osmotique à pleine et à zéro turgescence, respectivement (Cruiziat, 1989).

Résultats-Discussion :

Toutes les valeurs obtenues avec les courbes pression volume montrent des potentiels osmotiques inférieurs à ceux obtenus par l'osmomètre (tab A.2).

	5°C/5°C			20°C/15°C		
	osmomètre (1)	CPV(2)	rapport1/2	osmomètre(1)	CPV(2)	rapport1/2
J0	-1,05 (0,12)	-1,29 (0,04)	0,81	-1,02 (0,04)	-1,29 (0,08)	0,79
J8	-1,25 (0,10)	-1,34 (0,09)	0,93	-1,01 (0,10)	-1,23 (0,02)	0,82
J16	-1,34 (0,12)	-1,50 (0,12)	0,89	-1,10 (0,12)	-1,31 (0,13)	0,84
J24	-1,21 (0,06)	-1,40 (0,10)	0,86	-1,00 (0,04)	-1,33 (0,13)	0,76

Tableau A.2. Potentiels osmotiques (moyenne et écart type significatifs à 5%) des feuilles de trèfle soumis à des températures témoin (20°C/15°C) ou au froid (5°C/5°C) mesurés selon deux méthodes : osmomètre ou courbes pression-volume (CPV) et rapport des valeurs à l'osmomètre (1) sur les valeurs CPV (2).

Le rapport entre les valeurs mesurées avec l'osmomètre et les valeurs obtenues avec les CPV est constant chez les plantes témoin en fonction du temps et égal en moyenne à 0,80. Par contre, ce rapport n'est pas constant chez les plantes soumises au froid.

Il existe bien une dilution induite par le mélange du volume symplasmique au volume apoplasmique lors de la collecte de la sève dans la méthode à l'osmomètre. L'effet de dilution semble diminuer chez les plantes soumises à 5°C. Cette diminution pourrait être due à un volume apoplastique réduit lors d'un traitement au froid.

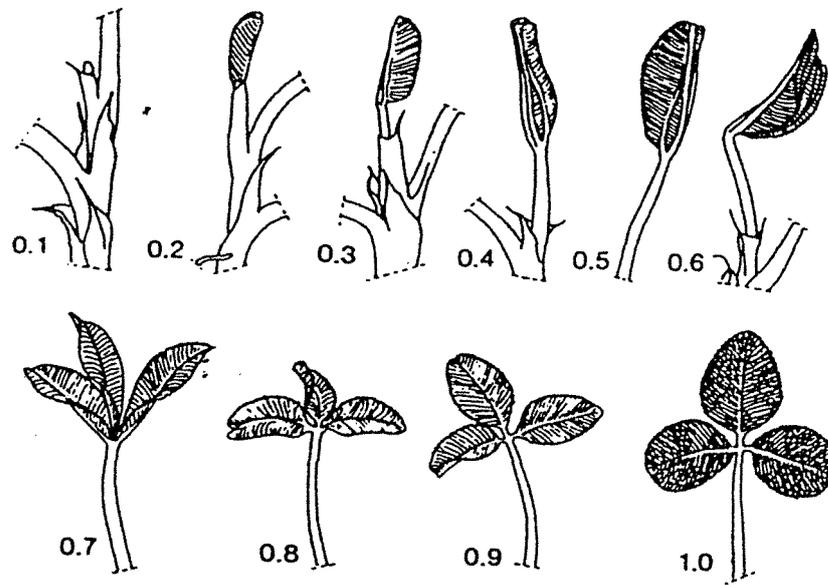
Pour les deux méthodes, le potentiel osmotique a diminué significativement chez les plantes soumises à 5°C ($p < 0,0001$) (tab. A.2). Cependant, nous ne pouvons conclure ici quand à l'existence d'un ajustement osmotique induit par le froid ne connaissant pas les teneurs en eau relative des feuilles de trèfle. Ces données laissent présager des résultats concernant cet aspect dans la suite de notre travail.

Conclusion :

En conclusion, nous avons montré dans nos conditions expérimentales que la méthode à l'osmomètre donne dans l'absolu des valeurs de potentiel osmotique plus élevées que celles que l'on peut obtenir avec des courbes CPV. Cependant, les résultats obtenus avec l'osmomètre montrent une diminution significative du potentiel osmotique chez les feuilles de trèfle soumis à 5°C. Nous pouvons donc penser que l'effet de dilution induit par la méthode ne masquera pas les effets escomptés du froid sur le potentiel osmotique. D'autre part, la différence entre les deux méthodes ne dépasse pas 20% et a même tendance à diminuer en cas de froid. Le choix d'utiliser la méthode à l'osmomètre, pour des raisons évidentes de facilité de mise en oeuvre n'est donc pas susceptible d'être remis en cause.

ANNEXE 14

**STADES DE DEVELOPPEMENT DES FEUILLES DE TREFLE (cv. LADINO)
D'APRES CARLSON (1966).**



SUMMARY

The persistence of white clover (*Trifolium repens* L.) is partly determined by the winter survival and spring regrowth. The aim of this work is to examine the effects of low temperatures on the morphogenesis and on the fate of carbon reserves in white clover. Experiments in the field show that the plant morphogenesis is mainly affected by the temperature (i.e. the actinothermic index). Carbon reserves (starch and free sugars) are stored in stolons, roots and leaves during the hardening period of the plant to chilling. The strongest mortality of leaves during winter are caused by repetitive alternating periods of frost - defrost occurring at the beginning of the cold period. This leads to a strong starch consumption in stolons. Frosts simulated in a controlled environment induced a dehydration of plant tissues, less marked for hardened plants. We observed an osmotic adjustment in response to chilling, as solutes accumulated in cells. The free sugars contributed to 20 - 30% of this osmotic potential, showing that compounds other than sugars are involved. A comparison of cultivars indicated that Aberherald has a leaf appearance rate similar to Huia in our experimental conditions. The best yield of Aberherald at the first cut in the spring is explained by bigger leaves, longer petioles and stolons, and thicker stolons rather than by a higher leaf appearance rate. Therefore Aberherald has an adaptive value to low temperature higher than Huia. During winter and spring, carbon reserves do not limit the leaf appearance rate at stolon tips but influence the size of new organs. The plant responses to low temperature are discussed in terms of mechanisms of tolerance, resistance, and adaptation.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur NOSBERGER, Professeur, ETH Université Zurich
(Suisse),**

Monsieur SIMON, Directeur de Recherche, IRBA Université de Caen.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle GUINCHARD Marie-Pierre

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Comportement hivernal du Trèfle blanc (*Trifolium repens* L.).
Morphogénèse et rôle des réserves carbonées".**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES**



Fait à Vandoeuvre le, **2 Octobre 1995**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS

A handwritten signature in black ink, followed by a circular official stamp of the Institut National Polytechnique de Lorraine.

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

RESUME

La pérennité du trèfle blanc (*Trifolium repens* L.) est en partie conditionnée par sa survie hivernale et sa reprise printanière. L'objectif du présent travail est de déterminer les effets des basses températures sur la morphogénèse et sur l'évolution des réserves carbonées du trèfle blanc. Des suivis expérimentaux réalisés en plein champ montrent que la morphogénèse du trèfle est principalement sous la dépendance de la température et notamment de l'indice actinothermique. Des réserves carbonées (amidon et sucres solubles) sont accumulées dans les stolons, les racines et les feuilles, caractérisant un durcissement de la plante aux basses températures. Les plus fortes mortalités foliaires observées pendant l'hiver sont dues aux alternances rapides de gels et dégels, notamment en début d'hiver et qui conduisent à une forte consommation de l'amidon stocké dans les stolons. Des gels simulés en conditions contrôlées induisent une déshydratation des plantes, moins forte chez les plantes endurcies. En réponse aux basses températures positives, on observe une accumulation de solutés dans les cellules, conduisant à un ajustement osmotique. Les sucres solubles contribuent pour 20 à 30% à cet ajustement osmotique, indiquant que des composés autre que les sucres interviennent. Une comparaison variétale montre que dans nos conditions expérimentales, Aberherald présente un taux d'émission des feuilles identique à Huia. Le meilleur rendement en matière sèche de Aberherald observé au champ à la première coupe est dû à des feuilles plus grosses, des pétioles et des stolons plus longs et plus épais. Ainsi Aberherald possède une valeur adaptative au froid supérieure à Huia. En période hivernale et printanière, les réserves carbonées ne limitent pas le taux d'émission des feuilles mais influencent la croissance des organes émis. Les réponses de la plante au froid concernant la morphogénèse et les réserves carbonées sont discutées en terme de mécanismes de tolérance, de résistance et d'adaptation.