



HAL
open science

Mise en place du volume et dépôt de composés carbonés et azotés au cours de la croissance de la feuille de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.)

Isabelle Maurice

► To cite this version:

Isabelle Maurice. Mise en place du volume et dépôt de composés carbonés et azotés au cours de la croissance de la feuille de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.). Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997. Français. NNT : 1997INPL130N . tel-01776291

HAL Id: tel-01776291

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776291v1>

Submitted on 24 Apr 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>

97 INPL 130 N

Académie de NANCY - METZ
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

INRA - Lusignan
STATION D'ECOPHYSIOLOGIE DES
PLANTES FOURRAGERES

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR
DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité « Sciences Agronomiques »

par

Isabelle MAURICE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

**Mise en place du Volume et Dépôt de Composés Carbonés et Azotés
au cours de la Croissance de la Feuille de Fétuque Elevée
(*Festuca arundinacea* Schreb.).**

Soutenue publiquement le 4 Novembre 1997 devant la commission d'examen composée de :

A. GUCKERT	Professeur à l'INPL - ENSAIA	Président
H. SCHNYDER	Professeur à l'Université Technique de Munich (Allemagne)	Rapporteur
F. TARDIEU	Directeur de Recherche INRA - Montpellier	Rapporteur
G. ALLARD	Professeur à l'Université de Laval (Québec)	Examineur
F. GASTAL	Professeur à l'INRA - Lusignan	Examineur



D 136 003333 6

Cette thèse a été réalisée avec le soutien de la Région POITOU - CHARENTES

[M] 1997 MAURICE, I.

Académie de NANCY - METZ
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

INRA - Lusignan
STATION D'ECOPHYSIOLOGIE DES
PLANTES FOURRAGERES

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR

DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité « Sciences Agronomiques »

par

Isabelle MAURICE

**Mise en place du Volume et Dépôt de Composés Carbonés et Azotés
au cours de la Croissance de la Feuille de Fétuque Elevée
(*Festuca arundinacea* Schreb.).**

Soutenue publiquement le 4 Novembre 1997 devant la commission d'examen composée de :

A. GUCKERT	Professeur à l'INPL - ENSAIA	Président
H. SCHNYDER	Professeur à l'Université Technique de Munich (Allemagne)	Rapporteur
F. TARDIEU	Directeur de Recherche INRA - Montpellier	Rapporteur
G. ALLARD	Professeur à l'Université de Laval (Québec)	Examineur
F. GASTAL	Directeur de Recherche INRA - Lusignan	Examineur

Cette thèse a été réalisée avec le soutien de la Région POITOU - CHARENTES

Remerciements

Lors de la rédaction d'une thèse, quand arrive le moment d'écrire les remerciements, je crois que cela signifie que le plus difficile est terminé. C'est donc avec un intense soulagement, et une joie immense que je vais citer ici les personnes qui m'ont aidé à mener à bien cette expérience.

En premier lieu, je tiens à remercier François Gastal, directeur de la Station d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères (SEPF) de l'INRA de Lusignan, pour avoir concocté un sujet évolutif. Sa rigueur et son expérience ont permis de canaliser mes débordements, tandis que sa disponibilité et son esprit de synthèse ont largement contribué à éclaircir et à enrichir mon propos.

Je remercie également Armand Guckert, professeur à l'ENSAIA, qui a su d'une part m'enseigner les bases de l'agronomie et des productions végétales, et aussi me faire découvrir le monde de la recherche. La place de président du jury qu'il me fait l'honneur d'occuper lui échoit tout naturellement.

De même, il était naturel de confier la lourde tâche de rapporteur à Hans Schnyder, professeur à l'Université Technique de Munich, car sa gentillesse et surtout sa connaissance immense de la croissance foliaire des graminées m'ont plus d'une fois aidé à voir plus clair dans ce processus si complexe.

François Tardieu, directeur de recherche au Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux de l'INRA de Montpellier, et Guy Allard, professeur à l'Université de Laval (Québec), ont accepté d'être respectivement rapporteur et examinateur de ce travail. Je tiens donc à leur manifester toute ma reconnaissance, et j'espère que ce mémoire leur donnera satisfaction.

D'autres personnes, tout aussi importantes, ont contribué à améliorer ce travail par leurs conseils, leurs questions et leurs critiques tout au long de ces trois années et des poussières. Il s'agit en particulier de Wendy Silk, professeur à l'Université de Davis (Californie), de Jerry Nelson, professeur à Columbia (Missouri) et de Gilles Lemaire, adjoint au chef du département agronomie de l'INRA. Qu'ils soient ici remerciés.

J'ai également eu l'occasion de travailler avec Yannick Hébert, directeur de recherche à la Station d'Amélioration des Plantes Fourragères. Sa bonne humeur permanente, sa disponibilité, sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils avisés m'ont aidé énormément. Je l'en remercie de tout cœur. De même, il me faut absolument témoigner de tout ce que je dois à Jean-Marie Girardeau, informaticien du centre INRA Poitou-Charentes. Sa présence aux Verrines était généralement synonyme de problème informatique, mais quel soulagement de le voir arriver !

Je tenais également à remercier chaudement toute l'équipe de la SEPF. D'une part, l'équipe scientifique, pour l'ensemble des discussions de salles ou de couloirs qui m'ont aidé tout au long de cette thèse (Hélène Gautier, garde chats diplômée, repartie en Avignon, Claude Varlet-Grancher, pas toujours optimiste, mais toujours attentif, Jean-Louis Durand, pour son enthousiasme, sa pipe, et ses photos rapportées des congrès, ainsi que Bruno Moulia, pour ses beaux yeux et son flegme quasi britannique). D'autre part, l'équipe technique sans qui aucune

« manip » ne serait possible. En effet, il faut d'abord multiplier les plantes, les placer sur solution nutritive, dans des bacs parfaitement adaptés (merci à Louissette Cousson, Christophe « toto » de Berranger et Gilles Millet). Pendant toute l'expérimentation, il faut faire très attention aux conditions de culture. Heureusement qu'il y a la Campbell, et, pour la dompter, Pascal Poussot ! Une fois les plantes récoltées, séchées, broyées, elles sont prêtes pour passer chez Carlo (merci à Louissette encore une fois, et à Jean-Pierre Terrasson) ! L'étape suivante fait intervenir les micros de la station (merci à tous !) et Annie Ciesla-Eprinhard, pour les réinstallations de Fig.P, les changements de souris et de cartouches d'impression. Les résultats présentés ici sont un peu les leurs.

De même, je serais bien ingrate si j'oubliais de citer « mes » stagiaires, qui ont peiné autant que moi sur ces ☯☽☪*☾☿☼ fétuques. Il s'agit bien sûr de Michael Hess, Françoise Barreau et Isabelle Dole, qui se sont relayés pour me tenir compagnie lors des mesures d'allongement foliaire dans la chambre de culture. J'en profite pour faire un clin-d'oeil à tous les stagiaires et visiteurs qui ont partagé un petit peu de Poitou : Catherine, Anne-Claire, Nathalie, Lydie, Olivier, Cynthia, Petra, Martha, Monica, Rudi, Douglas et le regretté Arturo.

N'allez pas croire que j'aie oublié Claude Cantot ! Sa position stratégique sur tous les plans la rend incontournable, pour notre plus grand bonheur. Pour son bonjour et son appel au « café, eau chaude » quotidiens ainsi que pour l'accueil familial et formidable que j'ai reçu tout au long de mon séjour dans le Poitou, et même après, je lui dois bien ces quelques lignes, et plus encore.

Comment oublier Frédérique Angevin, qui ne sourit que quand cela est ABSOLUMENT nécessaire, et encore ! Ses crises de mauvaise humeur avaient le mérite de me donner du courage. Quel exploit ! Les moments que nous avons partagés, en particulier ceux du calendrier Trash, resteront dans ma mémoire (vive). Je dois également une fière chandelle à Pierre Martre pour les dépannages nombreux que je l'ai obligé à faire durant l'été, et durant la dernière semaine de rédaction de ce mémoire. Je lui souhaite de trouver quelqu'un d'aussi disponible que lui pour le dépanner à son tour, le moment venu.

Enfin, il était impossible de ne pas citer Florence, que j'ai connu Tabourel, qui y a ajouté Tayot pour l'amour de Xavier (et de sa visa « sport »). Je l'admire pour plusieurs raisons : sa capacité de travail phénoménale (incroyable !), sa bonne humeur chronique (même si ça va pas, ça va) et surtout le courage qu'elle a dû déployer pour supporter une personne aussi dissipée que moi dans son bureau pendant trois ans. J'ai tout de même une question à lui poser : qu'est-ce qui est jaune, qui fait « piou-piou » et qui fait 200 kilos ?

Quelques mots encore pour remercier Jean Luc, Karine, Polo, Sébastien, Fréd, Anne, Tof, Gre, Yann et tous ceux qui m'ont fait passer des moments exceptionnels dans le Poitou et ailleurs.

Enfin, je voulais citer mes parents et Stéphanie, qui croient en moi quoi qu'il arrive, et aussi Régis et le Chat, qui m'aiment chacun à leur façon.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE, PROBLEMATIQUE ET DEMARCHE 1

A) Problématique agronomique 1

B) Problématique scientifique 1

B.1) Les peuplements herbacés pérennes 1

B.2) Quantité et qualité de la biomasse produite 2

B.3) Description de la croissance foliaire 3

- Morphologie
- Dynamique cellulaire
- Métabolisme azoté et carboné
- Transition de puits à source dans la feuille en croissance

C) Objectif et démarche 7

I. MISE EN PLACE DES DIMENSIONS DE LA FEUILLE AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT 9

I.A) Analyse bibliographique 9

I.A.1) Morphologie des feuilles de fétuque élevée 9

I.A.2) Développement de la feuille 11

I.B) Matériel et méthodes 14

I.B.1) Matériel végétal et conditions de culture 14

I.B.2) Déroulement des prélèvements 14

I.B.3) Dimensions de la feuille 15

I.B.4) Croissance en longueur et distribution de la croissance le long de la feuille 16

I.B.5) Suivi d'éléments matériels 18

I.C) Résultats et discussion 20

I.C.1) Allongement foliaire 20

I.C.2) Distribution de la croissance en longueur 20

I.C.3) Largeur et épaisseur moyenne 21

I.C.4) Distribution de la croissance en largeur et en épaisseur	23
I.C.5) Espaces lacuneux du mésophylle	25

Conclusion	26
-------------------------	-----------

II. FLUX DE MATIERE SECHE ET DE CARBONE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA FEUILLE

II.A) Analyse bibliographique	28
--	-----------

II.A.1) Méthode d'analyse des flux de matière	28
---	----

II.A.2) Le carbone dans la plante	31
---	----

II.A.3) Métabolisme carboné dans la feuille en croissance	32
---	----

II.B) Matériel et méthodes	34
---	-----------

II.B.1) Matériel végétal	35
--------------------------------	----

II.B.2) Calcul des flux de matière	35
--	----

II.B.3) Dosage des sucres solubles	37
--	----

II.B.4) Dosage des fibres	37
---------------------------------	----

II.C) Résultats et discussion	38
--	-----------

II.C.1) Masse linéique et dépôt par unité de longueur	38
---	----

II.C.2) Masse volumique et dépôt par unité de volume	39
--	----

II.C.3) Sucres non structuraux	42
--------------------------------------	----

II.C.4) Fibres	44
----------------------	----

Conclusion	46
-------------------------	-----------

III. FLUX D'AZOTE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA FEUILLE

III.A) Analyse bibliographique	47
---	-----------

III.A.1) L'azote dans la plante	47
---------------------------------------	----

III.A.2) L'azote dans la feuille en croissance	48
--	----

III.A.3) Position du problème	50
-------------------------------------	----

III.B) Matériel et méthodes	51
III.B.1) Expérimentation I	51
III.B.2) Expérimentation II	52
III.B.3) Expérimentation III	52
• Conditions de culture	
• Mesures	
• Prélèvements	
• Calcul de la proportion de N_{ancien} et $N_{nouveau}$	
III.C) Résultats et discussion	55
III.C.1) Evolution des quantités d'azote le long de la feuille en croissance	55
III.C.2) Dépôt d'azote	57
• Dépôt par unité de longueur	
• Dépôt par unité de volume	
III.C.3) Utilisation de l'azote nouvellement assimilé	60
• Estimation de la composition isotopique de l'azote circulant	
• Evolution des stocks d'azote	
Conclusion	64
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70

ANNEXES

- ANNEXE I. Liste des publications et présentations
- ANNEXE II. Relation entre le dépôt par unité de longueur et le dépôt par unité de volume
- ANNEXE III. Protocole de dosage des WSC
- ANNEXE IV. Composition du détergent NDS
- ANNEXE V. Principe de dosage du carbone et de l'azote
- ANNEXE VI. Principe de la mesure de la composition isotopique d'un échantillon

Liste des abréviations :

ADF	Fibres résistantes au détergent acide (Acid Detergent Fibre).
d_ℓ	Taux de dépôt de matière sèche par unité de longueur ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
d_v	Taux de dépôt de matière sèche par unité de volume ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}.\text{h}^{-1}$).
d_{Nlin}	Taux de dépôt d'azote par unité de longueur ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
d_{Nvol}	Taux de dépôt d'azote par unité de volume ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}.\text{h}^{-1}$).
HR	Humidité Relative (%).
ML	Masse Linéique ($\text{mg}.\text{mm}^{-1}$).
MS	Matière Sèche.
MV	Masse Volumique ($\text{mg}.\text{mm}^{-3}$).
NDF	Fibres résistantes au détergent neutre (Neutral Detergent Fibre).
NDS	Solution de détergent neutre (Neutral Detergent Solution).
N_{lin}	Quantité d'azote par unité de longueur de feuille ($\mu\text{g}.\text{mm}^{-1}$).
NSC	Sucres non structuraux (Non Structural Carbohydrates).
N_{Surf}	Quantité d'azote par unité de surface de feuille ($\text{g}.\text{m}^{-2}$).
N_{Vol}	Quantité d'azote par unité de volume de feuille ($\text{mg}.\text{mm}^{-3}$).
PAR	Rayonnement photosynthétiquement actif (Photosynthetically Active Radiation).
r_ε	Taux d'épaississement relatif ($\text{mm}.\text{mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
r_ℓ	Taux d'élargissement relatif ($\text{mm}.\text{mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
REGR	Taux de croissance élémentaire relatif (Relative Elemental Growth Rate, $\text{mm}.\text{mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
Rubisco	Ribulose biphosphate carboxylase oxygénase.
TDF	Total Dietary Fibres.
VAF	Vitesse d'Allongement des Feuilles ($\text{mm}.\text{h}^{-1}$).
WSC	Sucres solubles dans l'eau (Water Soluble Carbohydrates).

INTRODUCTION GÉNÉRALE, PROBLÉMATIQUE ET DÉMARCHÉ

A) Problématique agronomique.

La production de fourrage est un atelier essentiel de nombreuses exploitations agricoles basées sur l'élevage. En effet, en 1994, la surface fourragère principale (SFP) représentait environ 60% de la surface agricole utile (SAU). La SFP est constituée principalement de prairies temporaires ou permanentes (environ 90% en 1994). Néanmoins, la production fourragère des prairies est souvent variable, tant en terme de quantité que de qualité. Les peuplements prairiaux sont caractérisés par leur fonctionnement spécifique (pérennité du peuplement, niveau de compétition élevé inter- et intraspécifique, repousse après des défoliations de fréquence et d'intensité très variables). Ils sont également soumis à des modes de conduite et d'exploitation toujours plus nombreux, qui tentent d'allier économies de temps et d'argent, optimisation de la qualité et, de plus en plus, limitation des pertes d'azote.

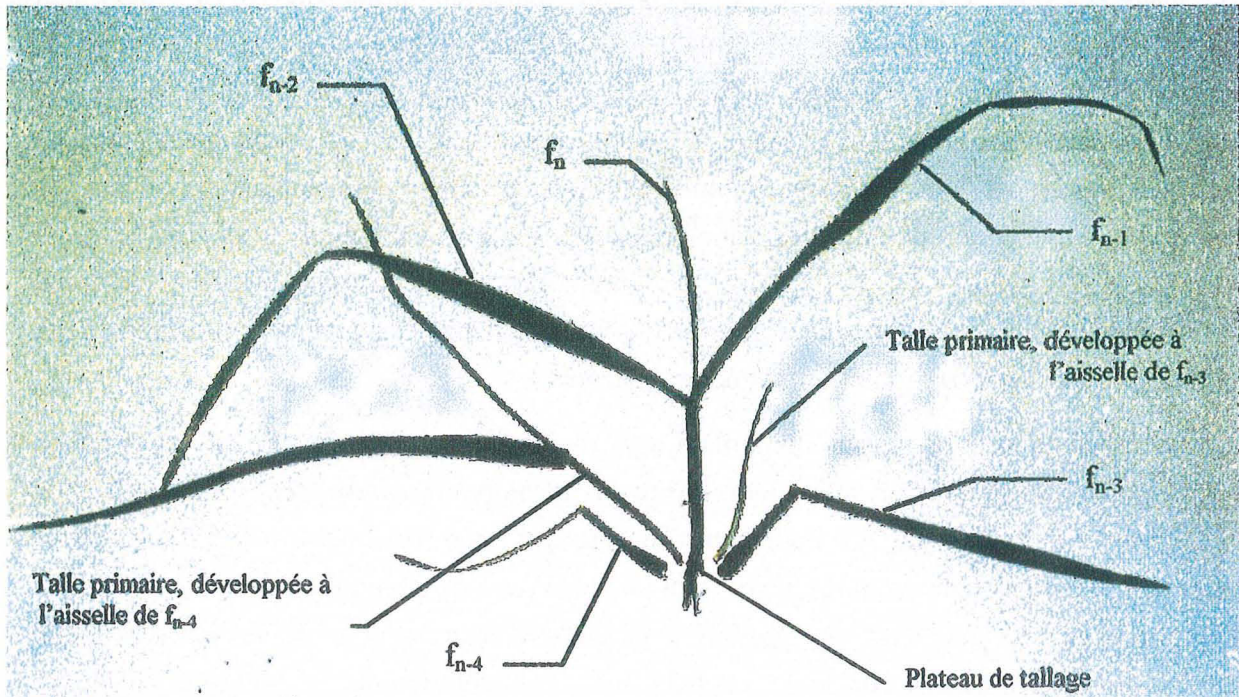
Il est donc important pour l'exploitant agricole de pouvoir disposer d'outils pour mieux gérer et prévoir sa production fourragère. Parmi les facteurs qui déterminent les variations de productivité, se distinguent généralement les facteurs non modifiables par l'agriculteur (température, rayonnement, nature du sol, pluviométrie car l'irrigation est rarement utilisée sur les prairies), et les facteurs sur lesquels l'agriculteur peut agir, c'est à dire son mode d'exploitation (fertilisation, intensité et fréquence des défoliations). L'optimisation de la production fourragère passe par la connaissance de l'effet de ces différents facteurs et de leur interaction sur la production en terme de quantité et par la maîtrise de la qualité tout au long de la repousse.

B) Problématique scientifique.

B.1) Les peuplements herbacés pérennes.

Les peuplements herbacés pérennes sont en général plurispécifiques, relativement denses, et soumis à des défoliations fréquentes, comme dans le cas du pâturage ou intermittentes dans le cas d'un régime de fauche. Les graminées fourragères sont des plantes herbacées, souvent

Figure 1. Représentation schématique d'une graminée fourragère. La talle principale est située au centre. Ses deux plus vieilles feuilles encore présentes sont f_{n-4} et f_{n-3} à l'aisselle desquelles deux talles secondaires se sont développées. La feuille f_{n-1} vient de terminer sa croissance en longueur, la feuille f_n est en croissance.



pérennes, qui représentent une des composantes essentielle des prairies - permanentes ou temporaires.

Chez les graminées, une plante est constituée d'un ensemble de ramifications appelées talles, elles-mêmes constituées de racines et de parties aériennes, et qui sont donc partiellement autonomes (figure 1). La talle « adulte » doit donc être considérée comme l'unité fonctionnelle de base de la plante. Après germination et levée, la vie d'une talle se caractérise par la succession de deux états : l'état végétatif, où le méristème apical produit uniquement des ébauches foliaires, et l'état reproducteur, où le méristème apical produit des ébauches d'épillets et de fleurs. Celui-ci se caractérise par la production d'une panicule, composée d'épillets, et se termine lors la maturité des graines. Si toutes les talles sont reproductrices, alors la plante meurt. C'est le cas des plantes annuelles. S'il reste des talles végétatives, la pérennité de la plante est assurée. Au niveau de la plante, les talles sont donc constamment renouvelées.

B.2) Quantité et qualité de la biomasse produite.

Dans le cas des fourrages, la quantité de biomasse exploitable par les animaux est une fraction de la biomasse aérienne qui dépend de l'intensité et de la fréquence des défoliations (régime de fauche ou de pâturage). La production de biomasse aérienne dépend de :

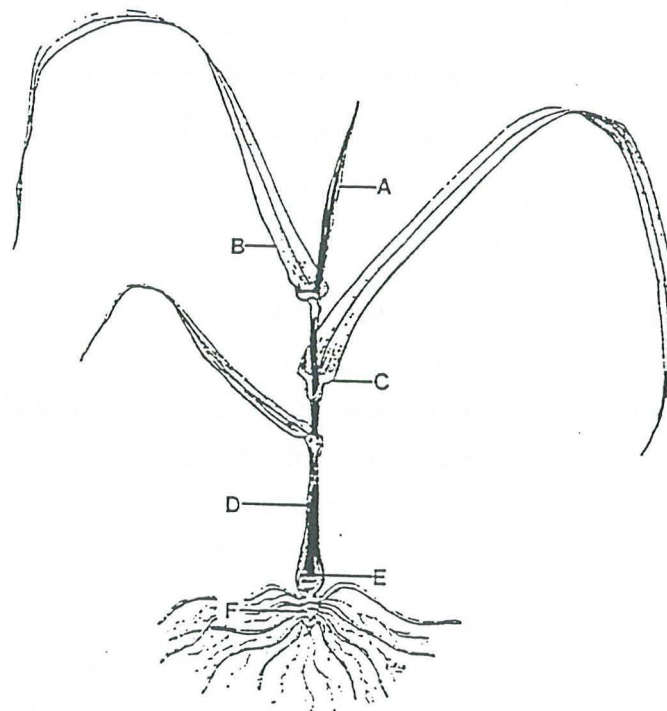
- l'acquisition des ressources en carbone (photosynthèse), en azote (absorption racinaire, réduction du nitrate et de l'ammonium) et autres minéraux ;
- l'utilisation de ces ressources : croissance des différents organes, stockages à plus ou moins long terme des ressources.

La vitesse d'expansion de la surface foliaire est le facteur déterminant de la productivité de nombreuses espèces cultivées (Watson, 1952). Dans le cas des graminées fourragères, la croissance foliaire est l'élément clé de la productivité, puisqu'elle détermine à la fois le potentiel d'interception du rayonnement et la fraction récoltable de la biomasse. Enfin, parmi les composantes de la vitesse de production de surface foliaire, la vitesse d'allongement des feuilles (VAF) est prépondérante (Nelson *et al.*, 1977 ; Horst *et al.*, 1978).

La qualité (encore appelée valeur alimentaire) de la biomasse produite par un peuplement fourrager est extrêmement variable, à la fois en fonction des facteurs du milieu et des pratiques culturales, mais également en fonction du cycle de végétation pendant lequel la récolte est effectué.

Figure 2. Diagramme représentant une talle de fétuque élevée : (A) feuille en croissance ; (B) limbe de la plus jeune feuille complètement développée ; (C) col ; (D) gaine ; (E) méristème apical de la tige ; (F) axe racinaire.

La zone de croissance en longueur de la feuille (A) est située dans les 30 à 40 premiers millimètres au dessus de son point d'insertion sur la tige. Elle est ici incluse dans les gaines des feuilles B, C et D (Nelson et MacAdam, 1989).



La qualité d'un fourrage est liée :

- à la plus ou moins grande dégradabilité des parois pecto-cellulosiques, liée à la composition de la cellulose mais aussi à la présence d'autres composés, comme la lignine, qui diminuent la digestibilité des parois (Moore et Hatfield, 1994).
- à la teneur en protéines et en sucres de la MS.

Les cellules du mésophylle, du phloème et de la gaine externe des faisceaux vasculaires des feuilles de graminées des régions tempérées gardent des parois fines et restent parenchymateuses. Par contre, les cellules épidermiques sont incrustées de cutine et les cellules des massifs de sclérenchyme, du xylème et de la gaine interne des faisceaux vasculaires acquièrent des parois secondaires épaisses et incrustées de lignine (Hanna *et al.*, 1973). Les facteurs du milieu influencent la morphologie foliaire, et par conséquent affectent plus ou moins la qualité. Par exemple, le rapport du nombre de cellules mésophylliennes sur le nombre de cellules épidermiques est affecté par la nutrition azotée (MacAdam *et al.*, 1989). L'éclaircissement modifie l'anatomie foliaire (Mitchell et Soper, 1958 ; Allard *et al.*, 1991), et influe sur la quantité d'azote présente dans les tissus, ainsi que sur la qualité fourragère (Deinum *et al.*, 1996). La température est un des paramètres environnementaux qui affecte le plus la qualité des fourrages (Buxton et Fales, 1994), en particulier au niveau de la répartition des assimilats carbonés entre le stockage de sucres non structuraux (NSC) et la synthèse de composés pariétaux (Gebrehiwot *et al.*, 1995).

Les conditions dans lesquelles la feuille effectue sa croissance ont donc une influence directe sur la qualité et la quantité de fourrage produit par un peuplement herbacé. L'analyse et la maîtrise de ces différentes composantes nécessitent une connaissance précise de la dynamique de la croissance foliaire.

B.3) Description de la croissance foliaire.

- **Morphologie.**

La feuille de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb., figure 2) est constituée de deux parties, le limbe et la gaine, séparées par un tissu plus dur, le col (C), sur lequel est implantée une languette membraneuse qui porte le nom de ligule. La partie basale est la gaine (D), ouverte, enroulée, qui est délimitée à la base de la feuille par le point d'insertion de la feuille sur la tige, et qui se termine au niveau de la ligule. Au-dessus de la ligule se trouve le

Figure 3. Représentation schématique de la position des zones de division, d'élongation et de maturation le long de la feuille en croissance.

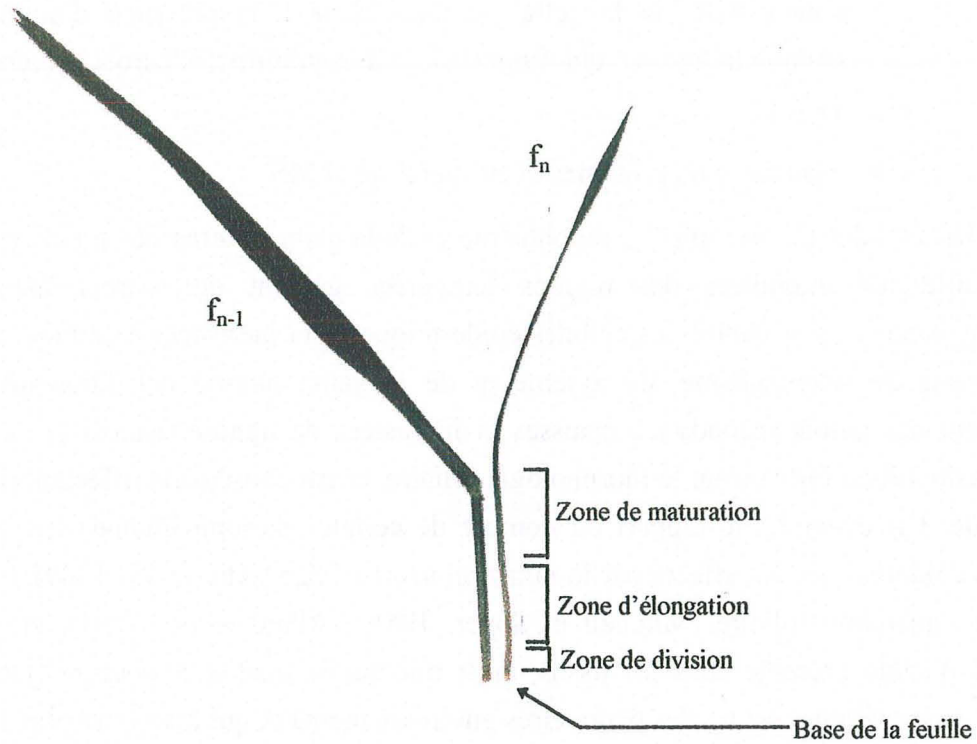
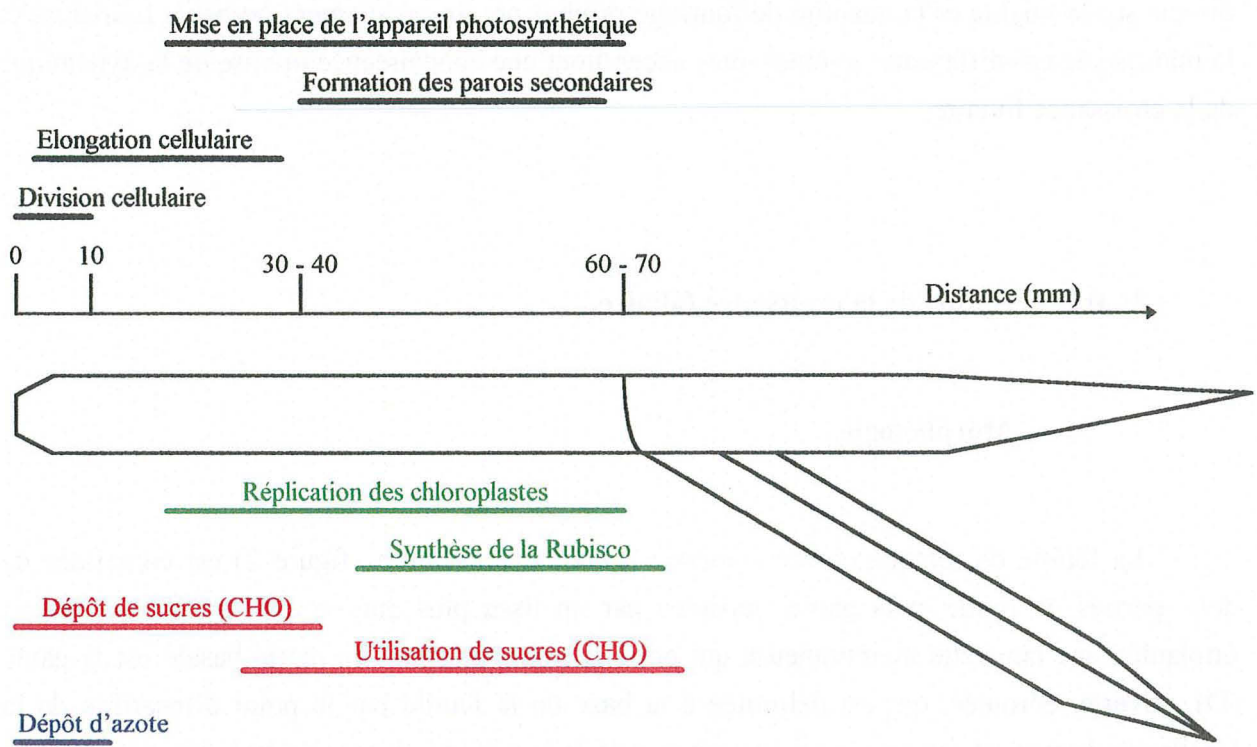


Figure 4. Diagramme représentant le gradient de développement le long de la feuille en croissance et les principales zones d'incorporation et d'utilisation de matière (Skinner et Nelson, 1995).



limbe (B), allongé, et orienté de manière à optimiser l'interception du rayonnement solaire (Nelson et MacAdam, 1989). Le limbe et la gaine sont issus de deux méristèmes intercalaires distincts qui se différencient avant que la feuille ne mesure 1 mm de long et que la ligule ne soit formée (Esau, 1965 ; Skinner et Nelson, 1994). Le limbe est formé en premier, mais il existe néanmoins un intervalle de temps pendant lequel le limbe et la gaine s'allongent simultanément (Schnyder *et al.*, 1990 ; Skinner et Nelson, 1994). Cela permet de traiter les zones d'élongation de la gaine et du limbe comme une seule zone continue en termes d'allongement cellulaire (Kemp, 1980).

- **Dynamique cellulaire.**

La zone de croissance en longueur est localisée à la base de la feuille (figures 3 et 4), dans les premiers centimètres, et elle est protégée du milieu extérieur par les gaines des feuilles précédentes (Soper et Mitchell, 1956 ; Davidson et Milthorpe, 1966 ; Kemp, 1980). Elle se compose d'une zone méristématique, la zone de division, jusqu'à environ 2 mm de la base de la feuille pour les cellules épidermiques, et jusqu'à 5 à 10 mm de la base pour les cellules mésophylliennes adjacentes (MacAdam *et al.*, 1989 ; Skinner et Nelson, 1994). Il faut noter que durant les premiers stades du développement foliaire, c'est à dire lorsque la feuille mesure moins de 1,5 mm de long, l'ensemble de la feuille est méristématique (Skinner et Nelson, 1994). Dans sa partie distale, la zone de croissance comporte une zone d'élongation cellulaire seule (sans divisions). L'allongement des cellules est permis par une entrée importante d'eau, conjointement à un relâchement des parois cellulaires, sous contrôle enzymatique (Cosgrove, 1986 ; Dale, 1988 ; Pritchard, 1994). Lorsqu'il n'y a plus de division, la taille des cellules augmente, jusqu'à atteindre la taille finale, ce qui détermine la fin de la zone de croissance. Les termes « zone d'élongation » sont souvent utilisés pour désigner à la fois la zone de division et la zone d'élongation au sens strict. La longueur de la zone de croissance est généralement comprise entre 20 et 40 mm.

Ainsi, les cellules sont produites à la base de la feuille, puis s'allongent jusqu'à atteindre leur taille finale. Simultanément, et jusqu'à l'arrêt de la croissance foliaire, elles sont également éloignées de la base de la feuille par un nombre grandissant de cellules qui s'intercalent entre elles et la base de la feuille. Il y a donc, à des positions de plus en plus éloignées de la base de la feuille, des cellules à des stades de développement de plus en plus avancés, ce qui se traduit par un gradient de développement cellulaire le long de la feuille en croissance (Prat, 1948 ; Schnyder et Nelson, 1987).

- **Métabolisme azoté et carboné.**

Du fait de son activité métabolique intense, la zone de division est un puits important pour l'azote, principalement sous forme réduite et soluble (Gastal et Nelson, 1994). L'ensemble de la zone de croissance est un puits important pour la MS en général, et les photoassimilats en particulier. Les flux nets de MS sont les plus élevés dans la zone où l'élongation et l'influx d'eau sont maximaux (Schnyder et Nelson, 1988 ; Schnyder *et al.*, 1988). Les sucres non structuraux (NSC) représentent entre 30 et 60% de la MS de la zone d'élongation (Volenc et Nelson, 1984b ; MacAdam et Nelson, 1987 ; Allard et Nelson, 1991). Dans cette partie de la zone de croissance, le flux net de NSC (saccharose, monosaccharides, fructanes) peut représenter jusqu'à 50% du flux net de MS (Schnyder *et al.*, 1988 ; Schnyder et Nelson, 1989). Le saccharose étant la forme de transport des NSC, Schnyder et Nelson (1987) ont montré que 52% du saccharose importé dans la zone où l'allongement est maximal sont utilisés dans des processus de biosynthèse, tandis que le reste est utilisé pour maintenir les concentrations en NSC dans les tissus. En particulier, 41% du saccharose importé sont stockés sous forme de fructanes. Le transfert rapide du saccharose depuis le cytoplasme vers la vacuole ainsi que la polymérisation en fructanes permettent de maintenir une entrée forte de saccharose (vraisemblablement par déchargement symplastique), et un potentiel osmotique important dans la vacuole, mais plus réduit dans le cytoplasme.

Lorsque la croissance en longueur a cessé, les cellules subissent une phase de différenciation (maturation), pendant laquelle sont mis en place les parois secondaires (MacAdam et Nelson, 1987) et l'appareil photosynthétique, en particulier la Rubisco (Dean et Leech, 1982 ; Gastal et Nelson, 1994). On considère généralement que la zone de maturation s'étend de la fin de la zone de croissance jusqu'à environ 100 mm de la base de la feuille (MacAdam et Nelson, 1987). La synthèse des parois secondaires nécessite une quantité importante de NSC, dont une partie (jusqu'à 50%) est fournie par l'hydrolyse des fructanes accumulés dans la vacuole lors de l'élongation (Schnyder *et al.*, 1988 ; Allard et Nelson, 1991). La mise en place de l'appareil photosynthétique implique également une forte demande, en particulier en acides aminés. Néanmoins, le flux net d'azote dans la zone de maturation est relativement faible par rapport au flux net observé dans la zone de croissance (Gastal et Nelson, 1994). Il se pose alors la question suivante :

L'azote importé dans la zone de division est-il remobilisé dans la zone de maturation pour contribuer à la mise en place de l'appareil photosynthétique ?

La zone de croissance et la zone de maturation sont donc des puits importants pour le carbone et l'azote, et elles sont théoriquement en compétition entre elles pour importer les assimilats provenant des feuilles matures de la même talle et de la partie de la feuille en croissance exposée à la lumière (Allard et Nelson, 1991). Il n'y a pourtant pas de corrélation entre la vitesse d'allongement des feuilles et la concentration en NSC dans les tissus en croissance (Volenc et Nelson, 1984b ; Davies *et al.*, 1989 ; Schnyder et Nelson, 1989). Par conséquent, soit que la croissance n'est pas affectée par la concentration en NSC, soit que la zone de croissance est une zone prioritaire dont les besoins en carbone sont satisfaits en priorité. Par contre, l'activité de la zone de maturation semble être beaucoup plus dépendante de la concentration en NSC : ainsi, le dépôt de MS structurale (MS hors NSC) est réduit la nuit dans la zone de maturation, quand la disponibilité en assimilats est réduite (Schnyder *et al.*, 1988). Les mécanismes gouvernant cette éventuelle priorité de la zone de croissance par rapport à la zone de maturation pour l'utilisation des glucides sont encore mal connus.

- **Transition de puits à source dans la feuille en croissance.**

La feuille est un organe à croissance déterminée, c'est à dire qu'elle cesse son développement à un moment donné, puis entame le processus de sénescence et enfin meurt, alors que la plante dans son entier poursuit sa croissance. La feuille de graminée en croissance croît par la base, tandis que la pointe de la feuille est active du point de vue photosynthétique dès son émergence au sommet des gaines des feuilles précédentes. Néanmoins, lorsque la pointe de la feuille est encore cachée dans les gaines, la feuille possède un statut de puits exclusif (Dale, 1985 ; Turgeon, 1989). Les besoins de la zone de croissance ne peuvent être satisfaits que par l'importation d'assimilats provenant d'une autre partie de la plante. Ces assimilats sont apportés sous forme de saccharose pour le carbone, tandis que l'azote est apporté sous forme réduite. La voie de déchargement semble essentiellement symplastique, comme cela a pu être observé dans les feuilles de dicotylédones (Ho, 1988 ; Turgeon, 1989). Par contre, dès qu'une partie du limbe est exposé à la lumière, l'assimilation photosynthétique du carbone et la réduction des nitrates peut se produire. La feuille peut alors satisfaire progressivement les besoins liés à sa propre croissance, et même exporter des assimilats vers d'autres puits par la suite.

Brégard (1996) a montré que la transition de puits à source de la feuille en croissance se produit lorsque le limbe mesure environ 80% de sa longueur finale chez la fétuque élevée en croissance végétative. Cela se traduit par le fait que le limbe en croissance cesse d'importer des sucres provenant des feuilles matures dès que la gaine mesure 8 mm de longueur. Il exporte alors du saccharose vers cette gaine en croissance et vers le limbe de la feuille en croissance suivante.

La transition de puits à source de la feuille s'effectue à un stade particulier du développement, qui semble dépendre de la force des puits (leur capacité de déchargement du saccharose depuis le phloème), et de l'activité des sources (notamment leur bilan carboné). Néanmoins, des expérimentations dans lesquelles la capacité source de carbone de la partie émergée de la feuille en croissance est inhibée par ombrage ont montré que la croissance du limbe n'est pas affectée, mais que celui-ci cesse d'importer du carbone dès sa croissance en longueur terminée, malgré son état puits pour la maturation (Turgeon (1984), sur tabac (*Nicotiana tabacum* L.) ; Brégarde (1996), sur fêtuque élevée). La transition de puits à source dans un tissu serait alors provoquée par la mise en place d'une polarité du phloème, qui ne pourrait plus décharger le saccharose, mais qui pourrait seulement l'exporter (Turgeon, 1984 ; Brégarde, 1996). Ainsi, le carbone nécessaire à la maturation des cellules ne pourrait provenir que de l'activité source de la feuille elle-même. Il en résulte la question suivante :

Comment la transition progressive de puits à source de la feuille affecte-t-elle la croissance et la composition des segments produits aux différents stades du développement ?

Pour répondre à une telle question, il est nécessaire d'analyser l'utilisation du carbone et de l'azote tout au long du développement de la feuille en croissance. Cela implique de tenir compte des changements de dimension (volume) des différents segments au cours du temps. D'où les questions :

Comment évoluent les dimensions de la feuille au cours de son développement ?

Comment intégrer ces variations de dimensions dans les calculs de flux de matière ?

C) Objectif et démarche.

La croissance en surface foliaire dépend donc plutôt de la cinétique de production de cellules à la base de la feuille (c'est à dire de l'activité de la zone de croissance en longueur), tandis que la qualité de la biomasse produite est fonction des parois cellulaires et des protéines mise en place dans la zone de maturation. A chacune de ces zones correspondent des utilisations spécifiques du carbone et de l'azote notamment, tandis que la feuille devient progressivement excédentaire et exportatrice d'assimilats carbonés et azotés.

Nos objectifs sont donc :

- de faire une analyse détaillée des flux de carbone et d'azote dans les différentes parties de la feuille au cours de sa croissance,
- de relier les flux de matière observés à la croissance en terme de volume (zone de croissance) et au phénomène de maturation (zone de maturation),
- de déterminer s'il existe une priorité de certaines zones par rapport à d'autres pour les composés carbonés d'une part et les composés azotés d'autre part.

Ces objectifs nécessitent d'une part la description précise des changements de forme au cours du développement de la feuille pour définir la croissance en terme de volume, d'autre part, la prise en compte de la transition de puits à source de la feuille.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons observé des lots de plantes comparables depuis l'émergence de la feuille en croissance jusqu'à la fin de la croissance en longueur de celle-ci. Nous avons effectué des mesures de la croissance et de l'évolution des différentes dimensions, et nous avons analysé la MS des feuilles en croissance du point de vue de l'azote et de différentes formes de carbone (NSC et fibres) au cours du temps.

L'analyse cinématique des données obtenues a permis :

- de caractériser la croissance dans les différentes dimensions, et donc de déterminer la manière dont la feuille est mise en place en terme de volume. Cet aspect «physique» de la croissance foliaire est présenté dans le chapitre I ;
- de déterminer les flux nets (ou taux de dépôt) des différentes formes de substrats carbonés le long de la feuille en croissance, et leur évolution lors de la transition de puits à source. Ces données sont présentées et l'éventuelle priorité de la zone de croissance sur la zone de maturation est discutée dans le chapitre II ;
- de quantifier les flux d'azote total et d'azote nouvellement assimilés le long de la feuille et tout au long de la croissance dans une situation où l'azote ne limite pas la croissance. Ces résultats sont présentés et discutés dans le chapitre III.

L'ensemble de ces résultats doit permettre d'intégrer dans l'espace et dans le temps les données existantes sur la croissance foliaire et de relier le fonctionnement des différentes zones de la feuille en croissance à la chronologie du développement de la feuille et de la plante entière.

CHAPITRE I.

MISE EN PLACE DES DIMENSIONS DE LA FEUILLE AU COURS DE SON DEVELOPPEMENT

Figure I.1. Coupe transversale de limbe de feuille mature de fétuque élevée après une coloration Fasga, observée en microscopie optique (x14). La cellulose est colorée en bleu, la lignine et la cutine sont colorées en rouge.



L'objectif de ce chapitre est de décrire la forme de la feuille et sa mise en place au cours de son ontogenèse en conditions non limitantes et d'essayer de déterminer les caractéristiques de la croissance dans les trois dimensions. Dans une première partie, nous faisons le point sur les connaissances déjà acquises sur l'anatomie et la morphologie foliaire, et sur les nombreuses données relatives à la croissance foliaire. La seconde partie décrit notre protocole expérimental et l'ensemble des calculs effectués pour l'analyse des résultats. Enfin, la troisième partie de ce chapitre présente les résultats concernant la description de la forme de la feuille, et sa mise en place, puis les discute. Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Annals of Botany* (Annexe I).

I.A) Analyse bibliographique.

I.A.1) Morphologie des feuilles de fétuque élevée.

Les graminées, comme toutes les monocotylédones, possèdent une nervation parallèle qui confère à leur feuilles un aspect étroit et allongé. La base de la feuille est constituée d'une gaine qui protège l'apex du milieu extérieur et entoure la base des feuilles suivantes. Chez la fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) les deux bords de la gaine se chevauchent.

La gaine et le limbe sont séparés par une membrane nommée ligule, qui posséderait une activité de sécrétion et faciliterait ainsi le passage de la feuille en croissance suivant le long de la gaine (Chaffey, 1996). Les bords du limbe sont plus ou moins parallèles à sa base (près de la ligule), mais se rapprochent graduellement pour former une pointe aiguë. La surface abaxiale du limbe est plate, tandis que la surface adaxiale possède des nervures longitudinales qui forment, en coupes transversales, des crêtes et des sillons caractéristiques (figure I.1).

Les feuilles en croissance sont enroulées et se déplient progressivement lorsqu'elles émergent du manchon formé par les gaines des feuilles précédentes.

Les coupes transversales de limbe de fétuque élevée montrent deux moitiés de limbe plus ou moins symétriques de part et d'autre de la nervure médiane. Les nervures de la face adaxiale

Figure I.2. Coupe transversale de limbe mature de fétuque élevée vue en microscopie optique (x170). Détail d'une crête après une coloration Fasga. On peut observer les cellules de l'épiderme abaxial (E_{ab}), celles de l'épiderme adaxial (E_{ad}), les groupes de cellules bulliformes (B), les massifs de sclérenchyme (Scl), le mésophylle (M) et un faisceau vasculaire (FV).

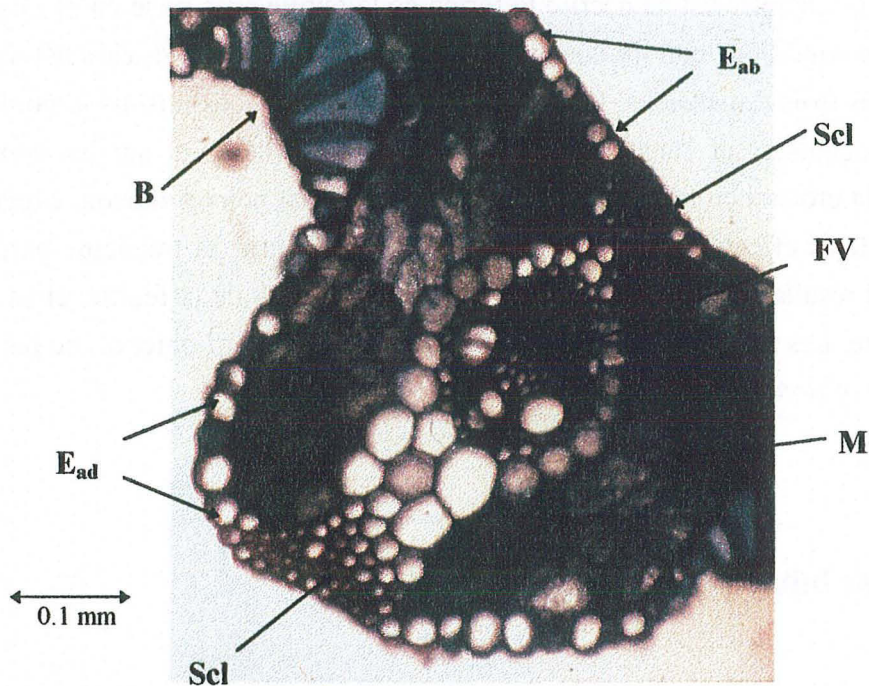


Figure I.3. Coupe transversale de limbe non déplié de fétuque élevée vue en microscopie optique (x90). Détail de la nervure médiane qui regroupe trois faisceaux vasculaires après une coloration Fasga. Les autres annotations ont la même signification que sur la figure I.2.

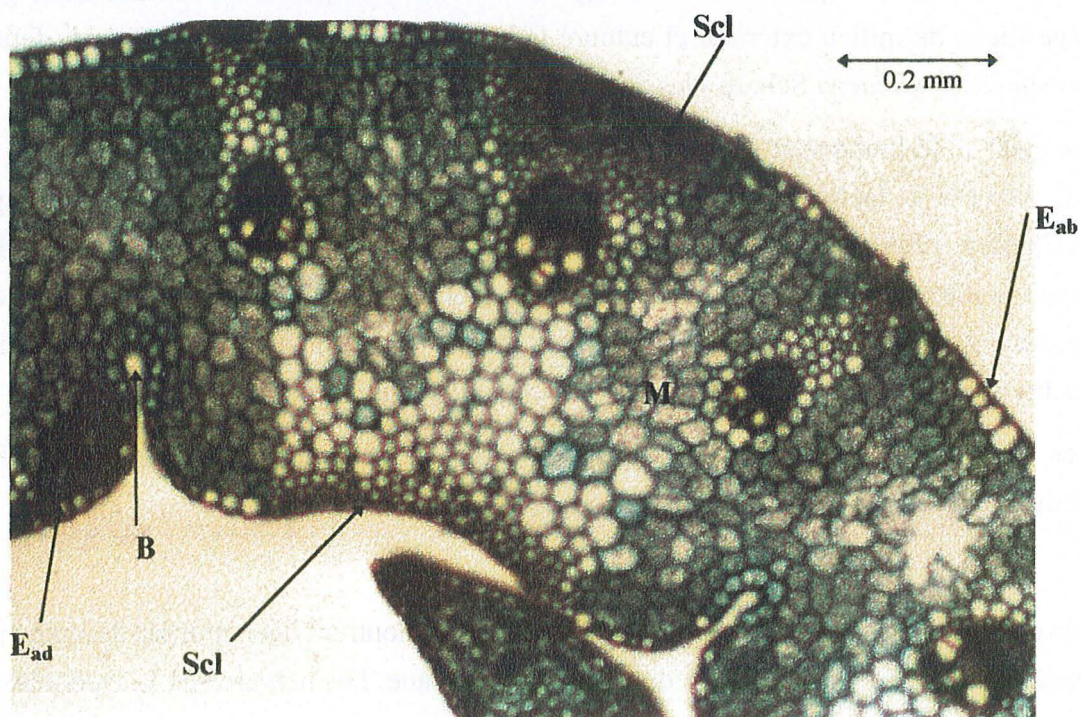


Figure I.4. Coupe transversale de limbe non déplié de fétuque élevée vue en microscopie optique (x240) : détail d'un faisceau vasculaire après une coloration Fasga. Les cellules du mésophylle (M), une partie du massif de sclérenchyme qui surplombe le faisceau et dont les parois sont plus ou moins lignifiées (Scl), la gaine externe (GE) et la gaine interne (GI) peuvent être distinguées. Le faisceau est constitué de phloème (Phl), entièrement cellulosique, et de métaxylème (Mx). Il faut noter également la lacune (L) à l'endroit où se trouvait le protoxylème. Ces vaisseaux mis en place et lignifiés très tôt au cours de la croissance du segment sont inextensibles et sont donc détruits lors de l'élongation.

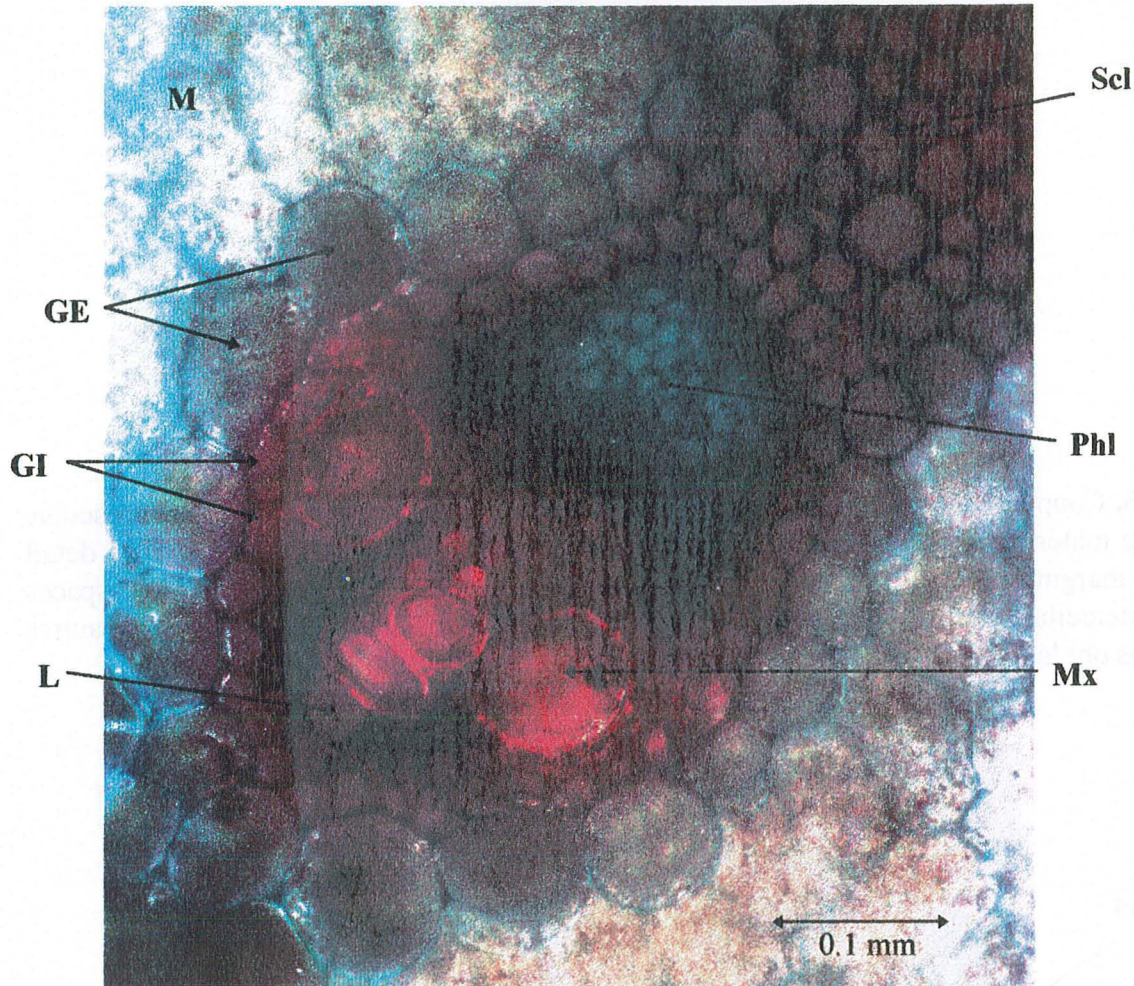
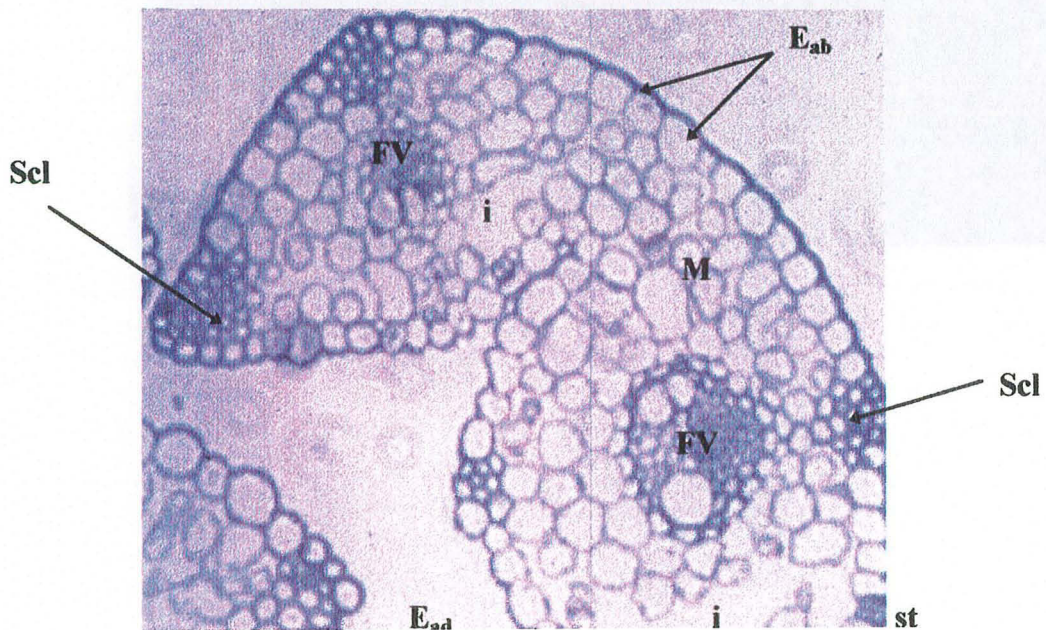


Figure I.5. Coupe transversale fine de limbe non déplié de fétuque élevée vue en microscopie optique (le matériel végétal a été inclus dans une résine de type Epon-Araldite ; x170) : détail des crêtes marginales. La finesse de la coupe (quelques microns) permet d'observer les espaces gazeux intercellulaires du mésophylle (i) et des complexes stomatiques (st). Les autres annotations ont la même signification que sur la figure I.2.

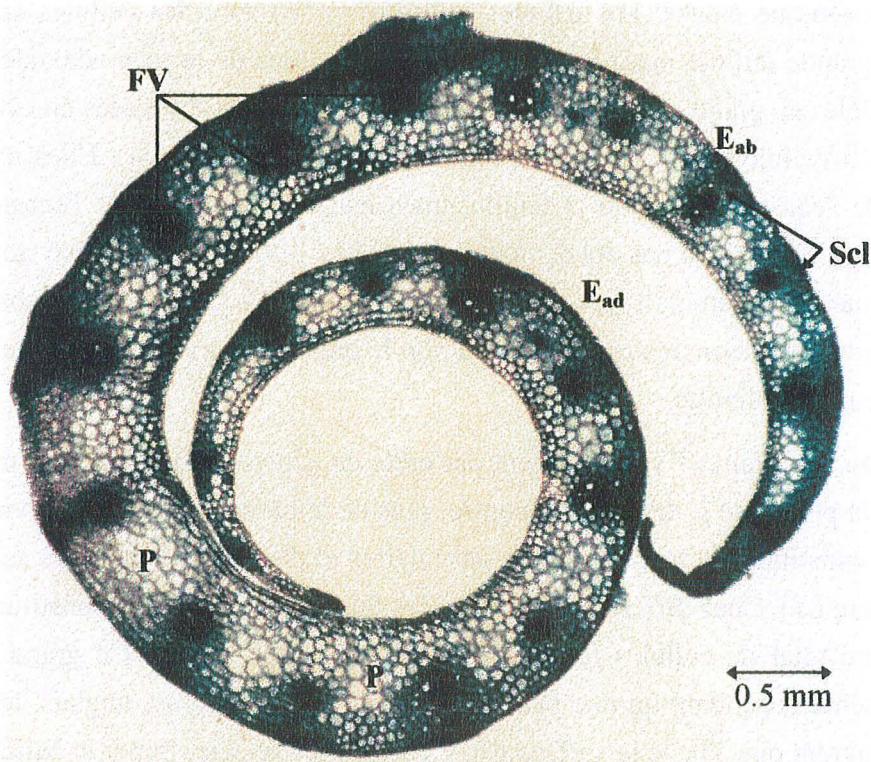


sont visibles sous formes de crêtes dont le centre est constitué par un faisceau vasculaire, tandis que la face abaxiale est plate. Le limbe (figure I.1) consiste en un squelette de faisceaux vasculaires parallèles à l'axe longitudinal de la feuille qui, avec l'épiderme et les massifs de sclérenchyme, soutient le mésophylle (Soper et Mitchell, 1956 ; Esau, 1965).

L'épiderme adaxial (E_{ad}) est constitué d'une seule couche de cellules dont les parois sont uniquement cellulósiques (coloration bleue avec le colorant Fasga : voir paragraphe I.B.3), tandis que les parois des cellules épidermiques de la face abaxiale (E_{ab}) sont subérifiées (coloration rouge avec le colorant Fasga, figure I.2). Selon Jellings et Leech (1982), chez différentes céréales, les cellules épidermiques constituent environ 10% du nombre total de cellules foliaires. Au niveau des coupes transversales, Soper et Mitchell (1956) ont déterminé, chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), que 32% de la surface d'une coupe transversale de limbe sont constitués de cellules épidermiques, tandis que Cohen *et al.* (1982) n'en comptent que 19% chez la fétuque élevée. Les cellules bulliformes (B) sont des cellules épidermiques particulières, de grande taille à maturité, situées dans les sillons de la face adaxiale et formant des massifs parallèles au grand axe de la feuille. Elles sont larges et disposées en éventail, leurs parois sont fines et cellulósiques (coloration bleue avec le colorant Fasga). Elles interviennent dans la gestion de l'eau au niveau de la feuille, mais leur rôle moteur dans l'enroulement des feuilles en cas de sécheresse n'a pas été démontré (Metcalfé, 1960). Le complexe stomatique est également constitué de différents types de cellules épidermiques, les cellules «subsidiaries» et les cellules de garde. Ces dernières permettent ou non le passage de l'air entre elles et contrôlent les échanges gazeux de la feuille.

Un faisceau vasculaire (FV) est présent par crête en général, et une nervure médiane peu marquée près de la pointe de la feuille. Par contre, près de la base du limbe, la nervure médiane est fréquemment constituée de trois faisceaux vasculaires et d'un grand massif de sclérenchyme les entourant (figure I.3). Chez différentes céréales, les faisceaux vasculaires constituent entre 30 et 40% du nombre total de cellules foliaires (Jellings et Leech, 1982). Ce grand nombre de cellules ne représente cependant qu'une petite surface : chez le ray-grass anglais, les faisceaux vasculaires ne couvrent que 3% de la surface d'une coupe transversale (Soper et Mitchell, 1956). Les faisceaux vasculaires majeurs ou de premier ordre (Metcalfé, 1960) contiennent des éléments de métaxylème et sont encerclés par des massifs de sclérenchyme formant des piliers transversaux allant quasiment d'un épiderme à l'autre (figure I.4). Les faisceaux vasculaires mineurs ne sont en général accompagnés que de petits massifs de sclérenchyme disjoints (figure I.5). Chez la fétuque élevée, les faisceaux vasculaires sont entourés par deux gaines constituées d'une couche de cellules chacune (Metcalfé, 1960). La gaine externe (GE) est de nature parenchymateuse (Brown, 1958), ses cellules sont plus grosses que celles du mésophylle ; la gaine interne (GI) est de nature endodermique, et les parois de ses cellules sont épaisses à maturité (Brown, 1958).

Figure I.6. Coupe transversale de gaine de fétuque élevée vue en microscopie optique (x24). Comme dans le limbe, les faisceaux vasculaires (FV) sont surmontés de massifs de sclérenchyme (Scl) et entourés de parenchyme (P) peu ou pas chlorophyllien. Les autres annotations ont la même signification que sur la figure I.2.



Le mésophylle (M) est constitué des cellules situés entre les deux épidermes, à l'exception des massifs de sclérenchyme et des faisceaux vasculaires entourés de leurs gaines (figure I.5). Chez différentes céréales, le mésophylle constitue entre 50 et 60% du nombre total de cellules foliaires (Jellings et Leech, 1982). Chez le ray-grass anglais, il représente 65% de la surface d'une coupe transversale (Soper et Mitchell, 1956), alors qu'il ne représente que 42% chez la fétuque élevée (Cohen *et al.*, 1982). La surface du mésophylle en coupe transversale varie également en fonction des conditions environnementales (Allard *et al.*, 1991). Le mésophylle est spongieux car il contient des espaces intercellulaires (i) remplis d'air dont une des fonctions principales est la distribution des gaz (Raven, 1996). Ainsi, les échanges gazeux internes au limbe sont favorisés par la grande surface cellulaire au contact de l'air développée dans le mésophylle, tandis que les échanges gazeux avec l'extérieur sont contrôlés par les stomates (st). L'arrangement des cellules du mésophylle est irrégulier : il n'est pas organisé de manière radiale autour des faisceaux vasculaires (Metcalf, 1960). Cet arrangement irrégulier, et ce volume d'espaces gazeux intercellulaires important sont des indications d'un type assez primitif (Brown, 1958).

Les coupes transversales de gaines de fétuque élevée (figure I.6) montrent, contrairement aux coupes transversales de limbe, un organe tubulaire et deux faces lisses (Soper et Mitchell, 1956). L'épaisseur de la gaine diminue progressivement vers les extrémités. Les faisceaux vasculaires ont la même structure que ceux du limbe, mais ils sont moins nombreux que dans le limbe. Il semble que seuls les faisceaux vasculaires majeurs soient continus entre le limbe et la gaine (Soper et Mitchell, 1956 ; Brégar, 1996). Les faisceaux vasculaires de la gaine présentent beaucoup plus d'interconnexions que ceux du limbe. La présence de stomates le long de la gaine n'est pas mentionnée, mais le parenchyme entourant les faisceaux vasculaires présenterait également des espaces gazeux intercellulaires, bien que de manière beaucoup moins marquée que dans le mésophylle du limbe et seulement dans la partie supérieure de la gaine (Soper et Mitchell, 1956).

Il est fréquent, dans les vieilles gaines, d'observer des massifs de parenchyme ayant dégénéré et cédé la place à de grands espaces lacuneux situés entre les faisceaux vasculaires (Soper et Mitchell, 1956).

I.A.2) Développement de la feuille.

Le développement des feuilles de graminées a été très étudié (*e.g.* Sharman, 1947 ; Soper et Mitchell, 1956 ; Esau, 1965 ; Williams, 1975 ; Skinner et Nelson, 1994 ; Beemster et Masle, 1996*b*). Le primordium foliaire apparaît comme une petite protubérance sur le côté de l'apex, un

Figure I.7. Image en microscopie électronique d'un apex de blé tendre à l'indice plastochronique (PI) 6.75.
 (A) vue de dessus, (B) vue de côté (Beemster et Masle, 1996b).

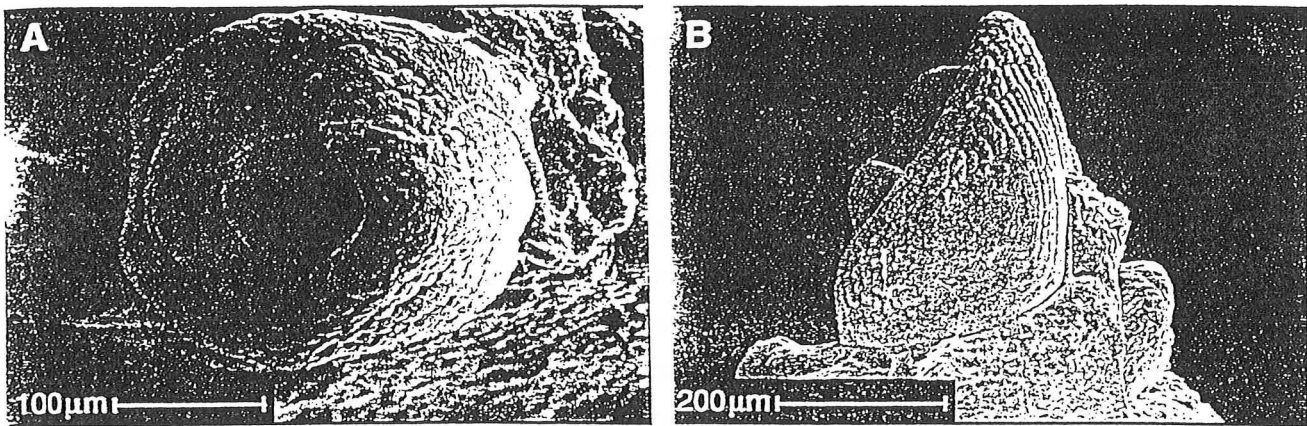
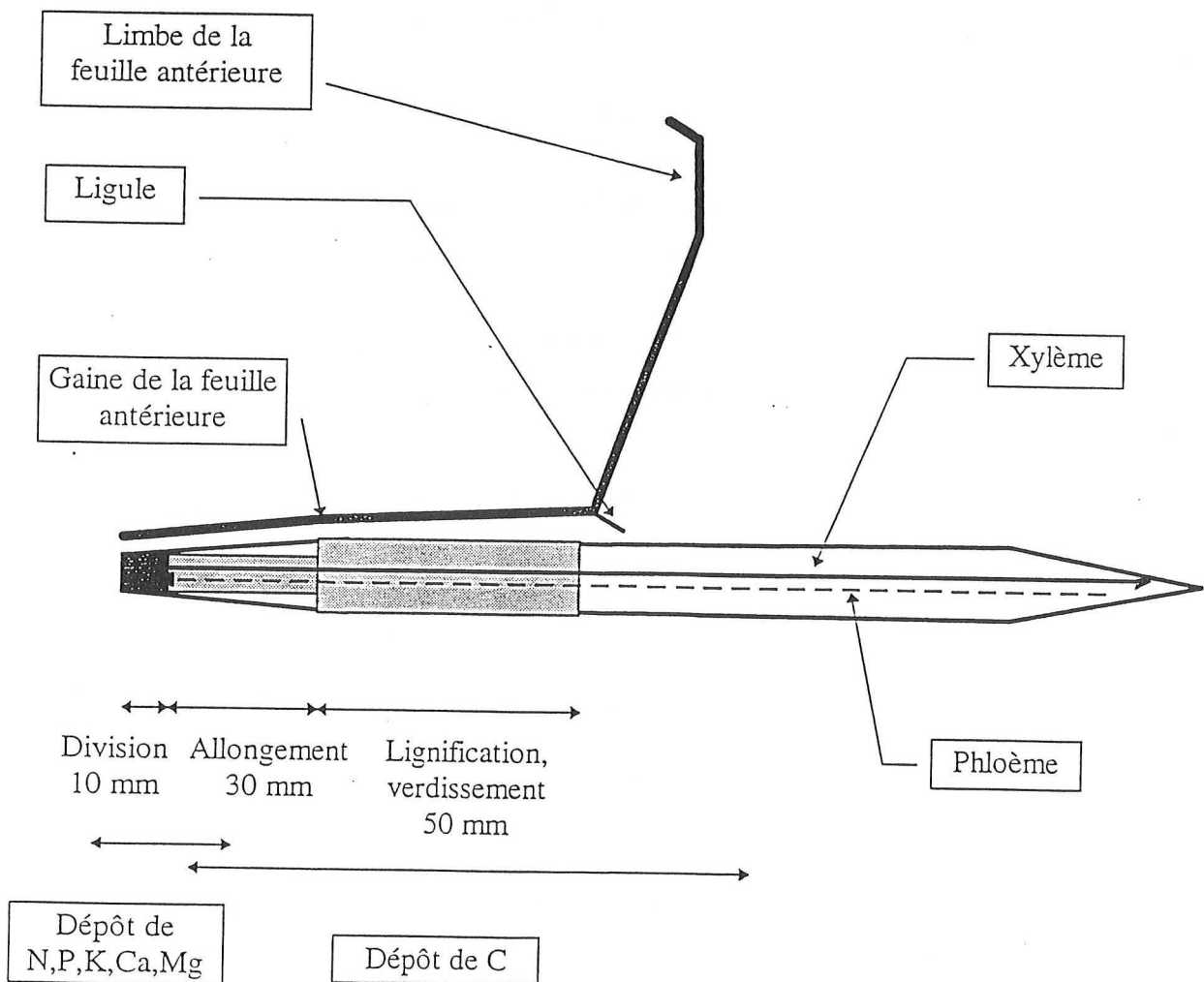


Figure I.8. Organisation spatiale d'une feuille de graminée en croissance (Durand *et al.*, 1995).



peu en dessous de la pointe (figure I.7). Il s'étend rapidement sur les côtés de manière à encercler l'apex, tandis que des divisions perpendiculaires à l'axe de l'apex (divisions longitudinales appelées aussi divisions de prolifération) produisent des files de cellules dont la longueur reste environ 20 μ m (Skinner et Nelson, 1994). Dans le cas de la fétuque élevée, comme la gaine est ouverte, les deux bords de l'ébauche foliaire se rejoignent et se chevauchent à partir du point opposé à l'endroit de l'initiation (Esau, 1965).

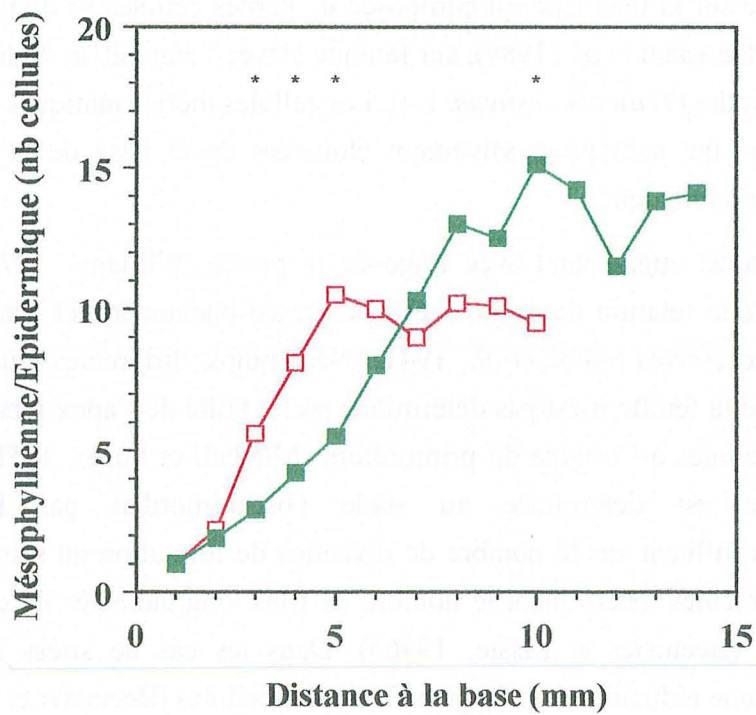
La ligule est initiée alors que la feuille mesure moins d'un millimètre de long (Skinner et Nelson, 1994), c'est à dire bien avant que la pointe de la feuille émerge des gaines des feuilles précédentes, comme il avait été suggéré.

Lorsque la feuille mesure entre 1 et 1.5 mm de long, les divisions cessent près de la pointe, et les cellules commencent à s'allonger. Il en résulte une croissance en longueur rapide de la feuille (Skinner et Nelson, 1994) et un confinement des processus de division à la base de la feuille. On emploie alors le terme de méristème intercalaire, qui désigne une région de croissance distincte du méristème apical (Esau, 1965). Durant toute la période de croissance foliaire, la zone de division (figure I.8) est confinée à la base de la feuille, près de la zone d'insertion de la feuille sur la tige. Elle est composée de petites cellules se divisant rapidement (13 h par cycle pour MacAdam *et al.* (1989), sur fétuque élevée ; entre 20 et 40 h pour Beemster *et al.* (1996), sur blé tendre (*Triticum aestivum* L.)). Les cellules méristématiques sont organisées en files longitudinales, qui sont progressivement éloignées de la base de la feuille par les nouvelles cellules qui s'intercalent.

La taille de l'apex augmentant avec l'âge de la plante (Williams, 1975), il avait été suggéré l'existence d'une relation de cause à effet entre ce phénomène et l'augmentation de largeur des feuilles successives (Abbe *et al.*, 1941). Néanmoins, différentes études ont montré que la largeur finale de la feuille n'est pas déterminée par la taille de l'apex lors de l'initiation, ni par le nombre de cellules à l'origine du primordium (Mitchell et Soper, 1958 ; Beemster et Masle, 1996b). Elle est déterminée au stade post-primordial par les conditions environnementales qui influent sur le nombre de divisions de formation au sein du méristème intercalaire, qui elles-mêmes déterminent le nombre de files longitudinales de cellules dans la largeur et l'épaisseur (Beemster et Masle, 1996b). Dans les cas de stress sévère, il peut également se produire une réduction de la largeur finale des cellules (Beemster et Masle, 1996a).

Une fois les phénomènes de division terminés pour une cellule donnée, celle-ci s'allonge de manière importante. Le taux d'élongation peut être exprimé par cellule et par unité de temps (les maxima sont alors de l'ordre de 0.05 à 0.07 h⁻¹, *e.g.* Volenec et Nelson (1981), sur fétuque élevée ; Beemster *et al.* (1996), sur blé tendre), mais il peut être exprimé par unité de longueur et par unité de temps (les maxima sont alors de l'ordre de 0.08 à 0.10 mm.mm⁻¹.h⁻¹, *e.g.* Schnyder *et al.* (1990), sur ray-grass anglais ; Gastal et Nelson (1994), sur fétuque élevée). Ainsi, selon les

Figure I.9. Nombre de cellules mésophylliennes adjacentes à une seule cellule épidermique dans un segment de 10 μm de long, à différentes positions de la partie basale de la zone de croissance. Les plantes ont poussé à 24°C, 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PPFD et ont reçu une fertilisation azotée de 336 kg.ha^{-1} (■ High N) et 22 kg.ha^{-1} (□ Low N). Une différence significative entre les traitements est indiquée par * (MacAdam *et al.*, 1989).



espèces et selon les conditions de croissance, les cellules épidermiques peuvent, entre la fin de la zone de division et la fin de la zone d'élongation, multiplier leur taille de 10 (MacAdam *et al.* (1989), sur fétuque élevée) à 50 fois (Schnyder *et al.*, 1990 ; Rademacher, communication personnelle, sur ray-grass anglais).

Les files longitudinales de cellules ne coulissant pas les unes contre les autres, le taux d'élongation relatif est le même pour les différents types de cellules épidermiques à une position donnée par rapport à la base de la feuille. Néanmoins, le taux de division variant d'un type de cellule à l'autre, les tailles de cellules contiguës peuvent être très différentes d'une file à l'autre (Beemster *et al.*, 1996). De plus, tous les types cellulaires ne cessent pas de se diviser au même moment, c'est à dire à la même position par rapport à la base de la feuille. Par exemple, les cellules du mésophylle continuent à se diviser plus loin que les cellules épidermiques (cela signifie que la zone de division des cellules du mésophylle est plus longue que celle des cellules épidermiques). Il en résulte que leur taille finale est quatre fois moins importante que celle des cellules épidermiques (Jellings et Leech, 1982). Le nombre de cellules mésophylliennes adjacentes à une cellule épidermique augmente donc lorsque l'on s'éloigne de la base de la feuille (figure I.9). Parallèlement, dans la zone d'élongation, des espaces gazeux intercellulaires apparaissent par séparation des parois cellulaires de cellules adjacentes. Ils confèrent son caractère lacuneux au mésophylle.

L'élongation cellulaire consiste essentiellement en un relâchement des parois cellulaires, qui est de nature enzymatique, et qui permet à la cellule de s'allonger, tandis que de nouveaux composés pariétaux sont inclus dans la paroi. Elle se termine en quelques heures (MacAdam *et al.*, 1989), et la cause de cet arrêt est encore mal connue.

Une fois l'élongation terminée commence le processus de maturation, qui permet à la cellule de devenir fonctionnelle. Ainsi, l'appareil photosynthétique est mis en place dans les cellules du mésophylle (Dean et Leech, 1982 ; Gastal et Nelson, 1994), et le dépôt des parois secondaires s'effectue en particulier dans les tissus de soutien (sclérenchyme intra ou extra vasculaire), dont les parois épaississent considérablement (Hanna *et al.*, 1973 ; MacAdam, 1988).

La gaine commence à grandir en même temps que le limbe cesse progressivement de croître, ce qui fait que ni la longueur de la zone de croissance longitudinale (Kemp, 1980), ni la vitesse d'élongation de la feuille (Schnyder *et al.*, 1990) ne sont modifiées au début de la transition entre la croissance du limbe et celle de la gaine. Ce n'est que lorsque la gaine a pratiquement atteint sa longueur finale et que la ligule est presque émergée que la vitesse d'allongement foliaire diminue rapidement.

Figure I.10. Obtention de boutures à partir de touffes de fétuque élevée.

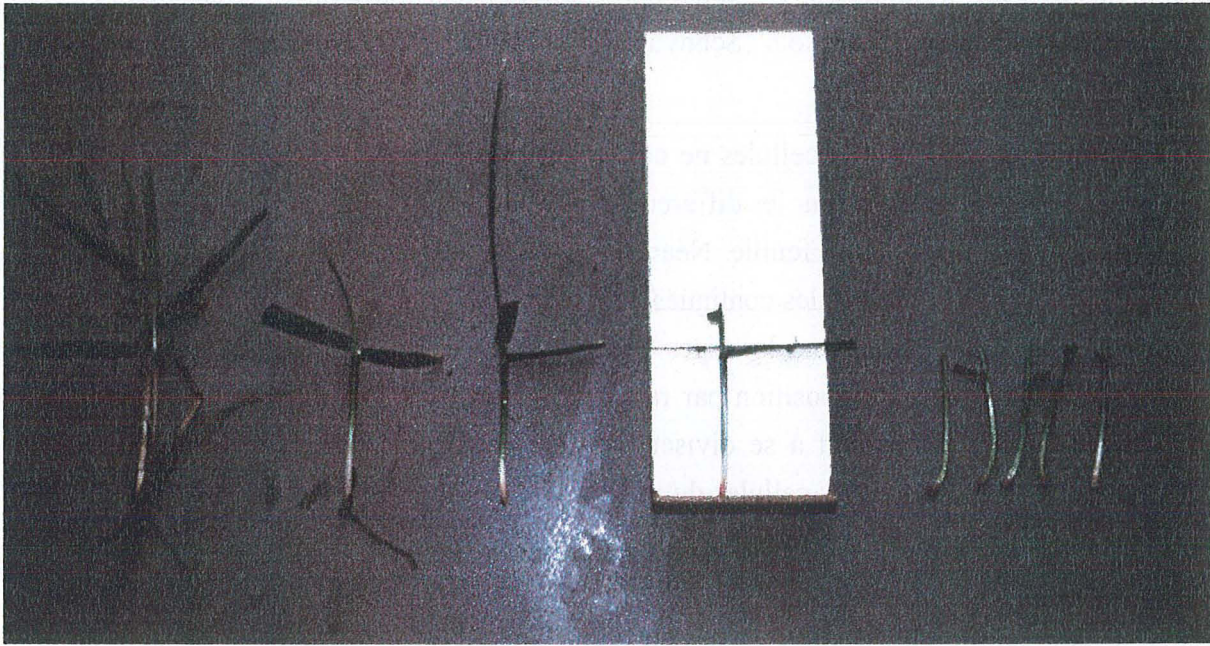


Figure I.11. Jeune talle de fétuque après 19 jours de repousse sur sable, juste avant le transfert en culture hydroponique.

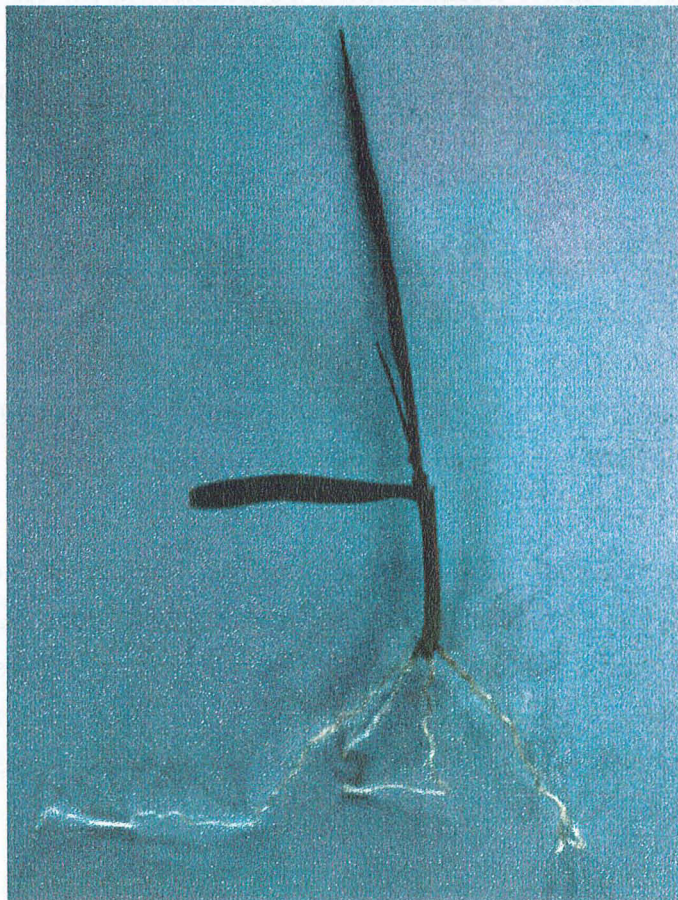


Figure I.12 Vue d'ensemble de la chambre de culture, avec les bacs contenant la solution nutritive.

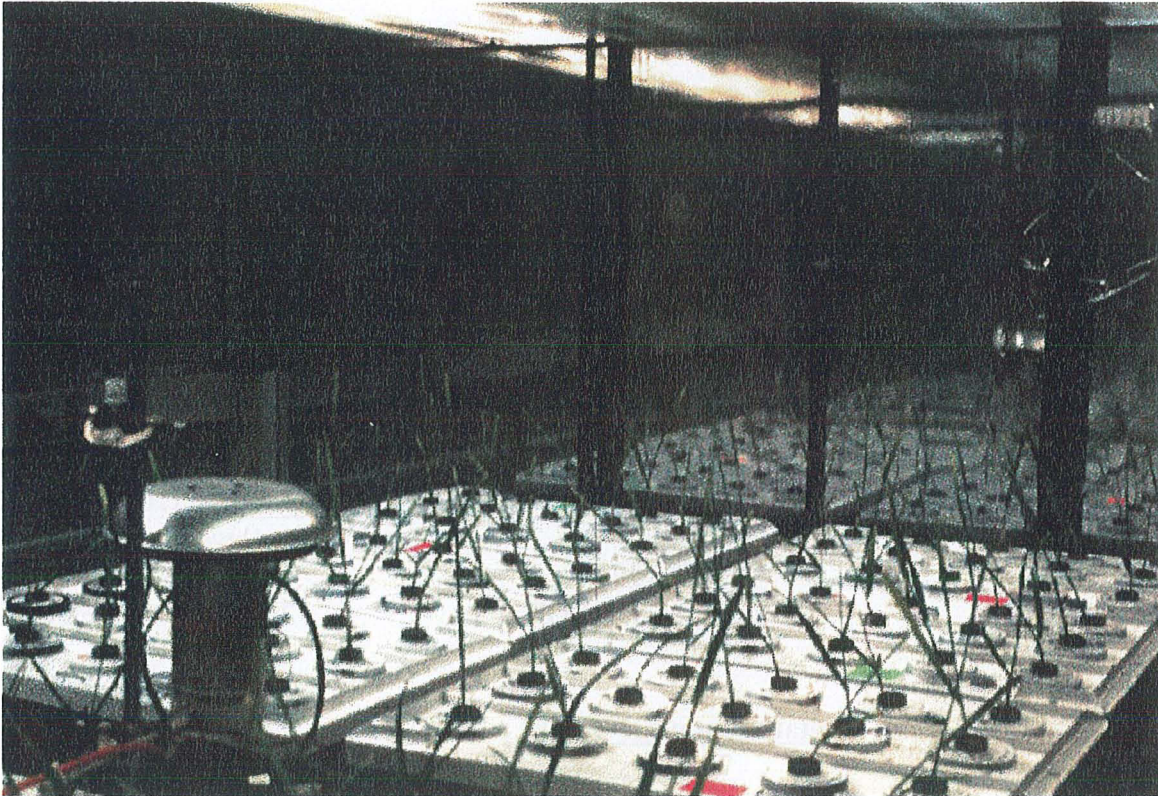
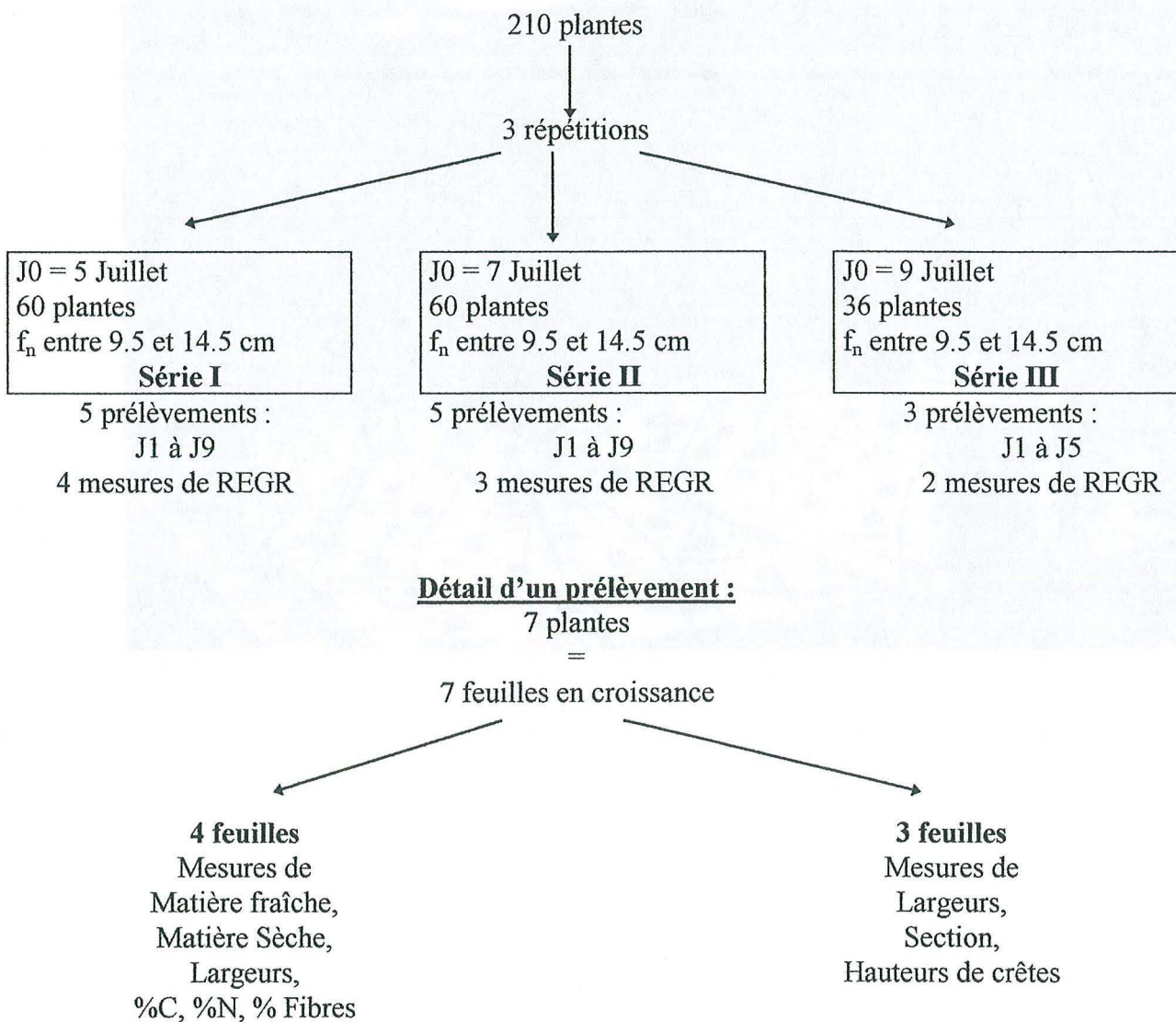


Tableau I.1. Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture hydroponique.

Macroéléments		Microéléments	
KNO ₃	2,5 mM	H ₃ BO ₃	25 μM
Ca(NO ₃) ₂	2,5 mM	MnSO ₄	2 μM
MgSO ₄	1,0 mM	ZnSO ₄	2 μM
KH ₂ PO ₄	0,5 mM	CuSO ₄	0,5 μM
Fe-HEDTA	20 μM	H ₂ MoO ₄	0,5 μM

Figure I.13. Protocole expérimental



I.B) Matériel et méthodes.

I.B.1) Matériel végétal et conditions de culture.

Une population de talles génétiquement identiques a été obtenue par multiplication végétative en serre, à partir d'une graine de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.). Parmi cette population, des talles de même âge ont été séparées, leur racines ont été coupées au niveau de leur insertion sur le plateau de tallage, et leurs parties aériennes ont été taillées de manière à ne laisser qu'un bâtonnet de 5 cm de long.

Les talles ont alors été mises dans des coupelles remplies de sable, arrosées de solution nutritive, et placées en conditions contrôlées pendant 19 jours (16°C de température air, 14 heures de photopériode, 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ d'éclairement), afin de permettre la repousse des feuilles et l'apparition de nouvelles racines (figures I.10 et I.11).

Les talles ont ensuite été placées en culture hydroponique (figure I.12), et les conditions dans la chambre de culture ont été progressivement modifiées de manière à obtenir une température d'air de 21°C, un éclairage continu de 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ampoules à iode métallique HQI, Osram) et 80% d'humidité relative. L'éclairage continu permet de maintenir une vitesse d'allongement foliaire constante, et ainsi de s'affranchir des transitions jour/nuit (Schnyder et Nelson, 1989) qui posent problème pour la méthode d'étude utilisée (voir plus loin). La solution nutritive contenait 7,5 mM d'azote sous forme nitrique, et sa composition exacte est indiquée dans le tableau I.1.

I.B.2) Déroulement des prélèvements.

Notre objectif est d'analyser le développement de la feuille de l'émergence jusqu'à la fin de sa croissance en longueur, à partir du suivi de la croissance et de la maturation des segments de feuille. En combinant les positions estimées de segments à des dates données et les relevés des caractéristiques tout au long de la feuille à ces mêmes dates, nous avons obtenu une estimation des différentes caractéristiques de n'importe quel segment à n'importe quelle date.

Pour minimiser les erreurs d'estimation, il a fallu mesurer à la fois les paramètres de croissance et les caractéristiques de la feuille sur des lots de talles semblables et homogènes. Nous n'avons donc sélectionné que les talles dont la dernière gaine mesurait $65 \pm 5\text{mm}$.

Figure I.14. Détail d'un prélèvement : les différents segments découpés

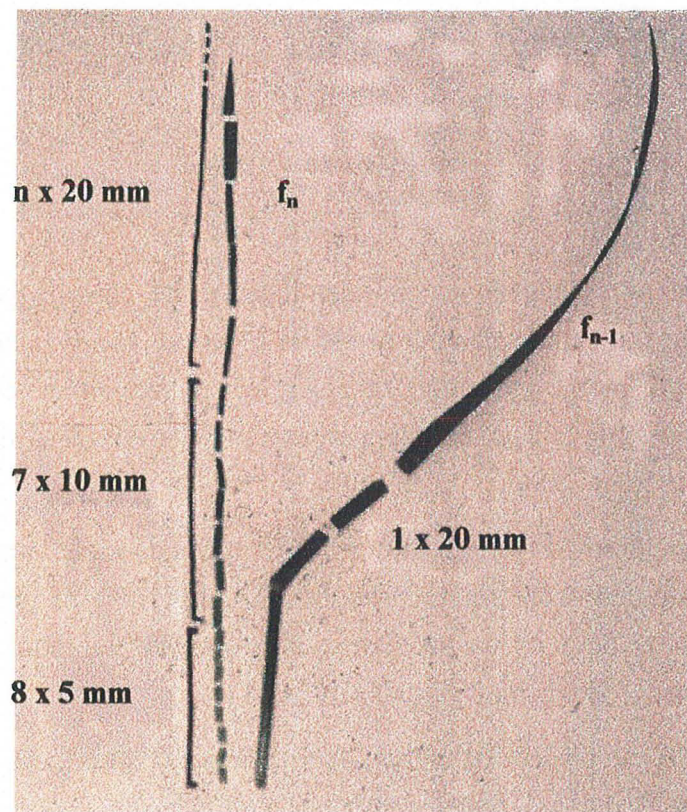


Figure I.15. Composition de la solution Fasga et mode opératoire.

Safranine O (1%)		Fasga	
Safranine	1 g	Safranine O	3 ml
Acétate Na	1 g	Bleu Alcian	11 ml
Ethanol absolu	75 ml	(0.5% dans éthanol)	
H ₂ O	25 ml	H ₂ O	20 ml
		Acide acétique	1 ml
		Glycérine	30 ml

1) Placer la coupe transversale successivement dans le bains suivants:

- Hypochlorite de Sodium (solution à 10%) 1 min
- Acide acétique (solution à 5%) 1 min
- Solution Fasga dilué 8 fois 1 nuit

2) Rincer la coupe à l'eau,

3) Monter la coupe entre lame et lamelle,

4) Observer en lumière visible.

Parmi l'ensemble des talles de la chambre de culture, nous avons identifié les talles dont la plus jeune feuille intacte venait d'émerger des gaines des feuilles précédentes (figure I.13). Le jour 0 (J0) est défini comme le jour où 50% des feuilles f_n observées au cours de l'expérimentation ont émergé. Les feuilles en croissance de cette population ont été ensuite prélevées 1, 3, 5, 7 et 9 jours après émergence, par groupe de sept. A J1, la feuille en croissance mesurait 114 ± 27 mm, soit 41% de sa longueur finale (274 ± 35 mm).

A chaque prélèvement, la feuille en croissance est extraite des gaines des feuilles précédentes, qui l'entourent, puis découpée en segments. A partir de la base de la feuille, nous avons coupé 8 segments de 5 mm de long (de 0 à 40 mm), puis 7 segments de 10 mm de long (de 40 à 110 mm), tandis que le reste de la feuille était découpé en segments de 20 mm de long (figure I.14). Un segment de 20 mm de long a également été prélevé sur le limbe de la feuille précédente, environ 20 mm au dessus de la ligule. Les segments situés à la même position par rapport à la base de la feuille provenant de quatre talles différentes ont été regroupés et pesés frais. Leur largeur a été mesurée, puis ils ont été séchés à l'étuve à 70°C pendant au moins 48 heures et pesés de nouveau. Trois talles supplémentaires ont été prélevées pour les mesures de surface de section transversale le long de la feuille.

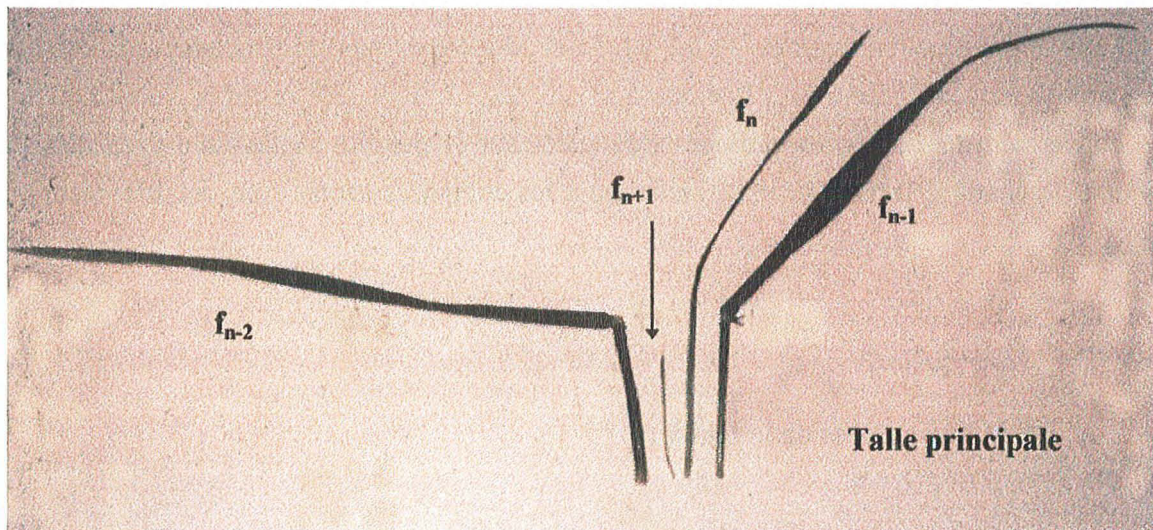
Par trois fois, à deux jours d'intervalle, ce protocole expérimental (identification des feuilles en croissance émergeant des gaines précédentes, prélèvements à J1, J3, J5, J7, J8) a été effectué (figure I.13). Ces trois séries de mesures ont été considérées comme des répétitions, car pour un jour donné, chaque échantillon présentait les mêmes caractéristiques de croissance, de longueur et de matière sèche (seul le prélèvement de J2 de la deuxième série s'est avéré différent, et a donc été écarté : les feuilles prélevées étaient, dans l'ensemble, plus courtes). Par conséquent, les valeurs présentées correspondent à la moyenne de ces répétitions.

La masse linéique (en $\text{mg}\cdot\text{mm}^{-1}$) à J2, J4, J6 et J8 a été extrapolée de manière linéaire à partir des valeurs moyennes de masse linéique à J1, J3, J5, J7 et J9. Ces résultats, ainsi que les analyses concernant les composés carbonés effectuées sur la matière sèche, sont présentés et discutés dans le chapitre II. Les résultats concernant les composés azotés sont détaillés dans le chapitre III.

I.B.3) Dimensions de la feuille.

La largeur des segments a été mesurée immédiatement après la coupe avec une loupe graduée (précision 0,1 mm). Les segments réservés aux coupes transversales ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (2% v/v) et glutaraldéhyde (1% v/v) et conservés au frais jusqu'à la coupe. Celle-ci a été effectuée à main levée avec une lame de rasoir. Les coupes ont

Figure I.16. Identification des différentes feuilles.



ensuite été colorées une nuit dans une solution de Fasga (Safranine O et de bleu Alcian, figure I.15), puis placées entre lame et lamelle dans de l'eau déminéralisée. Cette coloration teinte en bleu les parois celluloses, et en rouge les parois lignifiées ou cutinisées. Cela permet de distinguer les différents types cellulaires. Ce mode opératoire, sans déshydratation ni inclusion, nous a permis d'éviter les problèmes de rétrécissement des coupes, qui faussent les mesures de surface. La coupe a ensuite été numérisée à l'aide d'une caméra (CCD vidéo camera, Sony) montée sur une loupe binoculaire (S051, Olympus). La surface des coupes, ainsi que le nombre et la hauteur des crêtes présentes dans la largeur d'une coupe transversale ont été déterminés à différentes positions le long du limbe aux différents jours par analyse d'image sur le logiciel Optimas (Imasys).

La largeur et la surface de la section à J2, J4, J6 et J8 ont été extrapolées linéairement à partir des valeurs moyennes de largeur et de surface de section à J1, J3, J5, J7 et J9. L'épaisseur moyenne des segments de feuille a été calculée en divisant la surface moyenne de la section par la largeur moyenne du segment à différentes positions le long de la feuille. Nous n'avons donc pas calculé d'erreur pour l'épaisseur moyenne.

Les densités de matière sèche et d'azote le long de la feuille ont été calculées en divisant la masse linéique et la quantité d'azote par millimètre de feuille, respectivement, par la surface de la section. Ces résultats sont présentés et discutés dans les chapitres II et III.

I.B.4) Croissance en longueur et distribution de la croissance le long de la feuille.

La feuille identifiée à J0 comme émergeant des gaines des feuilles précédentes est appelée f_n . Les deux feuilles précédentes et la feuille suivante sont appelées f_{n-1} , f_{n-2} et f_{n+1} , respectivement (figure I.16). La longueur de ces différentes feuilles a été mesurée sur 18 talles chaque jour depuis le début de l'expérimentation, et a permis de calculer la vitesse d'allongement des feuilles (VAF).

La mise en place des différents organes a été beaucoup étudiée, notamment du point de vue anatomique et morphologique depuis le début du siècle (voir la partie I.A). Vers les années 50, il émerge un besoin de passer d'une étude statique à une étude dynamique de la croissance (Richards et Kavanagh, 1943 ; Erickson et Sax, 1956). Ainsi, les biologistes mettent au point des méthodes de description quantitative de la croissance. Il s'agit notamment de déterminer la distribution spatiale de la croissance, exprimée en terme de taux de croissance. Elle peut être mesurée de deux manières différentes. Les méthodes directes consistent à observer des marques placées le long de l'organe (particules de carbone, encre, petits trous), qui sont déplacées les unes

Figure I.17. Détail de la méthode utilisée pour mesurer la distribution longitudinale de la croissance.

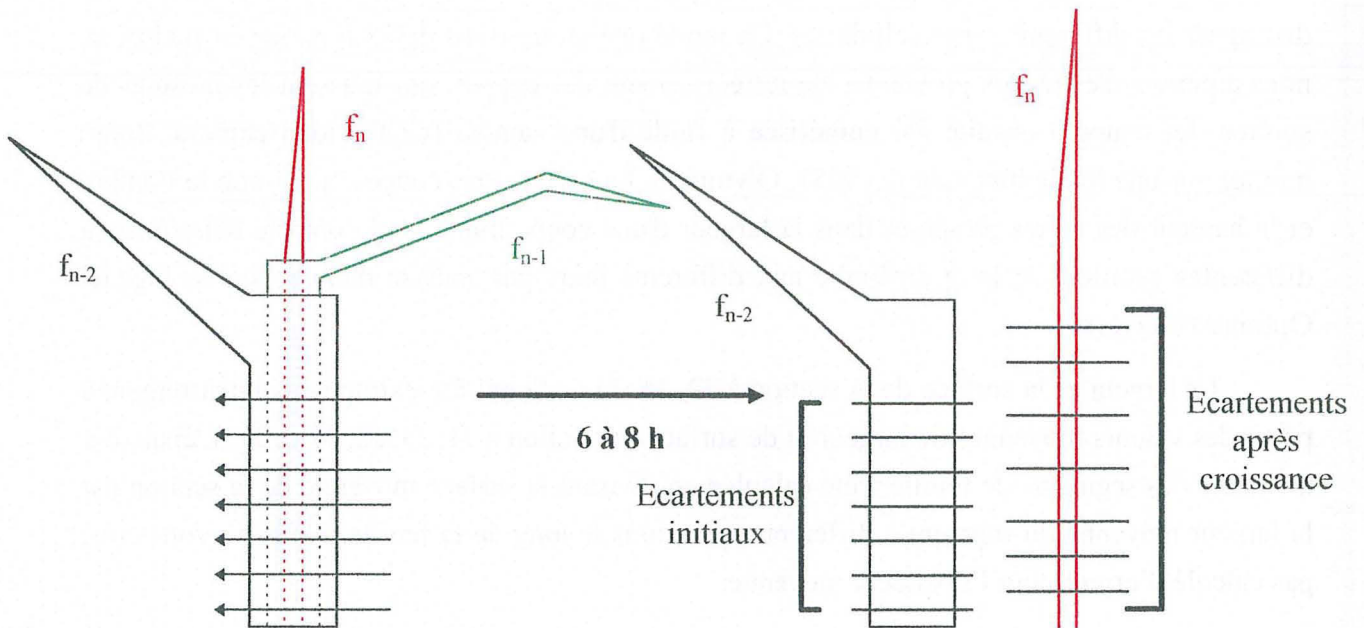
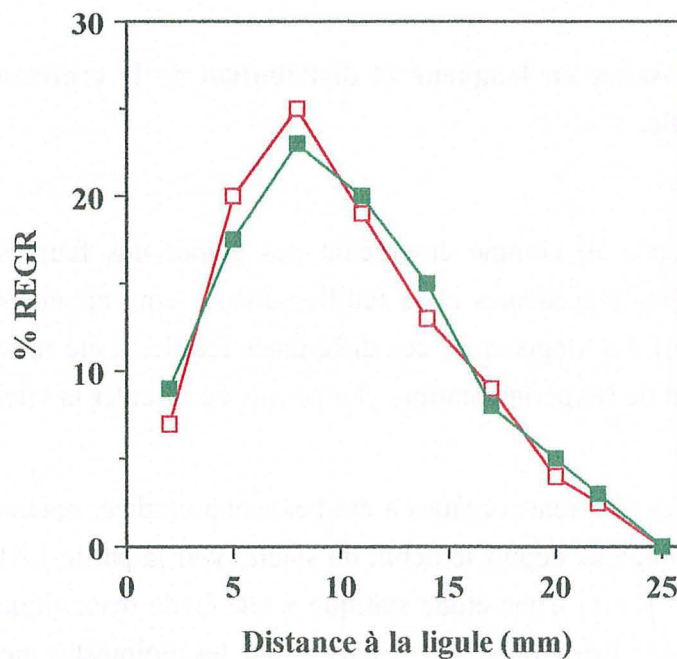


Figure I.18. Comparaison de deux méthodes de mesure de la distribution longitudinale de la croissance (■ trous, □ marques d'encre). Le fait de percer des trous dans la zone de croissance ne modifie pas la distribution de la croissance (Schnyder *et al.*, 1987).



des autres du fait de la croissance. La mesure de la variation de distance entre les marques durant un court laps de temps permet de déduire l'intensité de la croissance locale à différentes positions le long de l'organe. Elles ont été développées initialement sur racines sur lesquelles des repères naturels (parois des cellules épidermiques, Goodwin et Stepka, 1945) ou artificiels (particules de carbone, Erickson et Sax, 1956) sont suivis au cours du temps (sur des photographies en traînées), alors qu'ils sont déplacés loin de l'apex. Les méthodes indirectes consistent à mesurer la croissance à partir de données anatomiques. Ce type de mesure a été initialement développé par Burström (1957), et a largement été repris, par exemple à partir de données de longueur des cellules épidermiques (Gandar et Hall, 1988 ; Silk *et al.*, 1989 ; Beemster *et al.*, 1996). Ces approches ne sont cependant valables que lorsque le régime de croissance est stationnaire, sauf si des données sur les variations temporelles des données anatomiques et la description de la zone de division cellulaire, en termes de pourcentage de cellules en mitose à une position donnée, sont incluses dans le calcul (Gandar et Chalabi, 1989)

Nous avons choisi le premier type de mesure, étant donné que le régime de croissance foliaire n'est pas stationnaire entre l'émergence et la fin de l'allongement. Sur la feuille de graminée, la zone de croissance en longueur est située à la base de la feuille, protégée du milieu extérieur par les gaines des feuilles précédentes. Du fait de cette position difficilement accessible, la méthode de marquage généralement utilisée consiste à percer de petits trous dans la zone de croissance en longueur à l'aide d'aiguilles fines (Davidson et Milthorpe, 1966 ; Schnyder *et al.*, 1987).

Nous avons donc percé la feuille de trous à l'aide d'une aiguille d'entomologiste (0.2 mm de diamètre) dans la zone de croissance longitudinale, à travers les gaines des feuilles précédentes (figure I.17). Les trous ont été percés tous les 5 mm, jusqu'à 45 mm de la base de la feuille, à l'aide d'un guide en plastique troué tous les 5 mm. Ces trous délimitent des segments de feuille qui s'allongent du fait de la croissance des cellules qui les constituent. La mesure de l'écartement des trous doit être effectuée après un laps de temps relativement court pour être précise, car le résultat obtenu est sensible à la durée du marquage (Erickson et Silk, 1980). Schnyder *et al.* (1987) ont déterminé qu'une durée adéquate de marquage correspond au temps nécessaire à un allongement équivalent à 20% de la longueur de la zone de croissance en longueur. Dans notre cas, cela correspondait à un intervalle entre le marquage et la mesure des intervalles de six à huit heures. Il est ainsi possible de calculer le taux d'allongement élémentaire relatif (REGR : Relative Elemental Growth Rate) à la position correspondant à chaque milieu de segment, selon la formule d'Erickson et Sax (1956) :

$$REGR = \frac{\Delta d}{d} \cdot \frac{1}{\Delta t} \quad (I.1)$$

où d représente la distance initiale entre les trous, Δd représente la variation de la distance séparant les trous, et Δt représente l'intervalle de temps entre le marquage et la mesure de

Figure I.19. Représentation des trajectoires de quelques éléments de racine (Gandar, 1983a).

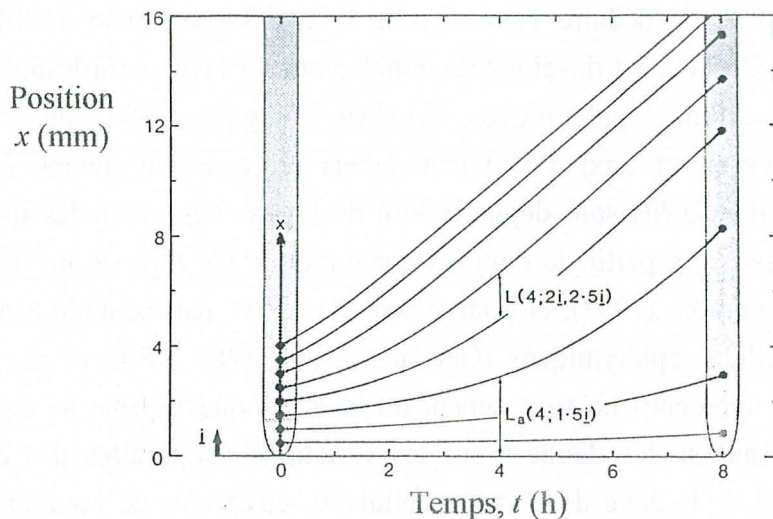
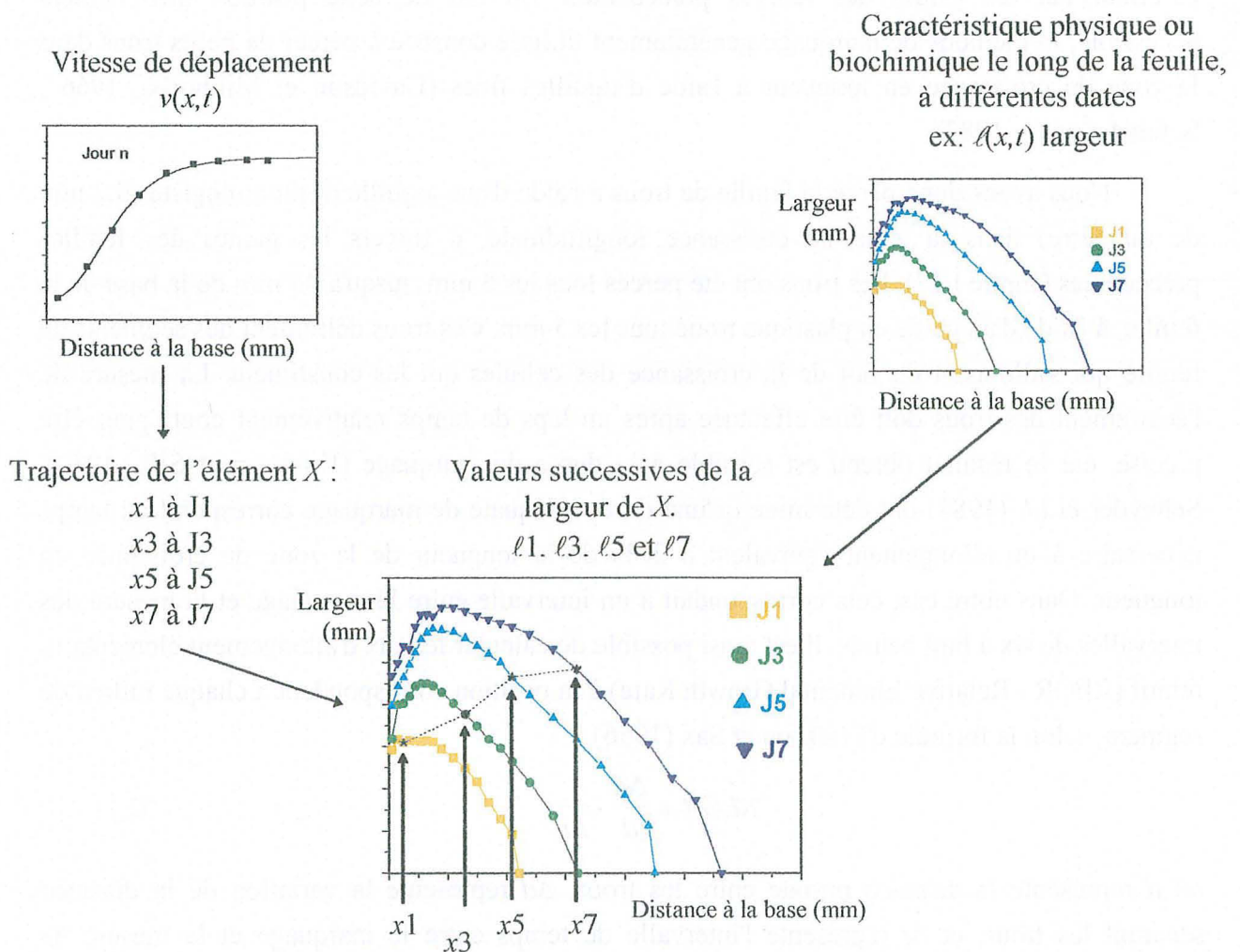


Figure I.20. Méthode utilisée pour le suivi d'éléments matériels. La vitesse de déplacement est combinée avec les données spatio-temporelles des différentes caractéristiques de la feuille. Il est ainsi possible d'obtenir les caractéristiques successives de tous les segments qui composent la feuille.



l'espacement des trous. La mesure de la distance initiale est effectuée à l'aide d'une loupe graduée (précision 0,1 mm) sur la gaine de f_{n-2} , qui ne s'allonge plus.

Le fait de percer des trous dans la feuille diminue la vitesse de croissance. Cependant, Schnyder *et al.* (1987) ont montré que cela ne modifiait pas la distribution spatiale de la croissance (figure I.18). Ainsi, il est possible de calculer le taux d'élongation élémentaire relatif non perturbé à partir des données de VAF de la population de feuilles non marquées :

$$REGR = REGR_{\text{perturbé}} \cdot \frac{VAF_{\text{population}}}{VAF_{\text{perturbé}}} \quad (I.2)$$

Le REGR a été mesuré à J2, J4, J6 et J8. Il a été extrapolé de manière linéaire pour chaque position le long de la feuille en croissance à J1, J3, J5, J7 et J9 à partir des mesures de J2, J4, J6 et J8.

I.B.5) Suivi d'éléments matériels.

Un moyen d'effectuer une approche matérielle est d'estimer *a posteriori* le déplacement d'éléments matériels et de les identifier sur des relevés de données le long de la feuille (données spatiales). A partir des données de REGR, il est possible de calculer le champ des vitesses de déplacement, $v(x,t)$ le long de la feuille, et au cours du temps. En effet, la vitesse locale de déplacement est la somme des taux de croissance relative (REGR) de tous les éléments situés entre la base de la feuille et la position considérée.

Pour suivre le déplacement de segments particuliers au cours du temps, il est utile de nommer un élément de feuille d'après la position qu'il occupait à un moment de référence (en général, $t = 0$). Par conséquent, la formule " x est la position au temps t de l'élément X " (représentée mathématiquement par $x(t;X)$) signifie " x est la position occupée au temps t par l'élément qui occupait la position X à $t = 0$ " (Gandar, 1983a). La trajectoire (figure I.19) d'un élément X , $x(t;X)$, est obtenue par intégration numérique de l'équation (I.3) :

$$\frac{dx}{dt} = v(x,t) \quad (I.3)$$

Le terme trajectoire ("growth trajectory" : Silk, 1984) est synonyme du terme ligne de déplacement ("path lines" : Gandar, 1983a).

Ainsi, les positions successives de n'importe quel élément X ont pu être déterminées, et l'évolution de ses propriétés physiques ou biochimiques au cours du temps a été déduite de ses positions successives et des profils de propriétés physiques ou biochimiques mesurées le long de la feuille lors des différents prélèvements (figure I.20).

Nous avons ainsi déterminé les dimensions successives de tous les éléments de feuille, à partir de leurs positions successives et des données de largeur et d'épaisseur moyenne le long de la feuille aux différentes dates de prélèvement (figure I.20). Les dimensions successives des différents éléments de la feuille nous ont ainsi permis de comparer la croissance en largeur et en épaisseur avec la croissance en longueur. Ainsi, le taux d'élargissement (T_ℓ) et le taux d'épaississement (T_ε) d'éléments de feuille ont été calculés à différentes dates et positions le long de l'axe des x d'après les équations (I.4) et (I.5) :

$$T_\ell(t; X) = \left(\frac{d\ell}{dt} \right)_X \quad (I.4)$$

$$T_\varepsilon(t; X) = \left(\frac{d\varepsilon}{dt} \right)_X \quad (I.5)$$

où $\ell(t; X)$ représente la largeur de l'élément X en fonction du temps, et $\varepsilon(t; X)$ représente l'épaisseur moyenne de l'élément X en fonction du temps.

En supposant que le taux d'élargissement et le taux d'épaississement sont homogènes dans la largeur et l'épaisseur du segment X , le taux relatif d'élargissement (R_ℓ) et le taux relatif d'épaississement (R_ε) de ce segment sont donnés par :

$$R_\ell(t; X) = \frac{1}{\ell(t; X)} \cdot \left(\frac{d\ell}{dt} \right)_X \quad (I.6)$$

$$R_\varepsilon(t; X) = \frac{1}{\varepsilon(t; X)} \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{dt} \right)_X \quad (I.7)$$

Ceci constitue une description référentielle du taux relatif d'élargissement et du taux relatif d'épaississement, car R_ℓ et R_ε se rapportent à un élément matériel, X . Etant donné que les caractéristiques d'une position donnée à un instant donné sont celles de l'élément qui se trouve à cette position à cet instant (les points et les particules sont interchangeable, Gandar, 1983a), la description spatiale du taux relatif d'élargissement (r_ℓ) et du taux relatif d'épaississement (r_ε) peuvent être déduites de leur description référentielle :

$$r_\ell(x, t) \equiv R_\ell[X(x, t), t] \quad (I.8)$$

$$r_\varepsilon(x, t) \equiv R_\varepsilon[X(x, t), t] \quad (I.9)$$

où $X(x, t)$ représente la position initiale de l'élément qui occupe la position x au temps t . Ces deux fonctions représentent les taux de croissance relative en largeur et en épaisseur.

Figure I.21. Evolution de la vitesse d'allongement des feuilles (VAF) successives. La feuille qui émerge à J0 est appelée f_n (■), f_{n-1} (□) et f_{n-2} (●) sont les deux feuilles précédentes. La flèche indique le jour où 50% des feuilles f_{n+1} sont émergées. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne ($n = 18$).

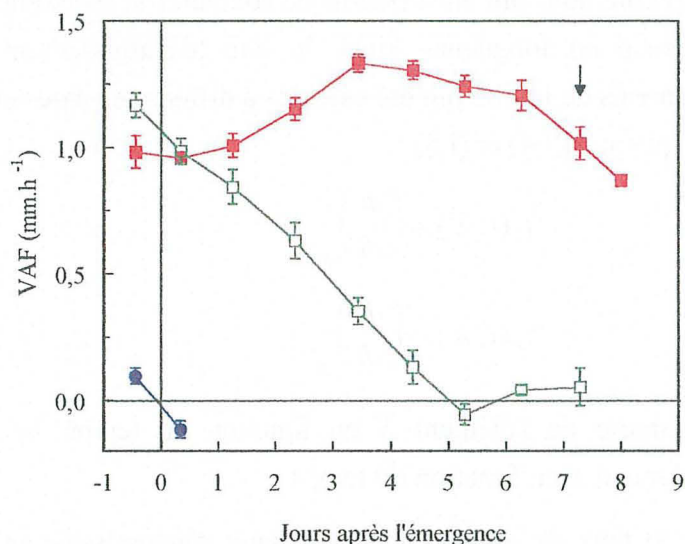
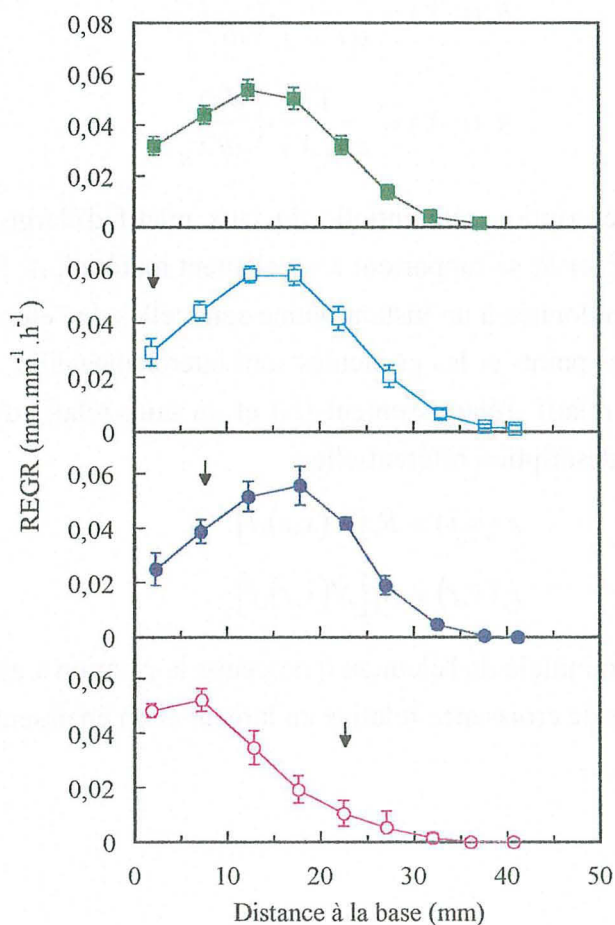


Figure I.22. Distribution longitudinale de la croissance en longueur (REGR : Relative Elemental Growth Rate) à J2 (■), J4 (□), J6 (●) et J8 (○). Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne ($n = 9$ en moyenne). La flèche indique la position de la ligule.



I.C) Résultats et discussion.

I.C.1) Allongement foliaire.

La vitesse d'allongement foliaire (VAF) augmente légèrement durant environ quatre jours après l'émergence de la feuille, reste stable pendant deux à trois jours, puis diminue progressivement (figure I.21). La diminution de la VAF débute approximativement lors de l'émergence de la feuille f_{n+1} (à J7, 50% des feuilles f_{n+1} ont émergé). Ces trois phases dans l'évolution de la vitesse d'allongement d'une feuille ont déjà été observées par Schnyder *et al.* (1990) sur ray-grass anglais.

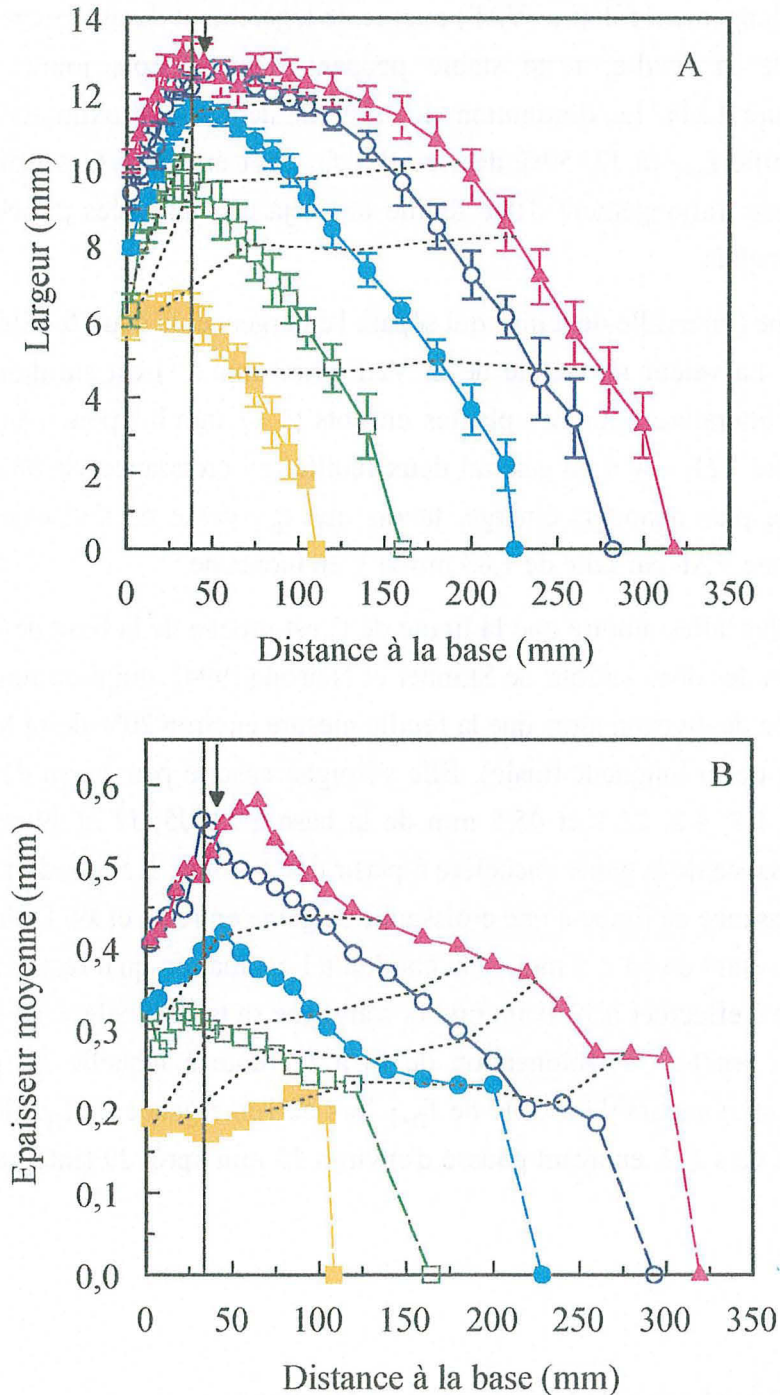
Le phyllochrone (intervalle de temps qui sépare l'émergence de deux feuilles successives) est d'environ 7 jours. La valeur maximale de la VAF ($1,33 \text{ mm.h}^{-1}$) est similaire aux valeurs mentionnées dans la littérature pour des plantes en pots ($1,17 \text{ mm.h}^{-1}$ pour Allard et Nelson, 1991). D'après la figure I.21, il y a en général deux feuilles en croissance visibles par talle. En effet, f_{n-2} ne s'allonge plus quand f_n émerge, tandis que f_{n-1} cesse de s'allonger lorsque f_{n+1} émerge. Il en résulte une VAF par talle de $1,83 \text{ mm.h}^{-1}$, en moyenne.

La dissection des talles montre que la ligule de f_n est proche de la base de la feuille à J1. Ceci est en accord avec les observations de Skinner et Nelson (1994), qui montrent que la ligule est formée dans la zone de division alors que la feuille mesure environ 20% de sa longueur finale (à J1, f_n mesure 41% de sa longueur finale). Elle s'éloigne ensuite peu à peu de la base de la feuille et se trouve à 1.8, 4.2, 22.1 et 45.5 mm de la base à J3, J5, J7 et J9 respectivement, indiquant que la croissance de la gaine s'accélère à partir de J5. Ainsi, il se produit une transition progressive d'une croissance de limbe à une croissance de gaine entre J1 et J9. La longueur finale de la gaine précédente étant de $65 \pm 5 \text{ mm}$, cela conduit à l'estimation qu'il reste environ 20 mm de croissance de gaine à effectuer à J9 avant que f_n n'atteigne sa taille finale. Une autre méthode donne une estimation proche : si l'élongation de f_n à J7 (date à laquelle f_{n+1} émerge) est considérée comme étant comparable à celle de f_{n-1} lors de l'émergence de f_n , alors, f_n devrait terminer sa croissance vers J12, en ayant poussé d'environ 15 mm après J9 (intégrale du LER de f_{n-1} entre J2 et J5).

I.C.2) Distribution de la croissance en longueur.

Le REGR (Relative Elemental Growth Rate, figure I.22) est proche de zéro à partir de 37, 38, 37 et 32 mm de la base de la feuille à J2, J4, J6 et J8 respectivement. La longueur de la zone

Figure I.23. (A) Largeur et (B) épaisseur moyenne le long de la feuille à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲). Les pointillés représentent les largeurs et épaisseurs moyennes successives de quelques segments, calculés à partir de leurs trajectoires et des profils de largeur et d'épaisseur moyenne le long de la feuille au cours du temps. La flèche indique la position de la ligule à J9. Le trait vertical représente la fin de la zone de croissance longitudinale. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne pour la largeur ($n = 7$ en moyenne).



de croissance longitudinale est similaire entre J2 et J6, et décroît à partir de J8. Sa valeur moyenne est représentée sur les figures suivantes par une ligne verticale à 35 mm de la base de la feuille. De J2 à J6, l'allure des courbes est la même, avec le taux d'allongement maximum entre 10 et 20 mm de la base de la feuille. Le REGR maximum reste quasiment identique entre J4 et J8 ($0.06 \text{ mm.mm}^{-1}.\text{h}^{-1}$ environ). Il était un peu moins important à J2. Cela correspond au cas décrit dans la littérature (Schnyder et Nelson, 1988 ; Schnyder *et al.*, 1990). A J8, par contre, le maximum d'allongement est déplacé vers la base de la feuille. A ce moment là, la ligule se situe à 22.3 mm de la base de la feuille, cela signifie que la majeure partie de la croissance correspond à de la croissance de gaine (93% de l'allongement total en intégrant le REGR de la base à la ligule). Le profil de REGR de J8 peut s'interpréter comme le résultat du ralentissement de la division cellulaire. En effet, la diminution du nombre de cellules en allongement se traduit par une diminution et un déplacement du pic de REGR maximum vers la base de la feuille, qui provoque une diminution de la longueur de la zone de croissance longitudinale, et de la VAF (Skinner et Nelson, 1995).

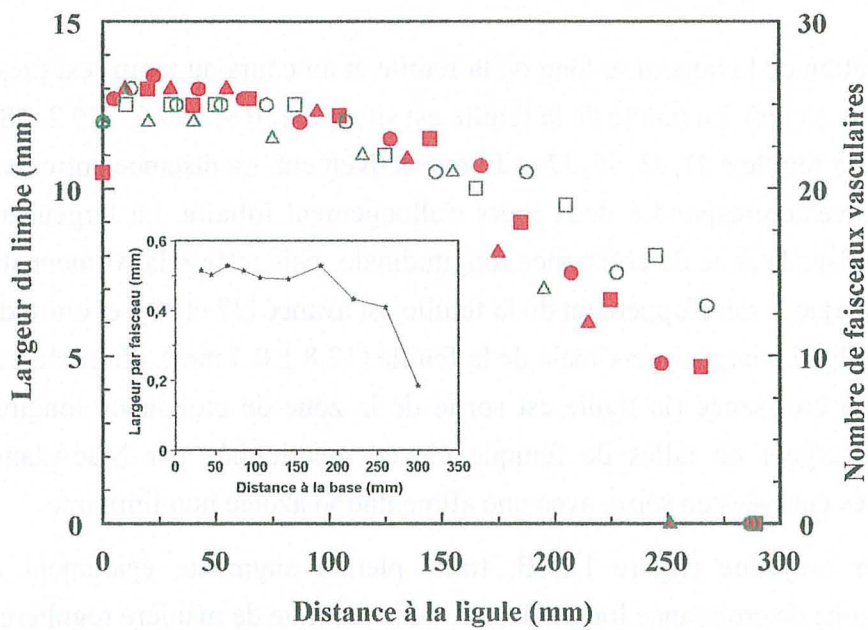
Contrairement à ce que rapportent Schnyder *et al.* (1990) sur ray-grass anglais, il n'y a pas de diminution de REGR à l'endroit où se situe la ligule. Cela peut correspondre à une plus faible résolution spatiale de nos données (trous espacés de 5 mm contre 3 mm dans l'étude citée précédemment), qui gommerait cette diminution.

I.C.3) Largeur et épaisseur moyenne.

La distribution de la largeur le long de la feuille et au cours du temps est présentée sur la figure I.23.A (traits pleins). La pointe de la feuille est située à 110.9, 160.6, 225.2, 282.4 et 317.8 mm de la base de la feuille à J1, J3, J5, J7 et J9 respectivement. La distance entre deux positions de pointe successives correspond à deux jours d'allongement foliaire. La largeur augmente de manière marquée dans la zone de croissance longitudinale, puis reste relativement stable dans la partie médiane lorsque le développement de la feuille est avancé (J7 et J9), et enfin diminue vers la pointe de la feuille. La largeur maximale de la feuille ($12.8 \pm 0.5 \text{ mm}$), observée à J9, quand le limbe a terminé sa croissance (la ligule est sortie de la zone de croissance longitudinale), est comparable à la largeur de talles de fétuque élevée mentionnée par MacAdam (1988). Il s'agissait de plantes cultivées en serre, avec une alimentation azotée non limitante.

L'épaisseur moyenne (figure I.23.B, traits pleins) augmente également de manière marquée dans la zone de croissance longitudinale, mais diminue de manière régulière dès 50 mm et jusqu'à la pointe, contrairement à la largeur. Elle est maximale à J9 près de la ligule avec une valeur de 0.55 mm. Cette valeur est deux fois plus élevée que les valeurs d'épaisseur moyenne

Figure I.24. Largeur (mesurée sur trois feuilles : ■, ●, ▲) et nombre de faisceaux vasculaires dans la largeur (□, ○, △) à différentes positions le long d'une feuille mature. En insert est présentée la largeur moyenne d'un faisceau, obtenue avec le rapport de la largeur par le nombre de faisceaux.



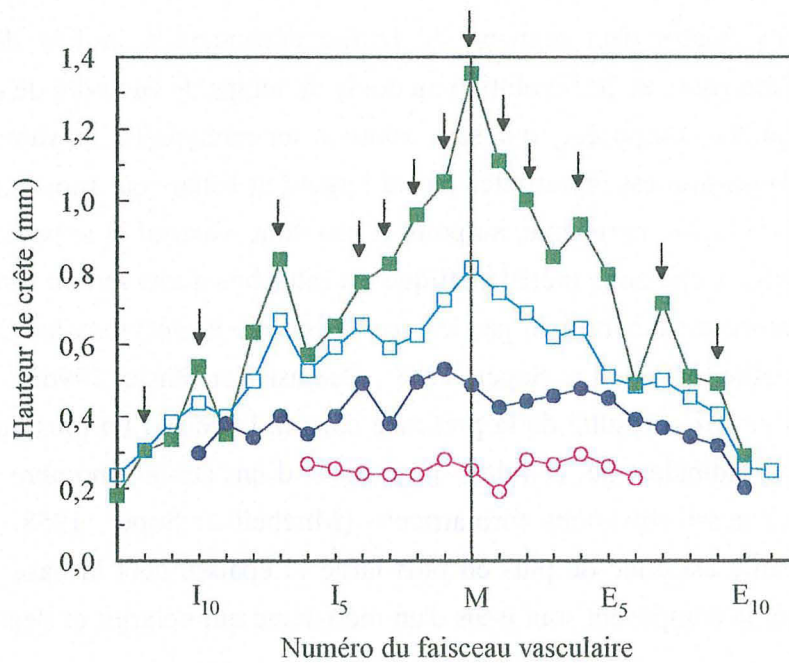
rapportées par Cohen *et al.* (1982) et Allard *et al.* (1991). Cette valeur peut cependant être rapprochée de l'épaisseur de talles de fétuque élevée mesurée au milieu du limbe (0.47 mm) par Thévenin (1984).

Pour bien comprendre la mise en place de la feuille du point de vue de la largeur et de l'épaisseur, il faut distinguer les événements qui se produisent séquentiellement pour un élément au cours de sa croissance et les profils de largeur et d'épaisseur le long de la feuille. Les largeurs et épaisseurs moyennes successives de quelques éléments matériels sont représentées par les pointillés sur la figure I.23. Par contre, les profils de largeur et d'épaisseur le long de la feuille (en trait plein sur la figure I.23) sont les enregistrements des dimensions des éléments successifs (segments) qui composent la feuille. Entre 0 et 35 mm de la base, les profils de largeur et d'épaisseur moyenne rendent compte des dimensions provisoires de segments qui n'ont pas terminé leur croissance. Après 35 mm de la base, ils rendent compte des dimensions finales des éléments de la feuille.

Les dimensions finales d'un segment de feuille dépendent à la fois de la taille du méristème au point d'insertion, et de l'évolution au cours du temps de l'activité de croissance des éléments (cellules) qui la composent, qui sera abordée au paragraphe suivant. La taille du méristème au point d'insertion est représentée par la largeur et l'épaisseur moyenne à 0 mm sur les figures I.23.A et I.23.B. Le méristème, au point d'insertion, s'élargit et s'épaissit au cours de l'ontogenèse de la feuille. Cette zone méristématique est rattachée à une région sub-apicale de la tige dont la circonférence est déterminée par les conditions environnementales et influe sur la largeur finale de la feuille (Mitchell et Soper, 1958 ; Beemster et Masle, 1996*b*). La largeur du méristème au point d'insertion résulte de la présence dans la largeur d'un plus ou moins grand nombre de files longitudinales de cellules, provenant d'un certain nombre de divisions transversales, appelées aussi «divisions formatrices» (Mitchell et Soper, 1958 ; Beemster et Masle, 1996*b*). La feuille est donc de plus en plus large et épaisse vers la base parce que les éléments successifs qui la composent sont issus d'un méristème qui s'élargit et s'épaissit au cours du temps.

Le nombre de faisceaux vasculaires présents dans la largeur du limbe de feuilles prélevées à J9 (alors que le limbe a terminé sa croissance en longueur) diminue progressivement de la base à la pointe du limbe (figure I.24). Cette diminution est proportionnelle à la diminution de largeur entre 50 et 200 mm de la ligule. Au-delà, la largeur diminue légèrement plus rapidement que le nombre de faisceaux vasculaires. Cela signifie que la largeur séparant les faisceaux vasculaires diminue en direction de la pointe du limbe. Cela signifie également que la pointe de la feuille est moins large car elle contient un nombre inférieur de faisceaux vasculaires que la base. Le méristème intercalaire est donc de plus en plus large en association avec la mise en place de faisceaux vasculaires supplémentaires dans la largeur de la feuille, et peut être une augmentation de la distance entre les faisceaux. Il est intéressant de noter que les nouveaux

Figure I.25. Hauteur des crêtes dans la largeur d'une feuille mature à 2,5 (■), 70 (□), 190 (●) et 270 mm (○) de la ligule. Le faisceau vasculaire central de la nervure médiane est identifié par la lettre M. En partant de M, I_n est le $n^{\text{ième}}$ faisceau vasculaire de l'enroulement intérieur et E_n est le $n^{\text{ième}}$ faisceau vasculaire de l'enroulement extérieur. Les crêtes majeures sont représentées par les flèches verticales.



faisceaux qui s'ajoutent lorsque la largeur augmente ne s'intercalent pas entre d'autres faisceaux, comme l'ont observé Soper et Mitchell (1956), mais s'ajoutent sur les bords du limbe.

Le calcul de l'épaisseur moyenne du limbe masque la géométrie irrégulière et complexe des sections transversales de limbe : la surface abaxiale est plate, tandis que la surface adaxiale est formée de crêtes, qui contiennent les faisceaux vasculaires, séparées par des sillons (Metcalfé, 1960).

Les profils de hauteur de crêtes établis à partir de sections transversales le long d'un limbe mature (figure I.25) indiquent que vers la pointe de la feuille (à 270 mm de la ligule), la hauteur des crêtes est faible (255 μm en moyenne) et similaire pour les différents faisceaux vasculaires. Il faut préciser que la crête numéro un est la première crête du bord intérieur de la feuille dans la section transversale la plus large. Dans la partie médiane du limbe, à 190 mm de la ligule, la hauteur des crêtes augmente (403 μm en moyenne), et reste relativement similaire d'un faisceau vasculaire à l'autre, excepté pour les nouvelles crêtes, qui apparaissent sur les bords du limbe. A partir de cette distance que les crêtes de l'enroulement intérieur ont tendance à être plus petites que celles de l'enroulement extérieur. Près de la base, à 70 et à 2.5 mm de la ligule, les écarts de hauteur se creusent entre crêtes latérales et crêtes centrales. La nervure médiane regroupe trois faisceaux vasculaires (I_n , M et E_n), et développe la plus haute crête (813 μm à 70 mm). De grandes différences de hauteur sont également observées entre des crêtes voisines. Les crêtes majeures (qui possèdent un faisceau vasculaire comprenant des éléments du métaxylème), repérées par les flèches verticales sur la figure I.25, mesurent en moyenne 648 μm à 70 mm, et 912 μm à 2.5 mm de la ligule. Les crêtes mineures mesurent entre 200 et 700 μm (en moyenne 461 μm). Le fait que l'épaisseur de la feuille augmente de la pointe à la base de la feuille est à mettre en relation avec la nécessité que la base de la feuille soit assez rigide pour soutenir l'ensemble de la feuille.

Ainsi, si dans la moitié apicale de la feuille, l'augmentation de la hauteur de l'ensemble des crêtes est responsable de l'augmentation de l'épaisseur moyenne, en revanche, plus la base du limbe est proche, plus l'augmentation d'épaisseur moyenne résulte de l'augmentation de hauteur des crêtes majeures et surtout des crêtes centrales.

I.C.4) Distribution de la croissance en largeur et en épaisseur.

Les trajectoires d'éléments matériels de la figure I.23 indiquent que les différents éléments de feuille s'élargissent et s'épaississent de manière marquée dans la zone de croissance

longitudinale : la zone de croissance en longueur est aussi une zone de croissance en largeur et en épaisseur. Le calcul des taux de croissance relatifs dans chacune de ces dimensions (r_l et r_e , figure I.26) permet d'évaluer précisément la distribution de la croissance en largeur et en épaisseur le long de la feuille.

Les taux de croissance relative en largeur et en épaisseur sont élevés à la base de la feuille, puis diminuent fortement et deviennent nuls entre 50 et 70 mm de la base de la feuille. Près de la base, l'activité de croissance est élevée à J3 et J5, mais diminue rapidement les jours suivants. Cela correspond à la période durant laquelle le pic de croissance en longueur est le plus élevé. Au-delà de 10 mm, les taux de croissance relative en largeur et en épaisseur varient peu d'un jour à l'autre. La valeur maximale des pics est comparable dans les trois dimensions (environ $0.06 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), mais les pics sont observés à des positions différentes : le maximum du taux de croissance relative en longueur (REGR, figure I.22) est observé entre 10 et 20 mm de la base, alors que les maximums de croissance relative en largeur et en épaisseur (r_l et r_e) sont situés entre 0 et 5 mm de la base.

Les taux de croissance relative en largeur et en épaisseur élevés observés entre 0 et 5 mm de la base semblent correspondre à la zone où le diamètre des cellules augmente rapidement (Rademacher, communication personnelle). Nous n'avons pas déterminé si les cellules ne font que s'élargir ou si elles se divisent également, pour former l'amorce d'une nouvelle file de cellules.

Cependant, la croissance en longueur reste prépondérante à l'échelle de la feuille, car d'une part, les divisions cellulaires sont préférentiellement longitudinales ("rib meristem", Esau, 1965), maintenant ainsi à long terme le nombre d'éléments qui s'allongent ; d'autre part, parce que malgré des maxima identiques, la somme des élongations élémentaires de chaque élément est beaucoup plus importante dans le sens de la longueur que dans la largeur ou l'épaisseur (figures I.22 et I.26), déterminant ainsi une croissance totale plus importante en longueur qu'en largeur ou en épaisseur. Cela se traduit par le fait que la longueur d'une cellule est multipliée par 20 environ (de 25 à 400-500 μm), alors que sa largeur n'augmente que de 50% entre le début et la fin de la zone de croissance longitudinale (de 10 à 16 μm pour les cellules de l'épiderme adaxial et de 11 à 18 μm pour les cellules de l'épiderme abaxial (Rademacher, communication personnelle).

L'augmentation de largeur et d'épaisseur des segments se poursuit plus loin le long de la feuille et plus longtemps que la croissance en longueur (jusqu'à 70-80 mm de la base). Cela avait été suggéré par MacAdam et Nelson (1987) pour la croissance en largeur. Le dépôt des parois secondaires qui se déroule entre 35 et 75 mm environ de la base de la feuille (MacAdam, 1988) ne peut expliquer l'augmentation de section des éléments, car les parois se développent entre la lamelle moyenne et la membrane plasmique et donc ne déplacent pas l'arrangement cellulaire. L'augmentation de largeur et d'épaisseur du limbe au-delà de la zone de croissance en longueur

Figure I.27. Coupe transversale de limbe de fétuque élevée. (A) Cellules bulliformes peu développées, à la base d'un limbe en croissance, encore enroulé, (B) cellules bulliformes développées (limbe mature, déployé).

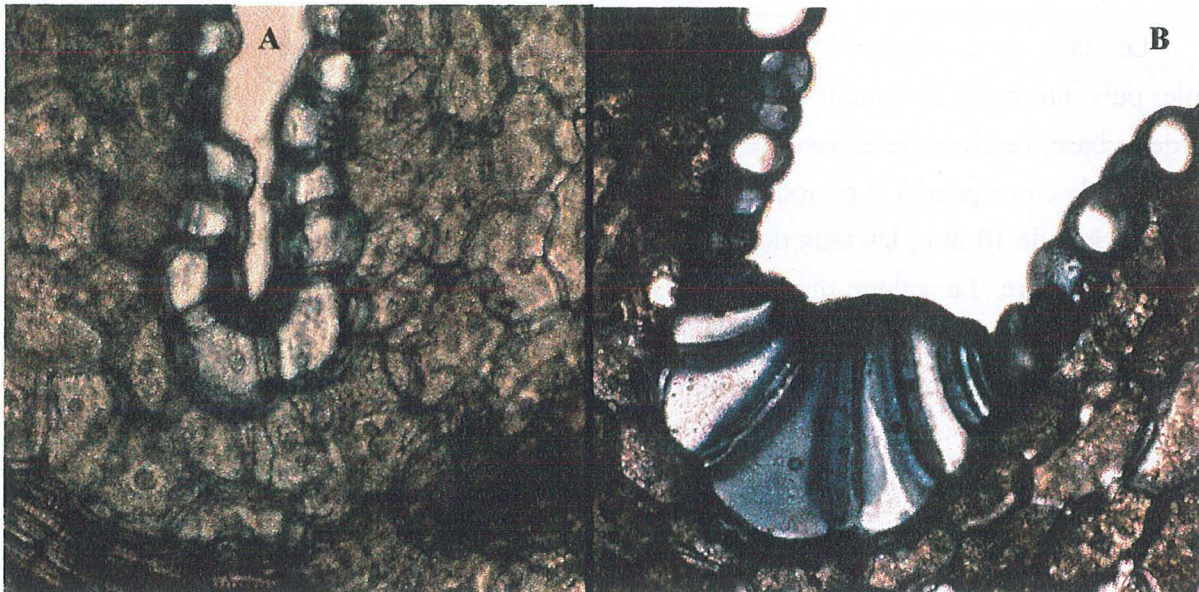
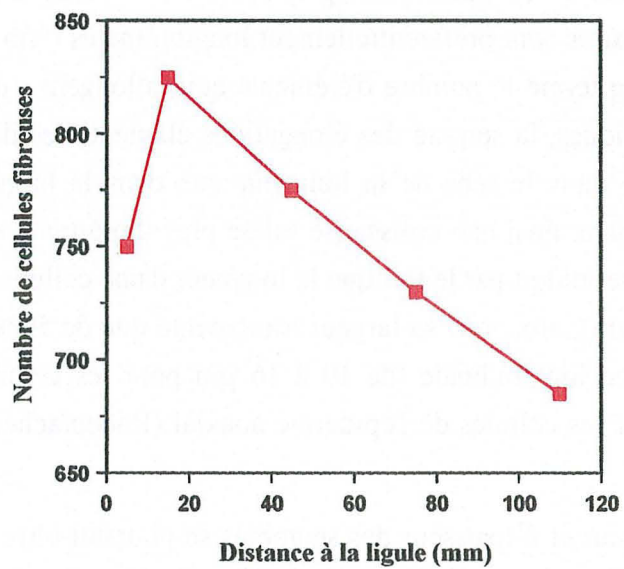


Figure I.28. Estimation du nombre de cellules fibreuses dans des sections transversales de limbe de fétuque élevée, à 5 positions par rapport à la ligule (MacAdam, 1988).



s'explique probablement par des déformations ou des croissances localisées à certains types de cellules. Ainsi, comme Burström (1942), nous observons que les cellules bulliformes des segments se développent après la zone de croissance longitudinale, pour n'atteindre leur taille finale que lorsque le limbe est déroulé (figure I.27). La croissance des cellules bulliformes peut donc expliquer en partie l'augmentation tardive des sections transversales de limbe.

Cette augmentation de section peut également s'expliquer par la croissance intrusive de cellules fibreuses au niveau des massifs de sclérenchyme, lors de la maturation du tissu (Esau, 1965), même si Meeuse (1938) déduit de ses observations qu'il ne se produit pas de croissance intrusive de cellules fibreuses dans le cas des monocotylédones, qui ne présentent pas de croissance secondaire. Néanmoins, de telles intrusions provoqueraient l'augmentation de la largeur ou de l'épaisseur des massifs de sclérenchyme. Du fait de la structure lacuneuse des tissus de mésophylle dans cette portion de limbe, une croissance locale, même minime, peut entraîner une déformation du limbe et une augmentation de la surface de la section proportionnellement plus importantes. MacAdam (1988) n'avait pas retenu l'hypothèse des fibres intrusives, car elle avait observé, sur une feuille en croissance, un maximum de cellules fibreuses à 15 mm de la base, suivi d'une diminution vers la pointe de la feuille (figure I.28). Cette constatation infirmait l'hypothèse émise que le nombre de cellules fibreuses augmenterait dans les sections transversales avec la distance à la base, tandis que les cellules fibreuses s'insinueraient entre les cellules voisines. Cette hypothèse ne peut être vérifiée que si les éléments successifs de la feuille sont comparables et possèdent, en sortant de la zone de croissance en longueur, le même nombre de cellules fibreuses dans les massifs de sclérenchyme entourant les faisceaux vasculaires. Ainsi, l'observation de MacAdam ne permet pas de rejeter l'hypothèse des fibres intrusives.

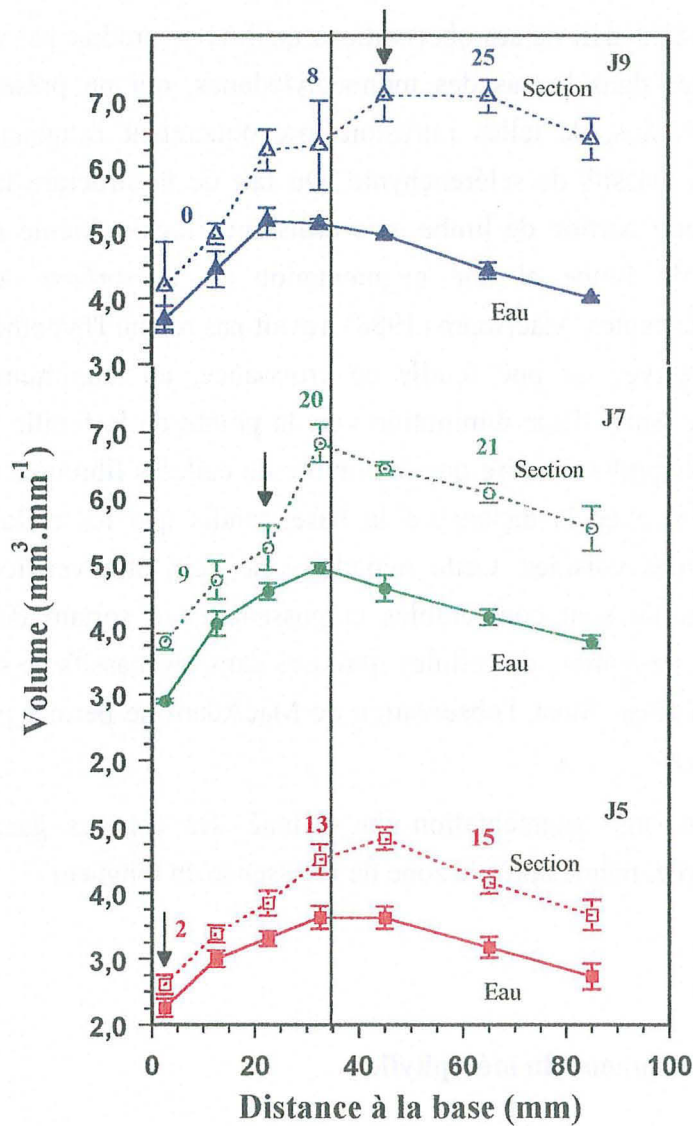
Selon cette hypothèse, une augmentation du volume des espaces gazeux dans le mésophylle devrait être observée, même après la zone de croissance en longueur.

I.C.5) Espaces lacuneux du mésophylle.

Le contenu cellulaire étant immergé dans l'eau, et du fait de la nature incompressible de l'eau, il existe un lien étroit entre volume de tissu et volume de l'eau contenue à l'intérieur. La comparaison de ces deux grandeurs indique que le volume développé par un élément est supérieur au volume de l'eau qui l'occupe dès la base de la feuille (figure I.29). Cette différence s'accroît vers la pointe de la feuille.

La différence entre volume de tissus et volume d'eau peut s'expliquer par le volume occupé par la matière sèche, mais elle peut également s'expliquer par la présence de volumes

Figure I.29. Comparaison du volume total d'un segment d'un millimètre de long (pointillés, symboles évidés) et du volume d'eau qu'il contient (traits et symboles pleins) à différentes positions le long de la feuille, à J5 (■, □), J7 (●, ○) et J9 (▲, △). Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne (n = 8). Les flèches indiquent la position de la ligule. Le trait vertical représente la fin de la zone de croissance longitudinale. Les valeurs au-dessus des courbes indiquent le pourcentage du volume total qui n'est pas expliqué par le volume d'eau, de matière sèche (c'est à dire l'aérenchyme). Pour ce calcul, nous avons pris une densité moyenne de la matière sèche de 1,45.



gazeux. Nous avons émis l'hypothèse que la densité moyenne de la matière sèche est de 1.45 (Perry et Green, 1985). Alors, le volume gazeux peut être estimé comme la différence entre le volume total de tissus d'une part, et la somme des volumes occupés par la matière sèche et par l'eau d'autre part.

Le volume gazeux d'un élément de feuille (chiffres surmontant les courbes sur la figure I.29), exprimé en pourcentage du volume total, est faible à la base de la feuille. Il augmente faiblement le long de la zone de croissance longitudinale pour des tissus de gaine, tandis que l'augmentation est marquée jusqu'à 35 mm de la base, plus lente au-delà, pour le limbe. L'existence d'une petite proportion d'espaces gazeux intercellulaires dans la partie de la gaine proche de la ligule a déjà été mentionné par Soper et Mitchell (1956). Les espaces intercellulaires du mésophylle apparaissent alors que les cellules épidermiques s'allongent rapidement tandis que les cellules mésophylliennes ne font que se diviser (MacAdam, 1988). D'après Xu *et al.* (1995), le complexe stomatique s'élabore puis s'ouvre entre 15 et 25 mm de la base. Cette ouverture, pendant la phase d'élongation rapide, permettrait la formation d'espaces intercellulaires gazeux par entrée d'air.

Les valeurs maximales observées (entre 15 et 25%), sont comparables aux données de Rademacher (communication personnelle) et de Cohen *et al.* (1982), relatives au volume gazeux estimé à partir de coupes transversales ou longitudinales.

Les estimations de la figure I.29 suggèrent que le volume gazeux peut augmenter faiblement au-delà de la zone de croissance en longueur. L'hypothèse d'une croissance intrusive de fibres dans les massifs de sclérenchyme (évoquée au paragraphe précédent pour expliquer les changements de largeur et d'épaisseur observés au-delà de la zone d'élongation) pourrait entraîner également une augmentation des espaces gazeux du fait des déformations de la feuille qui peuvent en découler.

Conclusion

La croissance d'une feuille de graminée résulte de deux phénomènes prenant place simultanément :

- un segment qui sort de la zone de division s'agrandit dans toutes les dimensions, du fait de la croissance des cellules qui le composent. En dehors de la zone de croissance longitudinale, la croissance de certains types cellulaires peut provoquer une augmentation du volume de ce segment (en largeur et/ou en épaisseur) ;

- au niveau des segments successifs qui composent la feuille, les dimensions finales résultent non seulement du phénomène de croissance cellulaire décrit précédemment, mais aussi du nombre d'éléments qui composent les différents segments, c'est à dire du fonctionnement du méristème intercalaire. Il s'agit d'une part des divisions de formation, qui déterminent le nombre de files longitudinales de cellules (une des composantes de la largeur et de l'épaisseur de la feuille), et d'autre part des divisions de prolifération, qui déterminent le nombre de cellules présentes dans chaque file longitudinale, (une des composantes de la longueur de la feuille). Le déterminisme du fonctionnement du méristème intercalaire est moins bien connu, mais il est influencé à la fois par l'ontogenèse de la plante (Abbe *et al.*, 1941) et par les conditions du milieu (Mitchell et Soper, 1958 ; Robson, 1972 ; Beemster et Masle, 1996b).

Du fait de ces phénomènes, les volumes mis en place successivement au cours de la croissance foliaire sont de plus en plus importants. Il doit logiquement en résulter une augmentation de la quantité de matière nécessaire à la croissance foliaire.

Les données relatives à la mise en place de la feuille en termes de dimensions présentées dans ce chapitre doivent permettre, couplées aux données concernant l'évolution des profils de matière le long de la feuille, de quantifier les flux totaux de matière nécessaires à la croissance au cours du temps, mais aussi les flux ramenés à une unité de volume de tissus, ce qui permet d'estimer l'activité métabolique liée à la croissance d'un tissu. Les résultats de ces calculs sont présentés aux chapitres II et III, et discutés en fonction de l'activité des différentes parties de la feuille en croissance, ainsi que de la chronologie propre de la feuille.

CHAPITRE II.

**FLUX DE MATIERE SECHE ET DE CARBONE
AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA FEUILLE**

L'objectif de ce chapitre est de déduire les flux de matière liés à la croissance à partir des données énoncées au chapitre précédent et des mesures de la composition de la matière sèche de la feuille. Les différents flux de matière sont déterminés durant une grande partie du développement de la feuille (de l'émergence à la fin de la croissance en longueur de la gaine), et ils intègrent les variations de dimensions des éléments successifs qui composent la feuille et les variations de dimensions des éléments au cours de leur croissance.

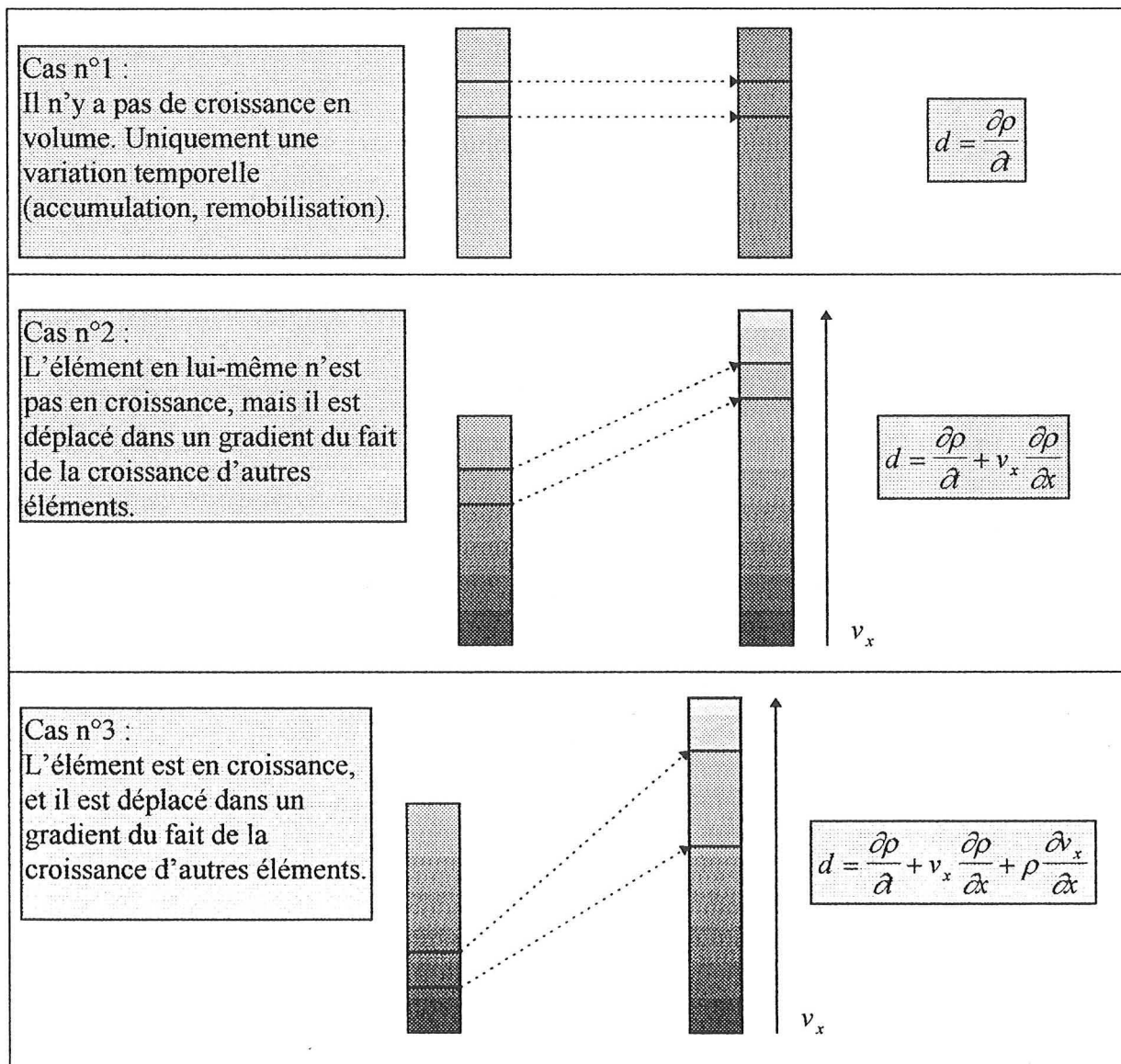
Pour cela, une première partie bibliographique décrit les méthodes d'analyse des flux de matière dans les zones en croissance, ainsi que les données existantes sur ces flux. Une seconde partie décrit les résultats que nous avons obtenus, d'abord du point de vue de la matière sèche, puis du point de vue du carbone. Une partie des résultats présentés dans ce chapitre ont été publiés dans la revue *Annals of Botany* (Annexe I).

II.A) Analyse bibliographique.

II.A.1) Méthodes d'analyse des flux de matière.

La quantification précise de la croissance permet de suivre des éléments en croissance alors qu'ils se déplacent, comme cela a été fait dans le chapitre précédent. Cette approche matérielle de la croissance est relativement intuitive, car il s'agit de suivre le contenu en matière d'un segment au cours de son déplacement. Elle est cependant difficile à mettre en œuvre dans le cas où les mesures effectuées sont destructives, comme pour l'analyse de la composition chimique d'un organe (voir paragraphe I.B.5) et peu précise dans le cas d'éléments dont le volume augmente, comme c'est le cas dans la zone de croissance. De plus, les mesures effectuées sont le plus souvent des descriptions spatiales : masse linéique, largeur, teneur en azote... le long de la feuille ou de la racine. Pour décrire et comprendre les flux complexes de la zone de croissance, d'autres méthodes ont donc été développées. La similitude frappante entre la plupart des organes en croissance et les structures composées de fluides en mouvement (fontaines, chutes d'eau...) met les biologistes de la croissance sur la voie de l'analyse cinématique de la croissance, avec les "instruments" (équations) de la mécanique des fluides (Silk et Erickson, 1979 ; Erickson et Silk, 1980 ; Gandar, 1980, 1983*a, b* ; Silk, 1984).

Figure II.1. Dépôt de matériau dans un élément d'organe végétal. Cas n°1 : sans croissance de l'organe. Cas n°2 : l'élément n'est pas lui-même en croissance mais il est déplacé par la croissance d'autres éléments. Cas n°3 : l'élément est en croissance et est déplacé (adapté de Durand *et al.*, 1995).



En effet, comme une chute d'eau, une zone de croissance est composée d'éléments matériels en mouvement (molécules d'eau, tissus en croissance) qui sont constamment renouvelés. Cette analogie conduit à distinguer deux manières de décrire la croissance et les flux associés : la description spatiale ou Eulerienne, spécifique d'une position par rapport à une origine et la description matérielle ou Lagrangienne, spécifique d'éléments réels, physiques, qui sont en mouvement. La description spatiale d'un organe végétal en croissance concerne non pas une cellule ou un groupe de cellules en particulier, mais une position donnée (par exemple, la masse linéique à 10 mm d'un apex racinaire, et l'évolution de cette caractéristique au cours du temps). Dans le cas des organes végétaux en croissance, ces approches ont été décrites de manière théorique et appliquées par Silk et Erickson, (1979), Gandar (1980, 1983a, b), Silk (1984).

Les descriptions Eulerienne et Lagrangienne ne sont, en général, pas identiques. Cependant, dans le cas où la croissance est stationnaire (inchangée au cours du temps), alors les deux descriptions coïncident. C'est le cas lorsque l'aspect général de la chute d'eau ou de l'organe ne varie pas, même si les éléments qui composent la chute d'eau ou l'organe sont toujours en mouvement et renouvelés.

L'équation de continuité (II.1) est classiquement utilisée en mécanique des fluides, mais peut être appliquée aux organes végétaux en croissance pour déterminer, à partir de données spatiales sur la croissance et les substances contenues dans l'organe, les flux nets des différentes substances présentes dans l'organe :

$$d = \frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \cdot \vec{v}) \quad (\text{II.1})$$

où d est le taux de dépôt local de matière, ou élément chimique, ou métabolite (il s'agit d'un flux net, résultant de synthèse et/ou de transport), ρ est une caractéristique de l'organe fonction de la position et du temps t (masse linéique ou volumique, par exemple), et $\nabla \vec{v}$ la divergence du vecteur vitesse de déplacement.

Le taux de dépôt d est donc la résultante de trois composantes. Il peut être illustré en prenant pour exemple le cas simple d'une croissance monodimensionnelle, le long d'un axe x (figure II.1, d'après Durand *et al.*, 1995).

- Dans le cas numéro 1, l'élément considéré n'est pas déplacé au sein de l'organe. Le flux net de matière dans cet élément correspond à une accumulation ou à une diminution de matière en fonction du temps. Le terme $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ représente la variation temporelle de la caractéristique $\rho(x,t)$ à la position à laquelle est calculé le taux de dépôt. Ce terme est considéré comme négligeable lorsque la croissance est stationnaire, c'est à dire quand elle n'implique pas de variation des caractéristiques spatiales au cours du temps.

- Dans le cas numéro 2, l'élément considéré est déplacé par rapport à l'origine du repère (en général, l'apex racinaire ou la base de la feuille). Au flux temporel décrit dans le cas numéro 1, s'ajoute un flux lié au déplacement de l'élément dans le gradient. Le terme $v_x \frac{\partial \rho}{\partial x}$ est un terme convectif, proportionnel à l'intensité du gradient et à la vitesse de déplacement dans le gradient
- Dans le cas numéro 3, l'élément considéré est non seulement déplacé le long de l'organe, mais il subit aussi une déformation (en général une croissance). Aux deux termes (temporel et convectif) décrits précédemment s'ajoute un terme d'étirement. Le terme $\rho \frac{\partial v_x}{\partial x}$ correspond au flux de substance lié à la variation de volume. En effet, pour maintenir la concentration locale ρ , il faut un flux proportionnel à cette concentration et à l'accroissement de volume $\frac{\partial v_x}{\partial x}$.

Il en résulte l'expression monodimensionnelle développée en coordonnées cartésiennes de l'équation (II.1) :

$$d = \frac{\partial \rho}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho}{\partial x} + \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} \quad (\text{II.2})$$

où $d(x,t)$ est le taux de dépôt de ρ à la position x au temps t , $v_x(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe x et $\rho(x,t)$ est la quantité d'une substance, exprimée par millimètre de longueur de feuille.

Dans le cas particulier de l'analyse de la croissance d'une feuille de graminée, la croissance longitudinale a presque toujours été considérée comme étant prépondérante, tandis que les croissances en largeur et en épaisseur étaient négligées. C'est donc cette version monodimensionnelle de l'équation qui a été utilisée dans de nombreuses études antérieures (Schnyder *et al.*, 1988 ; Meiri *et al.*, 1992 ; Gastal et Nelson, 1994). De même, dans certaines études sur les racines, c'est cette équation qui a été appliquée pour calculer le taux de dépôt (Bernstein *et al.*, 1995 ; Bret-Harte et Silk, 1994). En effet, l'étude est alors effectuée sur une longueur importante de racine, où les variations de dimensions sont négligées. La racine en croissance est alors considérée comme un organe parfaitement cylindrique (ce qui est produit près de l'apex a le même diamètre que ce qui a été produit auparavant).

Par contre, pour des études plus fines de l'apex racinaire, une version bidimensionnelle de l'équation de continuité, développée en coordonnées cylindriques, peut être utilisée (Silk *et al.*, 1984, 1986 ; Zhong et Läuchli, 1993). Le dépôt lié à une augmentation de diamètre peut alors être distingué de celui lié à un déplacement dans un gradient de concentration (Silk *et al.*, 1984).

Pour les feuilles de dicotylédones, il faut par contre définir la croissance en au moins deux dimensions, ce qui nécessite de définir non seulement les composantes de l'étirement dans les différentes dimensions, mais aussi un système complexe de tenseurs qui décrivent l'intensité de la déformation dans les différentes dimensions («strain rate tensor», tenseur de vitesse de déformation), ainsi que les changements d'orientation qui en découlent («vorticity tensor», tenseur de vorticité). Cette analyse, effectuée en premier lieu par Richards et Kavanagh (1943) à partir de données sur la feuille de tabac, a été reprise et développée par Erickson en 1966 (cité dans Silk, 1983).

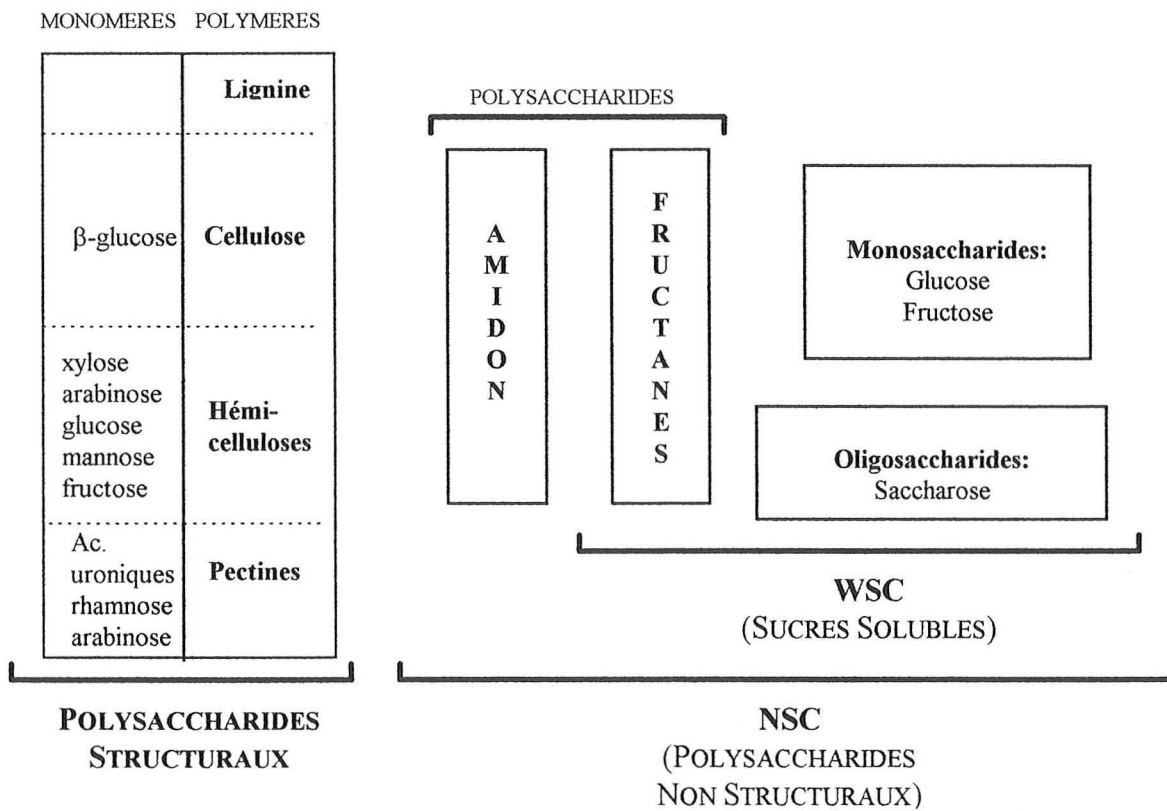
Un concept qui simplifie souvent l'analyse des flux dans les organes en croissance est celui de croissance stationnaire. La croissance est dite stationnaire lorsque ses caractéristiques sont invariantes au cours du temps. C'est souvent le cas lorsque l'origine du repère est judicieusement choisie (par exemple, l'apex racinaire ou la base de la feuille). Le terme de variation temporelle peut alors être négligé (Schnyder et Nelson 1989 ; Gastal et Nelson, 1994), et il en résulte, dans les études monodimensionnelles, que seules les données de distribution longitudinale de la substance étudiée (eau, NSC, différentes formes d'azote...) et de la croissance sont nécessaires pour calculer les taux de dépôt, c'est à dire les flux de matière liés à la croissance.

Les variations de largeur observées le long de la feuille, en particulier vers la pointe, influencent la valeur du taux de dépôt lorsqu'il est calculé à partir de l'équation (I.2), c'est à dire la version monodimensionnelle de l'équation de continuité (Gastal et Nelson, 1994). Nous avons donc été amenés à développer une expression du taux de dépôt tridimensionnelle simplifiée : le taux de dépôt est uniquement exprimé en fonction de la position par rapport à la base de la feuille, x , et du temps, t , mais le calcul est fait à partir de la masse volumique et des taux de croissance relatifs dans les trois dimensions (voir paragraphe II.B.2).

II.A.2) Le carbone dans la plante.

Le carbone est un constituant de base des molécules organiques, il est donc présent en grande quantité dans la plante. Il est présent dans les acides nucléiques, les acides aminés, et donc les protéines, mais l'essentiel du carbone dans un végétal est contenu dans une fraction appelée communément carbohydrates, qui peut représenter entre 50 et 80% de la matière sèche des plantes fourragères. Il s'agit de molécules constituées d'un squelette carboné, sur lequel se greffent des groupements hydroxyles, donnant des propriétés aldéhydiques ou cétoniques à ces composés. Les sucres simples les plus courants chez les végétaux sont le glucose et le fructose

Figure II.2. Les grandes catégories de carbohydrates chez les végétaux.



(monosaccharides) et surtout le saccharose (dimère de glucose et de fructose), qui est la forme de transport des sucres issus de la photosynthèse.

Les sucres peuvent former des polymères plus ou moins longs, appelés polysaccharides. L'amidon et la celluloses sont des polymères de glucose, différant par le type de liaison existant entre les monomères de glucose. L'amidon est une molécule de stockage peu abondante dans les parties végétatives des graminées fourragères (Van Soest *et al.*, 1991). La cellulose, sous forme de microfibrilles enchevêtrées, est le constituant essentiel de la paroi des cellules végétales. Dans les parois végétales âgées, les fibrilles de cellulose sont imprégnées de composés phénoliques (lignine) qui rigidifient la paroi et la rendent moins dégradable, ce qui entraîne une diminution de la qualité fourragère. Les hémicellulose sont également un des constituants des parois végétales. Ce sont des polymères de différents oses (xylose, arabinose, glucose, mannose, galactose), plus ou moins ramifiés. Les pectines sont des polymères d'acides uroniques, de rhamnose, d'arabinose et de galactose essentiellement. Ils sont peu abondants dans les graminées fourragères (Van Soest *et al.*, 1991).

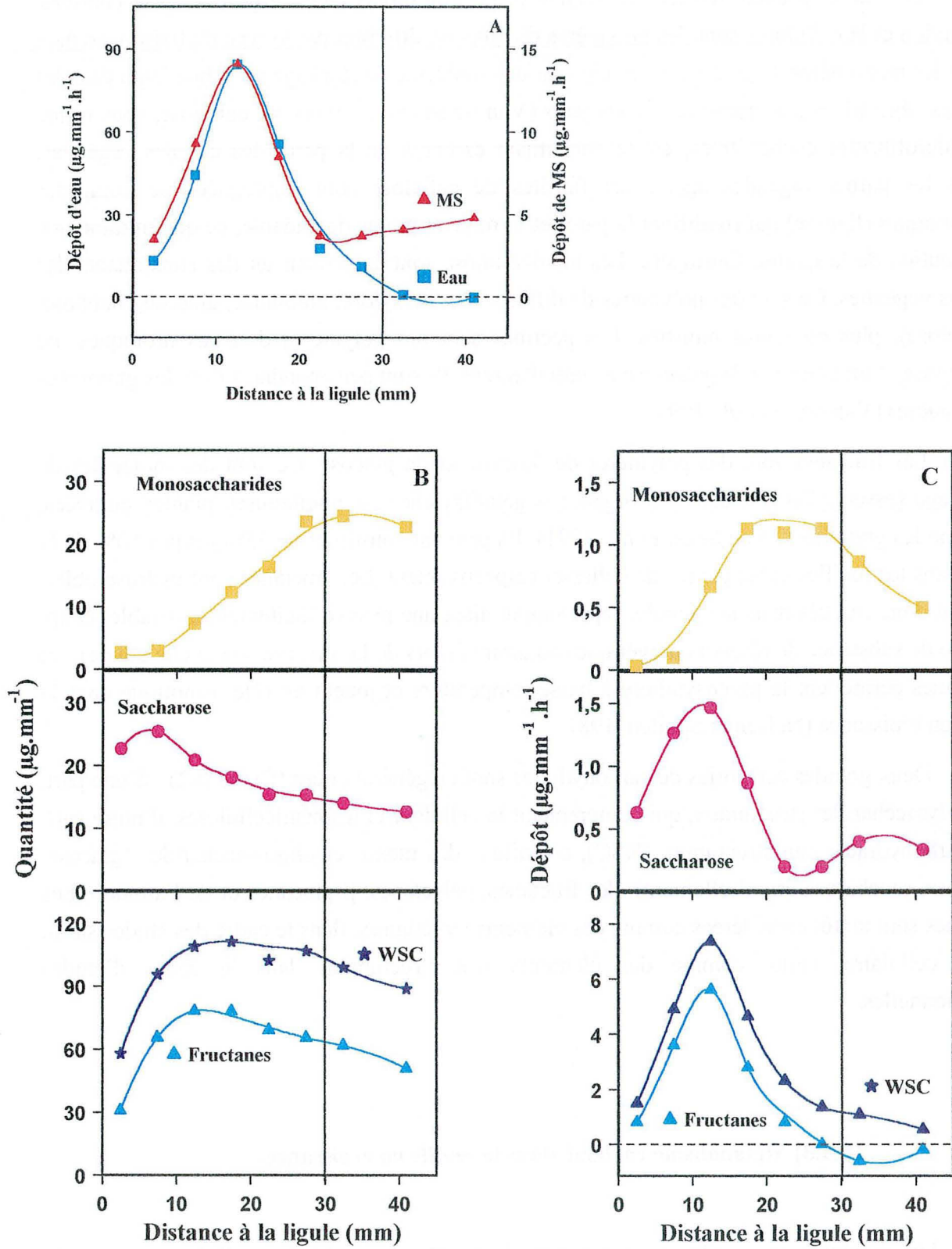
Les fructanes sont des polymères de fructose et de glucose. Ce sont des molécules de stockage (essentiellement dans les organes végétatifs) chez de nombreuses plantes cultivées, comme les graminées (Van Soest *et al.*, 1991). Ils peuvent constituer de 35% jusqu'à 50% de la MS dans les feuilles et les gaines de celles-ci respectivement. Les fructanes sont hydrosolubles, et sont donc stockés dans la vacuole, représentant ainsi une réserve facilement utilisable. Outre le rôle de substance de réserve énergétique (notamment lors de la repousse après une coupe), les fructanes permettent la photosynthèse à basse température et jouent un rôle osmotique dans la zone en croissance (Nelson et Spollen, 1987).

Deux grandes catégories de carbohydrates sont en général citées (figure II.2) : d'une part, les polysaccharides structuraux, qui comprennent la cellulose et les hémicelluloses, d'autre part, les carbohydrates non structuraux (NSC), constitués des mono- et oligo-saccharides (glucose, fructose, saccharose essentiellement), des fructanes, galactanes, β -glucanes et de l'amidon. Les pectines sont tantôt considérées comme des éléments structuraux, dans le cadre des études sur la paroi cellulaire, tantôt comme des éléments non structuraux, dans le cadre d'études nutritionnelles.

II.A.3) Métabolisme carboné dans la feuille en croissance.

Les éléments successifs qui composent la feuille de graminée (cellules, groupes de cellules, segments) subissent à tour de rôle les mêmes transformations : division, élongation, maturation. Ainsi un gradient de développement est observé le long de la zone de croissance

Figure II.3. (A) Flux d'eau et de MS (Schnyder et Nelson, 1988). (B) Détail des quantités et (C) des flux de différents WSC le long de la feuille en croissance (Schnyder *et al.*, 1988). Le trait vertical représente la fin de la zone de croissance.



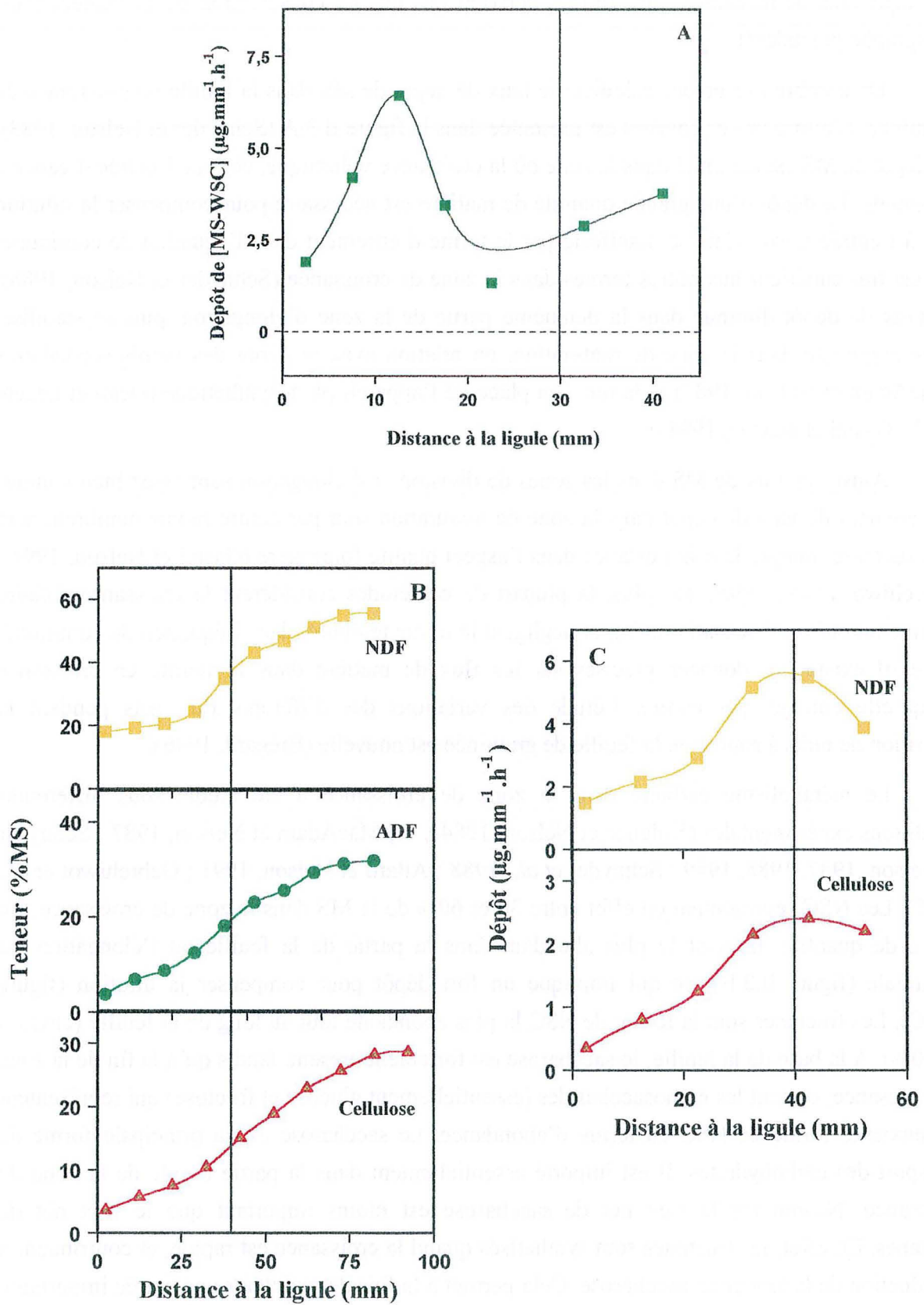
(Prat, 1948). De plus, il est possible, une fois la croissance décrite de manière quantitative, de déterminer les flux de matière liés à la mise en place des organes végétaux, grâce soit à un suivi d'éléments «réels» alors qu'ils subissent les différentes étapes du processus de croissance, soit aux équations de mécanique des fluides dérivant des lois de conservation de la matière (voir paragraphe précédent).

De nombreuses études calculent le taux de dépôt de MS dans la feuille en croissance de graminée. L'allure de ces courbes est présentée dans la figure II.3.A (Schnyder et Nelson, 1988). Le dépôt de MS est maximal dans la zone où la croissance volumique, et donc l'entrée d'eau, est maximale. Le dépôt d'une grande quantité de matière est nécessaire pour compenser la dilution liée à l'entrée d'eau. Cela se manifeste par le terme d'étirement dans l'équation de continuité, qui est très supérieur aux autres termes dans la zone de croissance (Schnyder et Nelson, 1988). Le taux de dépôt diminue dans la deuxième partie de la zone d'élongation, puis se stabilise, voire augmente dans la zone de maturation, en relation avec le dépôt des parois secondaires (MacAdam et Nelson, 1987) et la mise en place de l'appareil photosynthétique (Dean et Leech, 1982 ; Gastal et Nelson, 1994).

Ainsi, les flux de MS dans les zones de division et d'élongation sont assez bien connus. Les données de taux de dépôt dans la zone de maturation sont par contre moins nombreuses et plus récentes, malgré leur importance dans l'aspect qualité fourragère (Gastal et Nelson, 1994 ; Gebrehiwot *et al.*, 1995). De plus, la plupart de ces études considèrent la croissance foliaire comme un phénomène stationnaire, et négligent le terme temporel dans l'équation de continuité. Ainsi, il existe des données précises sur les flux de matière dans la feuille en croissance lorsqu'elle émerge, par contre, l'étude des variations des différents flux nets pendant la transition de puits à source de la feuille de graminée est nouvelle (Brégar, 1996).

Le métabolisme carboné dans la zone de croissance a été étudié sous différentes conditions expérimentales (Volenc et Nelson, 1984a, b ; MacAdam et Nelson, 1987 ; Schnyder et Nelson, 1987, 1988, 1989 ; Schnyder *et al.*, 1988 ; Allard et Nelson, 1991 ; Gebrehiwot *et al.*, 1995). Les NSC représentent en effet entre 30 et 60% de la MS dans la zone de croissance. En terme de quantité, ils sont le plus abondant dans la partie de la feuille où l'élongation est maximale (figure II.3.B), ce qui implique un fort dépôt pour compenser la dilution (figure II.3.C). Les fructanes sont la forme de NSC la plus abondante tout au long de la feuille (environ de 50%). A la base de la feuille, le saccharose est fortement présent, tandis qu'à la fin de la zone de croissance, ce sont les monosaccharides (essentiellement glucose et fructose) qui représentent la deuxième forme de NSC en terme d'abondance. Le saccharose est la principale forme de transport des carbohydrates. Il est importé essentiellement dans la partie basale de la zone de croissance. Néanmoins le flux net de saccharose est moins important que le flux net de fructanes. En effet, les fructanes sont synthétisés quand la croissance est rapide, et contribuent à la réduction de la teneur en saccharose. Cela permet à la fois de maintenir une entrée importante

Figure II.4. (A) Flux de matériel structural (Schnyder *et al.*, 1988). (B) Détail des teneurs et (C) des flux de différents types de fibres le long de la feuille en croissance (Gebrehiwot *et al.*, 1995). Le trait vertical représente la fin de la zone de croissance.



de saccharose et d'eau, par déchargement symplastique du phloème, tout en réduisant le potentiel osmotique dans le cytoplasme (Schnyder *et al.*, 1988). Les fructanes sont ensuite dégradés (en fructose notamment, d'où une augmentation du flux net de monosaccharides) quand les tissus sont déplacés vers la zone de maturation où l'import est insuffisant pour assurer les processus de synthèse des parois secondaires et la mise en place de l'appareil photosynthétique (Schnyder *et al.*, 1988 ; Allard et Nelson, 1991).

La fraction carbonée structurale a quelquefois été estimée à partir de la différence entre la quantité de MS et de WSC dans les tissus (figure II.4.A). Cette estimation est surtout valable dans la zone de maturation, car le pic de dépôt observé dans la zone de croissance résulte également d'un dépôt important de MS azotée dans les premiers millimètres (Gastal et Nelson, 1994), et d'un dépôt d'autres minéraux, en particulier de potassium, dans la zone où l'élongation est maximale (Keingatti *et al.*, 1995). Néanmoins, le dépôt de composés pariétaux commence dès le début de la zone de croissance, et est maximal dès la fin de la zone d'élongation (figure II.4.C). Cela entraîne une augmentation progressive des teneurs en composés pariétaux de la base de la feuille jusqu'à environ 100 mm de la base de la feuille (figure II.4.B). Le dépôt de cellulose atteint un plateau au début de la zone de maturation, mais elle se retrouve d'autant moins dans la fraction NDF, la plus dégradabile, que l'on s'éloigne de la base de la feuille. Il est ainsi probable que l'épaississement des parois, ainsi qu'un dépôt de lignine, diminue la dégradabilité des parois, et déplace une partie de la fraction NDF vers la fraction ADF, moins dégradabile (Gebrehiwot *et al.*, 1995).

II.B) Matériel et méthodes.

II.B.1) Matériel végétal.

Les résultats suivants correspondent à deux expérimentations réalisées dans les mêmes conditions de croissance. Les résultats de l'expérimentation I se rapportent au matériel végétal obtenu lors de l'expérimentation décrite au chapitre I. Les prélèvements de l'expérimentation II se sont déroulés selon le même protocole : prélèvements le jour de l'émergence de la feuille f_n , puis 2, 4, 6, 8 et 10 jours après l'émergence.

La détermination de la teneur en fibres des tissus nécessite environ 50 mg de matériel végétal par analyse. Il a donc fallu regrouper les échantillons obtenus à des positions voisines le long de la feuille. Ainsi, nous disposons d'une mesure dans la zone de croissance (0-30 mm), de

deux mesures dans la zone de maturation (30-70 mm et 70-100 mm), puis de mesures tous les 40 mm. Des analyses de NSC ont également été effectuées sur ces échantillons de MS regroupée.

Des échantillons prélevés sur la feuille précédente (f_{n-1}) ont également été analysés. Ces échantillons correspondent au suivi d'un segment particulier : un segment de 20 mm de limbe, situé à 20 mm de la ligule. Il s'agit donc d'une approche matérielle.

II.B.2) Calcul des flux de matière.

Le matériel végétal utilisé est celui qui a été prélevé dans les conditions décrites dans la partie I.B. Nous disposons des caractéristiques de la croissance en longueur (intensité, distribution) et de la croissance en largeur et en épaisseur (distribution longitudinale) au cours du temps, ce qui a été décrit au chapitre I. L'approche matérielle (I.B.5) nous a permis de déterminer les lignes de déplacement de l'ensemble des éléments matériels qui constituent la feuille. A partir de ces lignes de déplacement et des profils de différentes caractéristiques le long de la feuille, à différentes dates, il est possible de déterminer les caractéristiques successives (par exemple, la masse linéique) des différents éléments qui composent la feuille. Une autre approche du suivi d'éléments matériels peut être effectuée à partir des segments prélevés sur la feuille f_{n-1} . En effet, ces segments sont prélevés non pas à une position fixe de base de la feuille, mais à une position fixe par rapport à la ligule, c'est à dire un élément repérable (matériel) le long de la feuille. Le suivi de ce segment au cours du temps nous donne l'évolution des segments sur une feuille mature (à partir de J3). Si la croissance des feuilles successives est répétitive, alors f_n doit connaître les mêmes évolutions que f_{n-1} . Cette méthode permet une première approche des flux liés à la croissance.

Une autre approche utilise l'équation de continuité et permet d'obtenir, directement à partir des données spatiales (profils), un flux net (ou taux de dépôt). Par exemple, l'équation de continuité (II.1) peut être développée en une dimension, et coordonnées cartésiennes :

$$d_t = \frac{\partial \rho_t}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho_t}{\partial x} + \rho_t \cdot REGR \quad (\text{II.3})$$

où $d_t(x,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche par unité de longueur, $v_x(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe x , $\rho_t(x,t)$ est la masse linéique de la feuille et REGR est le taux de croissance longitudinale relatif.

Le terme $d_t(x,t)$ représente la quantité nette de MS qui se dépose instantanément dans un segment d'un millimètre de long, situé à x millimètres de la base de la feuille au temps t . La valeur de d_t résulte du vieillissement du tissu, du déplacement le long de la feuille du segment

considéré et de son étirement. Il s'agit d'un flux net résultant de la force de puits du segment et de la disponibilité en MS.

L'équation de continuité peut également être développée en trois dimensions et en coordonnées cartésiennes, ce qui donne :

$$d_v = \frac{\partial \rho_v}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho_v}{\partial x} + v_y \frac{\partial \rho_v}{\partial y} + v_z \frac{\partial \rho_v}{\partial z} + \rho_v (\nabla \cdot \vec{v}) \quad (\text{II.4})$$

où $d_v(x,y,z,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche sur une base volumique, $v_x(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe x , $v_y(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe y , $v_z(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe z , $\rho_v(x,y,z,t)$ est la masse volumique de la feuille, $\nabla \cdot \vec{v}$ est la divergence de la vitesse de déplacement (taux d'étirement).

Le taux d'étirement est la somme des taux relatifs de croissance en longueur, largeur et épaisseur, mesurés et calculés au chapitre I.

$$\nabla \cdot \vec{v} = \frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} = REGR + r_l + r_e \quad (\text{II.5})$$

Considérant qu'à une abscisse donnée, les propriétés de la feuille sont identiques dans toute la largeur et toute l'épaisseur du segment, alors :

$$\frac{\partial \rho_v}{\partial y} = \frac{\partial \rho_v}{\partial z} = 0 \quad (\text{II.6})$$

Par conséquent, l'équation (II.4) peut être réécrite ainsi :

$$d_v = \frac{\partial \rho_v}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho_v}{\partial x} + \rho_v (REGR + r_l + r_e) \quad (\text{II.7})$$

Le terme $d_v(x,y,z,t)$ représente la quantité de MS qui se dépose instantanément dans un segment d'un volume d'un millimètre cube, situé à x millimètres de la base de la feuille au temps t (dans notre cas, d_v ne dépend ni de y ni de z). La valeur de d_v résulte également du vieillissement du tissu, du déplacement le long de la feuille du segment considéré et de son étirement. Il s'agit du flux net de MS dans un millimètre cube de tissus, ce qui est proche de la mesure d'une activité métabolique liée à la croissance.

Il n'existe pas de relation simple entre d_v et d_t (voir Annexe II). Par conséquent, d_t et d_v doivent être calculés séparément selon les équations (II.3) et (II.4).

Nous n'avons pas effectué de calculs de taux de dépôt de NSC ni de fibres, car les données dont nous disposons, notamment dans la zone de croissance, ne sont pas assez précises du point de vue spatial.

II.B.3) Dosage des sucres solubles.

Les sucres solubles dans l'eau (WSC, c'est à dire fructanes, mono- et oligosaccharides) ont été dosés d'après une méthode mise au point par Dimler *et al.* (1952). Cette méthode est rapide et relativement simple, tout en restant fiable. Le principe est de déterminer la densité optique (d.o.) par spectrophotométrie d'une solution aqueuse (préparée à partir d'un échantillon de 5 mg) à laquelle le réactif (Anthrone dissoute dans de l'acide sulfurique concentré, 2 g/l) est ajouté et qui est laissée à réagir pendant 15 min au bain-marie bouillant. Le résultat, exprimé en fructose (ou glucose) potentiel, est déterminé en comparant la d.o. de l'échantillon avec la d.o. d'une gamme étalon de solutions de fructose (Annexe III). La quantité d'amidon dans les tissus de fétuque élevée est généralement considérée comme négligeable (Volenec et Nelson, 1984a). Par conséquent nous avons fait l'approximation que la quantité de sucres non structuraux (NSC) était égale à la quantité de sucres solubles mesurée.

II.B.4) Dosage des fibres.

Les différentes techniques de mesure de la teneur en fibre dans les tissus végétaux requièrent généralement une quantité importante de matériel végétal par rapport à l'échelle de notre travail (de 500 mg à 1g de MS). Il nous a donc fallu mettre au point une méthode portant sur des quantités de matériel végétal plus faibles (environ 50 mg). Notre premier essai a porté sur une méthode utilisée en alimentation humaine, la mesure des fibres TDF (Total Dietary Fibre, Prosky *et al.*, 1985), définies comme la partie des parois qui résiste à l'action des enzymes digestives des mammifères. Il s'agit donc d'une méthode de digestion enzymatique qui hydrolyse les composés pariétaux peu polymérisés, mais n'attaque pas les composés plus compacts, et qui rend compte des processus de digestion chez les monogastriques.

La digestion se déroule en trois phases, chacune correspondant à l'action d'une enzyme, à un pH et une température donnés.

- La première phase est la digestion par une amylase résistante à la chaleur, à pH 6.0 (maintenu par une solution de tampon phosphate, et ajusté avec de l'acide phosphorique, ou de la soude), pendant 30 minutes au bain marie bouillant.
- La seconde phase est l'action d'une protéase, pendant 30 minutes à 60°C, à pH 7.5.
- La troisième phase concerne la digestion par une amyloglucosidase, pendant 30 minutes à 60°C, à pH acide (4.5).

Le résidu non digéré est précipité avec de l'éthanol à 95°, pendant au moins une heure, puis filtré sur un creuset en verre fritté, avec aspiration. Le résidu est rincé plusieurs fois à l'éthanol 78°, puis 95° et enfin à l'acétone. Les creusets sont placés à l'étuve, et la teneur en fibres est calculée selon la formule suivante :

$$\%TDF = \frac{(Poids_{résidu} - N_{résidu} - Cendres_{résidu})}{Poids_{échantillon}} \times 100 \quad (II.8)$$

Comme nous ne disposons pas d'une quantité suffisante de matériel pour effectuer des répétitions sur tous les échantillons, et déterminer la teneur en azote et en cendres du résidu, nous avons pris des valeurs identiques de %N et de %Cendres pour tous les résidus.

Cette technique est relativement longue, et est plutôt utilisée en alimentation humaine. C'est pourquoi nous avons ensuite travaillé à la mise au point de la méthode de détermination des fibres à l'aide de détergents neutres (NDF) sur des petites quantités. Le principe est d'exposer le matériel végétal à un détergent neutre (Annexe IV) et à une température élevée, de rincer et de récupérer le résidu, composé de la fraction cellulosique, hemicellulosique et lignifiée de la paroi. Il faut noter que les pectines sont solubilisées et n'entrent pas dans la fraction NDF. Les conditions nécessaires à une mesure fiable sont : une ébullition rapide et homogène dans la solution, et la récupération de toutes les particules après la digestion. Pour cela, nous avons placé le mélange poudre + détergent dans des erlenmeyers, tandis que l'ébullition était provoqué par un bain de sable. Après une heure, le résidu était filtré sur un creuset en verre fritté, rincé, puis séché au moins 24 heures à l'étuve.

Après pesée, le résidu était passé à l'analyseur carbone/azote pour déterminer sa teneur en azote. Il ne nous a pas été possible de mesurer la teneur en cendres du résidu, nous avons donc pris une valeur standard (1% de la MS initiale). La teneur en fibres est calculée avec la formule suivante :

$$\%NDF = \frac{(Poids_{résidu} - N_{résidu} - Cendres_{résidu})}{Poids_{échantillon}} \times 100 \quad (II.9)$$

Figure II.5. Quantité de matière sèche exprimée par unité de longueur (ML) à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲). Les pointillés représentent les ML successives de quelques éléments matériels, calculées à partir de leurs trajectoires et des profils de ML le long de la feuille, au cours du temps. La flèche représente la position de la ligule à J9, le trait vertical représente la fin de la zone d'élongation.

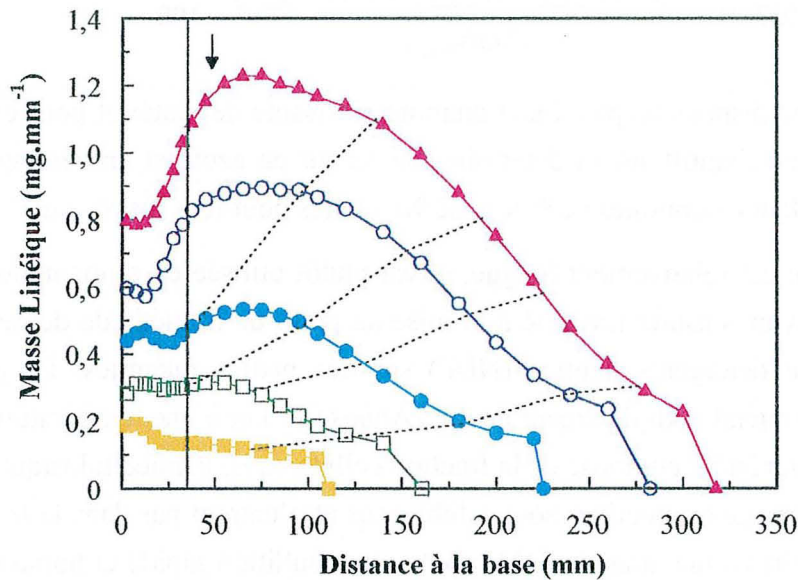
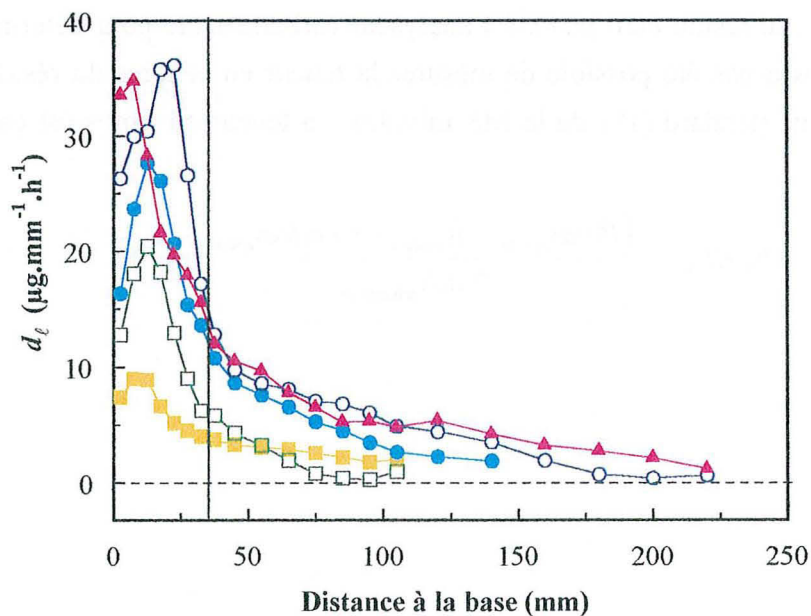


Figure II.6. Taux de dépôt de matière sèche exprimé par unité de longueur (d_ℓ) à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲). Le trait vertical représente la fin de la zone d'élongation.



II.C) Résultats et discussion.

II.C.1) Masse linéique et dépôt par unité de longueur.

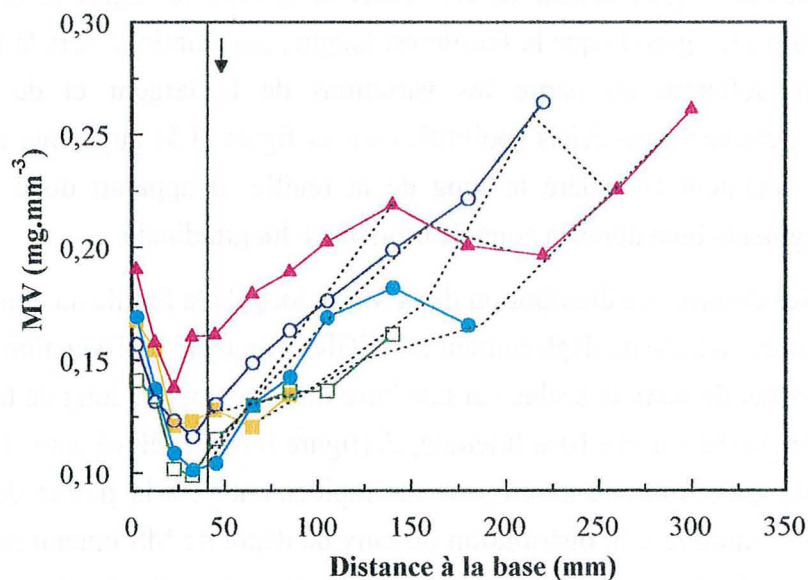
Quel que soit le stade de développement de la feuille, la quantité de MS par unité de longueur (ML) augmente le long de la zone de croissance longitudinale (figure II.5), se stabilise sur une longueur d'autant plus grande que la feuille est longue, puis diminue vers la pointe de la feuille. Ces variations reflètent en partie les variations de la largeur et de l'épaisseur. Parallèlement, la ML d'éléments matériels (pointillés sur la figure II.5) augmente au cours du temps, quel que soit l'élément considéré le long de la feuille. Il apparaît donc que la MS s'accumule dans les segments bien après la zone de croissance longitudinale.

En combinant les données de distribution de la MS le long de la feuille au cours du temps aux données de croissance (vitesse de déplacement et REGR) au moyen de l'équation (II.3), nous avons déterminé le flux net de matière sèche, sur une base linéique, tout au long de la feuille. Le taux de dépôt de matière sèche sur une base linéique, d_t (figure II.6), est élevé entre 10 et 20 mm de la base de la feuille, puis diminue plus ou moins rapidement vers la pointe de la feuille. L'allure de la courbe est similaire à la distribution du taux de dépôt de MS obtenu par Schnyder et Nelson (1988), sur une feuille qui venait juste d'émerger des gaines des feuilles précédentes. A J9, le pic de dépôt maximal est plus proche de la base de la feuille que les jours précédents, du fait du déplacement du pic de REGR maximal vers la base de la feuille, observé à J8 sur la figure I.22. La valeur de d_t augmente de manière marquée entre J1 et J7 dans la zone de croissance longitudinale (0-35 mm), mais également tout le long de la feuille.

Un élément matériel est déplacé de plus en plus loin de la base de la feuille, et traverse des zones caractérisées par différents d_t au cours du temps. Etant donné que la VAF et le REGR sont relativement stables entre J1 et J7, les éléments successifs de la feuille sont déplacés à travers ces zones de dépôt toujours avec la même vitesse. Ainsi, un élément situé près de la base de la feuille à J1, qui traverse des zones où d_t est faible, accumule moins de MS qu'un élément situé près de la base à J3, qui traverse des zones où d_t est élevé. Par conséquent, la production d'un élément situé près de la pointe de la feuille requiert moins de MS que la production d'un élément situé près de la base de la feuille, ceci étant bien entendu à relier aux variations de largeur et d'épaisseur des segments le long de la feuille.

Aux différentes phases de l'ontogenèse de la feuille correspondent des taux de dépôt différents, pour les éléments successifs de la feuille, qui sont liés à l'évolution du volume des éléments successifs mis en place.

Figure II.7. Quantité de matière sèche exprimée par unité de volume (MV) à J11 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲). Les pointillés représentent les MV successives de quelques éléments matériels, calculées à partir de leurs trajectoires et des profils de MV le long de la feuille, au cours du temps. La flèche représente la position de la ligule à J9, le trait vertical représente la fin de la zone d'élongation.



II.C.2) Masse volumique et dépôt par unité de volume.

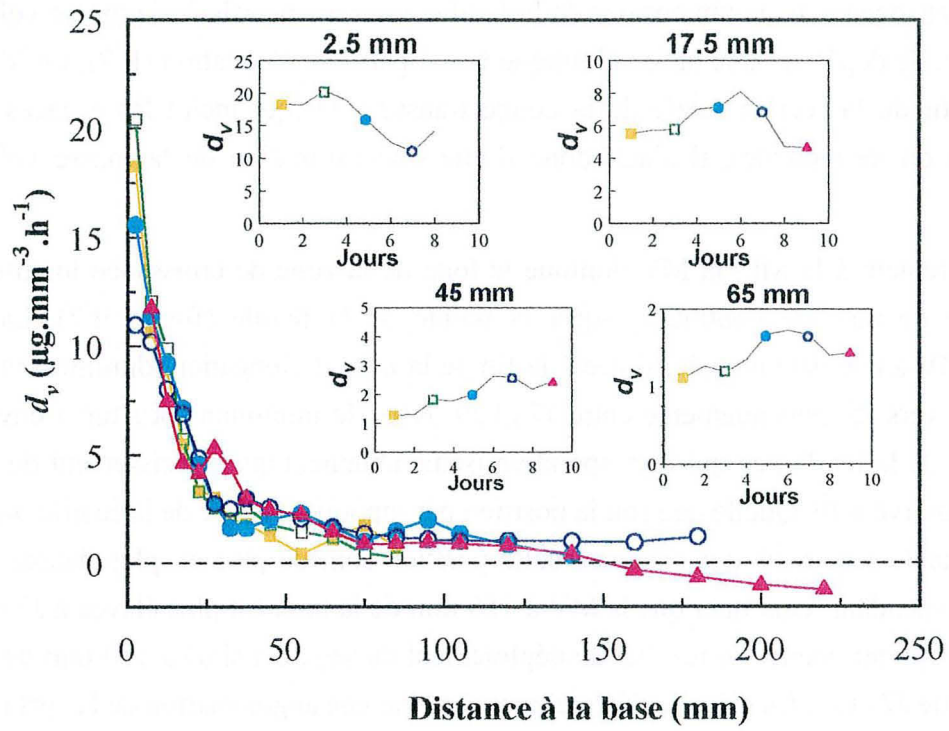
Le terme d_t représente le flux net de MS qui entre dans un segment de feuille d'un millimètre de long. Sa largeur et son épaisseur influent sur la valeur de d_t . Aussi, pour nous affranchir des changements de dimensions de la feuille, nous avons calculé la masse volumique (MV) et le taux de dépôt sur une base volumique (d_v) à partir de l'équation (II.7). La MV étant calculée à partir de la section totale de la coupe transversale (qui inclut les espaces gazeux intercellulaires du mésophylle), il s'agit donc d'une sous-estimation de la masse volumique «cellulaire».

Contrairement à la ML, la MV diminue le long de la zone de croissance longitudinale, puis augmente de manière continue jusqu'à la pointe de la feuille (figure II.7). La valeur minimale de MV à une date donnée, située à la fin de la zone d'élongation, diminue entre J1 et J3, se stabilise vers J5, puis augmente entre J7 et J9. A J9, le minimum est situé à environ 25 mm de la base de la feuille, ce qui correspond vraisemblablement au rétrécissement de la zone d'élongation observé à J9. Quelle que soit la position par rapport à la base de la feuille où l'on se place, les éléments successifs qui occupent cette position sont de plus en plus denses avec le temps. Il faut cependant remarquer que la MV à 150 mm de la base est plus élevée à J7 qu'à J9. Cela peut s'interpréter comme le résultat du déploiement du segment situé à 150 mm de la base de la feuille entre J7 et J9. En effet, le déploiement entraîne une augmentation de la surface de la section transversale, et en particulier de l'épaisseur des segments (voir pointillés sur la figure I.23.B). Cela conduit à une diminution de la valeur de MV entre J7 et J9.

La diminution de MV le long de la zone de croissance longitudinale peut s'expliquer par la dilution de la matière sèche par le flux d'eau lié à la croissance qui entre dans les cellules (Schnyder et Nelson 1988), mais aussi par l'augmentation du volume des espaces gazeux intercellulaires. Par exemple, à J9, la MV passe de 0,19 à 0,14 mg.mm⁻³ entre 0 et 30 mm de la base, soit une diminution de 26%. L'augmentation de section transversale est plus importante que l'augmentation de ML. Par contre, dans le même temps, la densité «cellulaire» (estimée en divisant la ML par la quantité d'eau présente dans un segment d'un millimètre de long), passe de 0,22 à 0,20 mg.mm⁻³ entre 0 et 30 mm de la base, soit une diminution de seulement 9%. Ainsi, l'entrée d'eau dans la zone de croissance n'explique qu'une partie de l'augmentation de la section transversale. Celle-ci est principalement due à l'apparition d'espaces gazeux intercellulaires entre 0 et 30 mm de la base de la feuille. La matière sèche dans la zone de croissance est donc diluée à la fois par de l'eau et par de l'air.

Au-delà de la zone de croissance longitudinale, la MV augmente de manière régulière. Les MV successives d'éléments matériels, déduites des lignes de déplacement et des profils de

Figure II.8. Taux de dépôt de matière sèche exprimé par unité de volume (d_v) à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲).



MV le long de la feuille aux différentes dates (pointillés sur la figure II.7), indiquent que ces éléments accumulent de la matière sèche même lorsqu'ils sont sortis de la zone d'élongation. Une partie de cette augmentation de MV correspond à la maturation des tissus (MacAdam et Nelson, 1987), qui se déroule entre la fin de la zone de croissance en longueur et environ 80 mm de la base de la feuille (MacAdam, 1988). Dans cette zone, l'appareil photosynthétique est mis en place dans les cellules du mésophylle (Gastal et Nelson, 1994). De plus, les parois secondaires de cellules sont déposées dans les vaisseaux du xylème, les cellules fibreuses du sclérenchyme et la gaine interne des faisceaux vasculaires (Hanna, *et al.*, 1973 ; MacAdam, 1988). Cela provoque une augmentation de MV pour les éléments dès la fin de la zone de croissance longitudinale. Néanmoins, il est important de noter que l'ensemble des éléments matériels de la feuille accumulent de la matière sèche même lorsqu'ils sont exposés à la lumière (sauf entre J7 et J9, après 150 mm de la base de la feuille).

Le taux de dépôt de matière sèche sur une base volumique (d_v) représente la valeur instantanée de la matière sèche qui se dépose dans une unité de volume en une heure (figure II.8). Pendant toute la période de développement de la feuille, d_v est élevé près de la base de la feuille, diminue fortement le long de la zone d'élongation, puis plus faiblement vers la pointe de la feuille, sans jamais s'annuler.

Près de la base de la feuille, d_v est maximal à J3, puis diminue rapidement par la suite (voir encart 2,5 mm sur la figure II.8). Cette diminution de d_v avec le temps à la base de la feuille est essentiellement due à la diminution des taux d'élargissement et d'épaississement relatifs (r_ℓ et r_e , figure I.26). Entre 10 et 20 mm de la base de la feuille, d_v reste relativement constant au cours du temps (voir encart 17,5 mm sur la figure II.8). Dans cette partie de la zone de croissance, la croissance en longueur est bien plus importante que la croissance en largeur ou en épaisseur, et reste à peu près constante entre J2 et J6. Dans la zone de maturation (approximativement entre 35 et 80 mm de la base de la feuille), d_v augmente entre J1 et J9 (voir encart 45 mm sur la figure II.8).

Au cours de la croissance, la surface de la feuille exposée à la lumière augmente progressivement, à la fois parce que la longueur de limbe émergé augmente et parce que la feuille se déplie. La feuille en croissance passe graduellement d'une situation de puits exclusif (de J1 à J3) à une situation d'autotrophie. A J1 et J3, tous les assimilats provenant des feuilles précédentes semblent utilisés par la zone d'élongation, où la demande est forte. Cette priorité pourrait être liée au fait que le flux d'assimilats passe par la base de la feuille avant de pouvoir rejoindre des parties plus matures. Après J3, la feuille en croissance assimile du carbone et réduit les nitrates. Ces capacités augmentent au cours du temps jusqu'au déploiement complet du limbe. Les assimilats de la feuille en croissance sont dirigés vers la base de la feuille pour y satisfaire les besoins liés à la croissance et à la maturation, qui sont ainsi progressivement satisfaits (Brégard, 1996). Ainsi, l'augmentation de d_v dans la zone de maturation au cours du

temps est sans doute liée à la satisfaction progressive de la demande en assimilats de la zone de maturation.

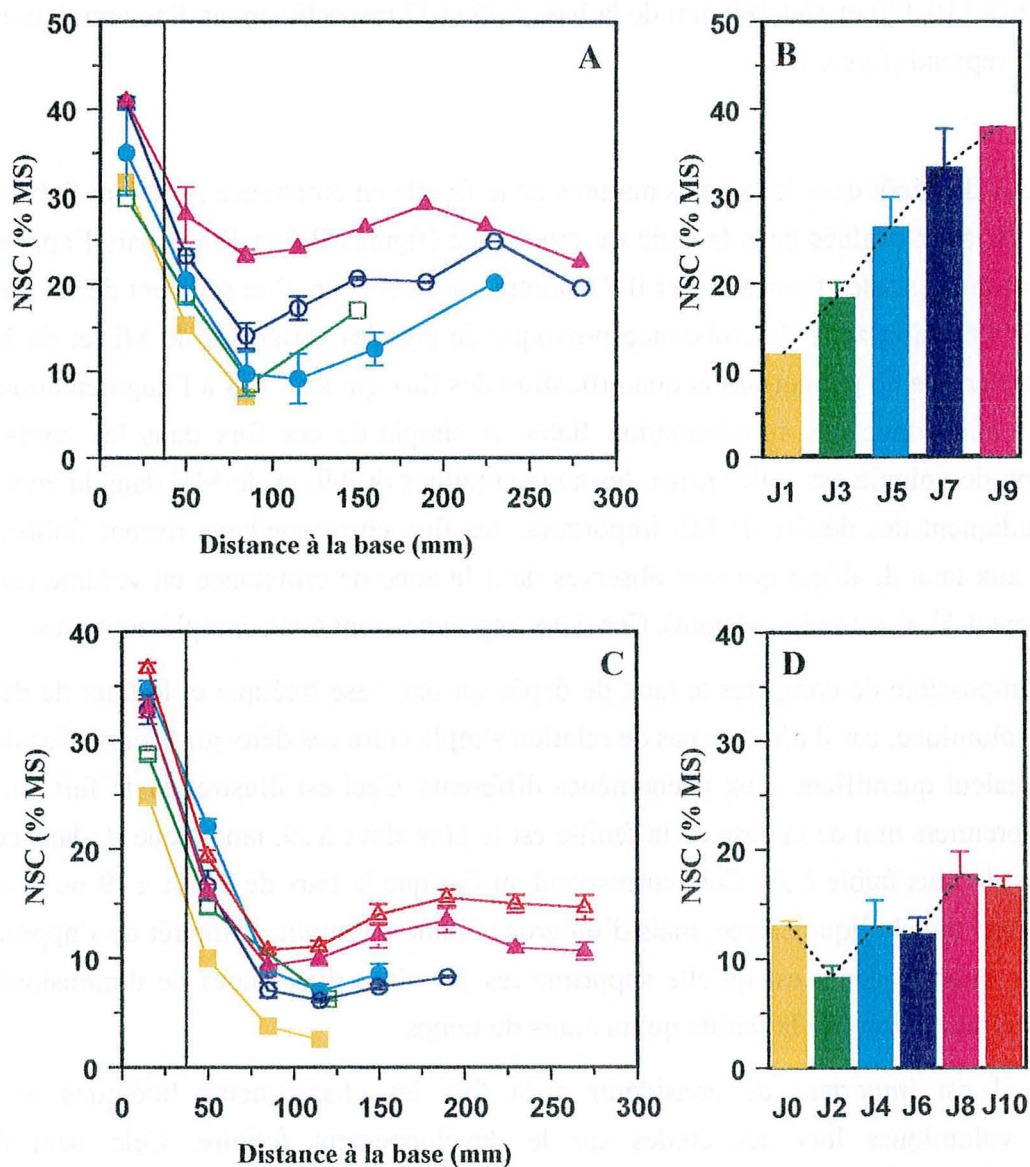
Une feuille dont la croissance est presque terminée (comme par exemple f_n à J9) exporte une partie de ses assimilats à la feuille en croissance suivante (ici, f_{n+1}) dès que la gaine a commencé à croître (Brégard, 1996). Une partie de ces assimilats peut également être stockée dans les parties matures de la feuille en croissance, et ainsi causer une augmentation constante de MV et de d_v dans les parties de la feuille exposées à la lumière. Ainsi, lorsque des segments situés entre 60 et 80 mm de la base de la feuille à J3 (ils sont alors limités en assimilats) sont déplacés jusqu'à 110-130 et 160-180 mm de la base à J5 et J7 respectivement, l'accumulation de matière sèche reprend (figure II.8).

Les taux de dépôt dans les parties matures de la feuille en croissance semblent faibles en comparaison de ceux évalués dans la zone de croissance (figures II.6 et II.8), mais l'approche matérielle (pointillés sur les figures II.5 et II.7) montre qu'à l'échelle d'un segment de feuille, le dépôt de MS hors de la zone de croissance provoque de grandes variations de ML et de MV. L'approche matérielle ne permet pas la quantification des flux qui sont liés à l'augmentation de volume, mais elle donne une représentation fiable et simple de ces flux dans les zones où l'augmentation de volume est nulle. Ainsi, les augmentations de ML et de MV dans la zone de maturation indiquent des dépôts de MS importants, les flux correspondants restent faibles en comparaison aux taux de dépôt qui sont observés dans la zone de croissance en volume (où le terme d'étirement $\nabla \cdot \vec{v}$ est prépondérant). Ces deux approches sont donc complémentaires.

Il est impossible de comparer le taux de dépôt sur une base linéique et le taux de dépôt sur une base volumique, car il n'existe pas de relation simple entre ces deux grandeurs. Ces deux méthodes de calcul quantifient deux phénomènes différents. Ceci est illustré par le fait que d_v dans les cinq premiers mm de la base de la feuille est le plus élevé à J9, tandis que d_l dans cette même zone est le plus faible à J9. Cela correspond au fait que le taux de dépôt à J9 ne résulte pas d'une activité métabolique élevée, mais d'un gros volume à remplir. L'intérêt de l'approche volumique des taux de dépôt est qu'elle supprime les possibles différences de dimensions et leurs variations, tant le long de la feuille qu'au cours du temps.

Ainsi, il est important de considérer à la fois les changements linéiques et les changements volumiques lors des études sur le développement foliaire. Cela peut être particulièrement important lors de l'étude des métabolismes carboné et azoté, qui sont abordés plus loin.

Figure II.9. Evolution de la teneur en NSC le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I (A). A J0 (■), J2 (□), J4 (●), J6 (○), J8 (▲) et J10 (△) pour l'expérimentation II (C). Les barres verticales (B et D) représentent les teneurs en NSC d'un segment de la feuille f_{n-1} situé à 20 mm de la ligule pour l'expérimentation I et l'expérimentation II respectivement. Le trait vertical indique la fin de la zone de croissance longitudinale. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne (n = 5).



II.C.3) Sucres non structuraux.

L'expérimentation I montre un profil caractéristique de teneur en NSC le long d'une feuille en croissance (figure II.9), comme cela a été décrit par MacAdam et Nelson (1987). La teneur en NSC est maximale dans la zone de croissance et diminue de manière marquée le long de la zone de maturation, pour atteindre un minimum vers 85 mm de la base de la feuille. Après 85 mm, la teneur en NSC augmente de manière régulière vers la pointe, sauf pour J7 et J9, où une diminution de la teneur en NSC près de la pointe de la feuille est observée.

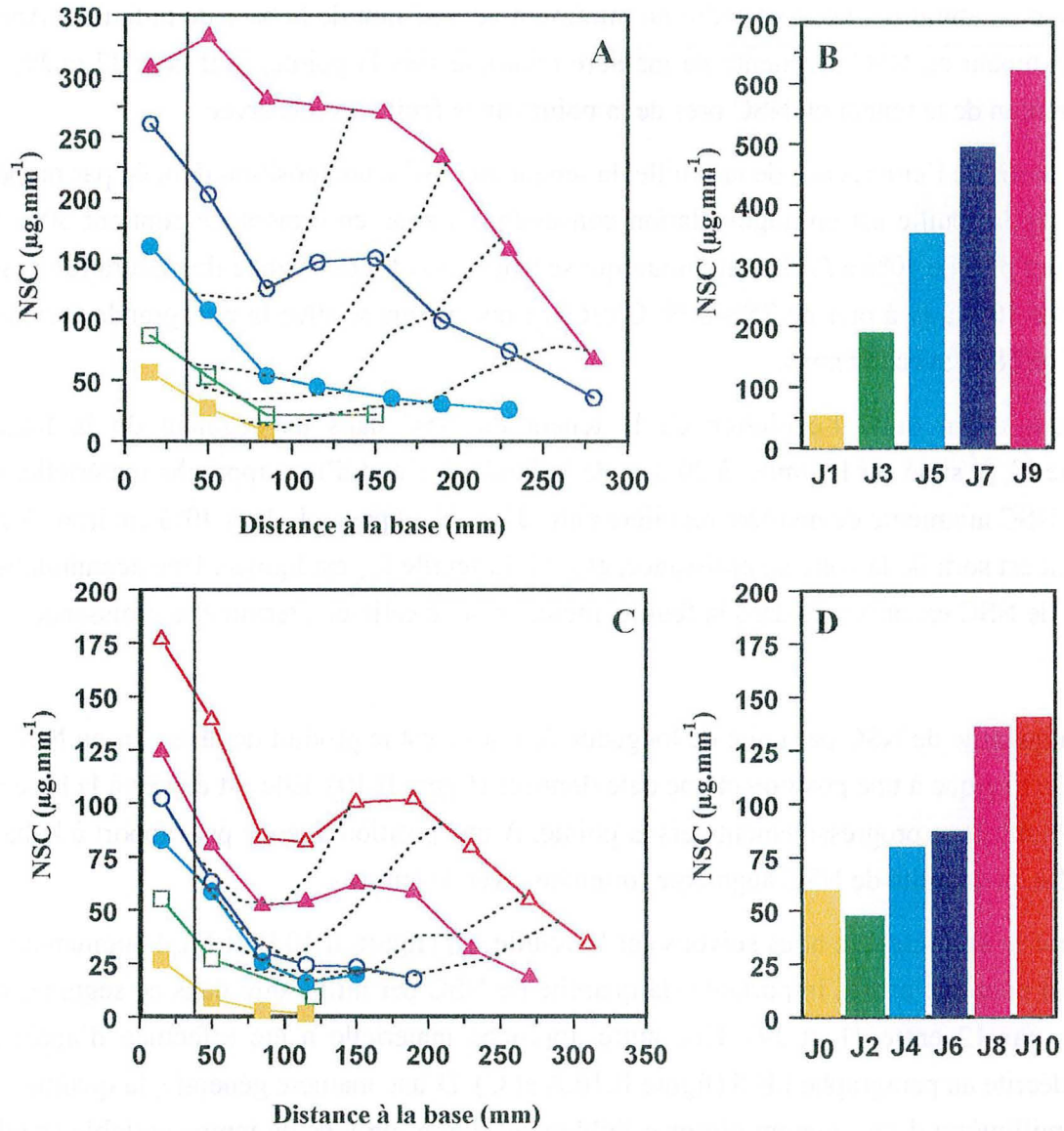
A partir de l'émergence de la feuille, la teneur en NSC à une position donnée par rapport à la base de la feuille est en augmentation constante. La zone en croissance contient 30% de NSC à J1, et plus de 40% à J9. Le minimum qui se trouve à la fin de la zone de maturation passe de moins de 10% à J1 à près de 25% à J9. C'est à ce niveau que se situe la plus grande variation de teneur en NSC avec le temps.

Nous avons suivi l'évolution de la teneur en NSC dans un segment de la feuille précédente (f_{n-1}), situé sur le limbe, à 20 mm de la ligule. Il s'agit d'une approche matérielle. La teneur en NSC augmente de manière régulière entre J1 et J9, et passe de 10 à 40% environ. A J1, ce segment est sorti de la zone de croissance, et à J5, la feuille f_{n-1} est ligulée. Une accumulation constante de NSC est observée dans la feuille, même lorsque celle-ci a terminé sa croissance.

La quantité de NSC par unité de longueur de feuille est le produit de la teneur en NSC et de la masse linéique à une position et une date données (figure II.10). Elle est élevée à la base de la feuille et diminue progressivement vers la pointe. A une position donnée par rapport à la base de la feuille, la quantité de NSC augmente fortement avec le temps.

Pour le segment que nous suivons sur la feuille f_{n-1} (figure II.10.B et D), l'augmentation de NSC est continue et très importante (la quantité de NSC par millimètre dans ce segment est multipliée par 12 entre J1 et J9). Une autre approche matérielle a été effectuée d'après la méthode décrite au paragraphe I.B.5 (figure II.10.A et C). D'une manière générale, la quantité de NSC par millimètre d'un segment diminue faiblement durant un laps de temps variable (tandis que le segment est déplacé loin de la base de la feuille), puis augmente de manière régulière par la suite, jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pour un segment situé à 70 mm de la base de la feuille à J1 (représenté par la ligne de déplacement la plus basse), le début de l'augmentation se produit alors que le segment se trouve aux alentours de 180 mm, à J5. De même, pour des segments situés à 40 mm de la base à J1, J3 et J5 respectivement, cette augmentation débute à partir de 130, 105 et 95 mm de la base respectivement. Il se produit donc une accumulation de NSC dans les segments, et ce à partir d'une position de plus en plus proche de la base de la feuille au cours du temps. La vitesse de déplacement des segments en dehors de la zone de

Figure II.10. Evolution de la quantité de NSC par millimètre le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I (A). A J0 (■), J2 (□), J4 (●), J6 (○) J8 (▲) et J10 (△) pour l'expérimentation II (C). Les barres verticales (B et D) représentent la quantité de NSC par millimètre d'un segment de la feuille f_{n-1} situé à 20 mm de la ligule pour l'expérimentation I et l'expérimentation II respectivement. Le trait vertical indique la fin de la zone de croissance longitudinale.



croissance (VAF) ne variant pas énormément entre J1 et J9, cela signifie que cette accumulation de NSC se produit de plus en plus tôt dans l'histoire d'un segment.

Cette accumulation nette peut résulter de deux phénomènes différents : soit une arrivée accrue, soit une utilisation plus faible de NSC, ou les deux. Une arrivée accrue, nécessairement liée à un déchargement plus important de saccharose venant du phloème (plus grande force de puits ou plus d'assimilats disponibles), peut être déterminée par l'augmentation de la surface de limbe exposée à la lumière, et l'augmentation consécutive de la photosynthèse du limbe. Une utilisation plus faible de NSC est probablement liée à une plus faible consommation de NSC pour la synthèse des parois secondaires et des chloroplastes, et la respiration associée (respiration cellulaire, synthèses de cellulose et hémicellulose déposées dans les parois secondaires). Il est néanmoins nécessaire de déterminer, pour les différents segments, le moment de l'arrêt de la synthèse des parois secondaires pour savoir si l'accumulation de NSC ne résulte pas également d'une diminution de la consommation de NSC.

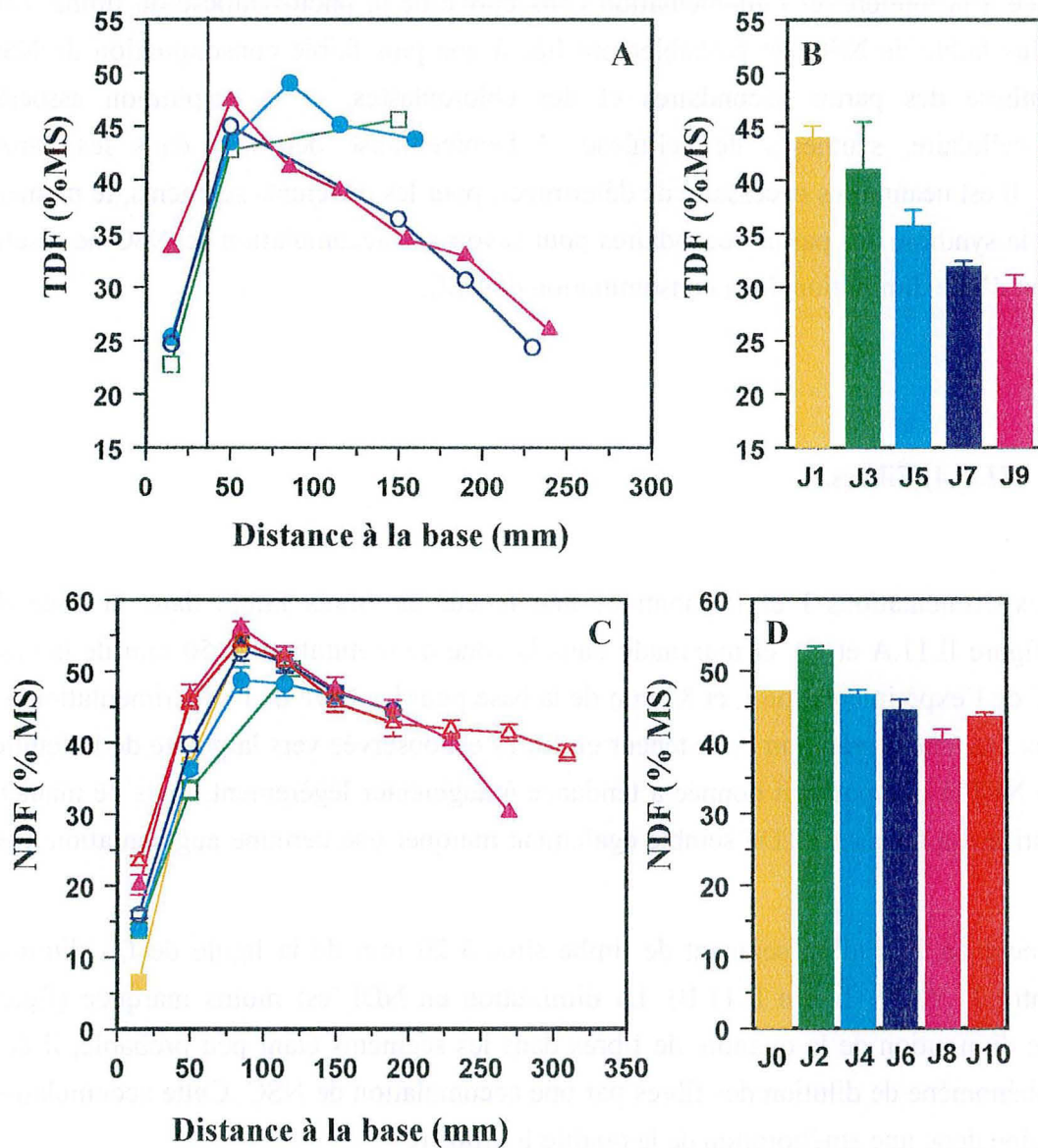
II.C.4) Fibres.

Les expérimentations I et II montrent une teneur en fibres faible dans la zone de croissance (figure II.11.A et C), et maximale dans la zone de maturation (à 50 mm de la base pour les TDF de l'expérimentation I, et 85 mm de la base pour les NDF de l'expérimentation II). Dans les deux cas, une diminution de la teneur en fibres est observée vers la pointe de la feuille. La teneur en NDF à une position donnée a tendance à augmenter légèrement, mais de manière non significative. La teneur en TDF semble également marquer une certaine augmentation avec le temps.

La teneur en TDF d'un segment de limbe situé à 20 mm de la ligule de f_{n-1} diminue fortement entre J1 et J9 (figure II.11.B). La diminution en NDF est moins marquée (figure II.11.D). Une diminution de la quantité de fibres dans les segments étant peu probable, il doit s'agir d'un phénomène de dilution des fibres par une accumulation de NSC. Cette accumulation de NSC entraîne donc une amélioration de la qualité fourragère.

La différence entre les valeurs moyennes de TDF (entre 40 et 50% dans la zone de maturation, par exemple) et de NDF (plus de 50% dans la même zone) n'est certainement pas due à la méthode de dosage des fibres. En effet, la méthode NDF, contrairement à la méthode TDF, solubilise les pectines, et donc ne les inclut pas dans le calcul des fibres. Nous devrions donc observer une valeur de TDF plus importante que celle de NDF. Dans notre cas, nous avons vu que la teneur en NSC est beaucoup plus importante dans l'expérimentation I (TDF) que dans

Figure II.11. Evolution de la teneur en fibres (TDF et NDF) le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I (A). A J0 (■), J2 (□), J4 (●), J6 (○) J8 (▲) et J10 (△) pour l'expérimentation II (C). Les barres verticales (B et D) représentent la teneur en fibres d'un segment situé à 20 mm de la ligule sur la feuille f_{n-1} . Le trait vertical indique la fin de la zone de croissance longitudinale. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne (n = 3).



l'expérimentation II (NDF). Il est donc vraisemblable que la faible teneur en TDF soit due à une «dilution» des fibres par les NSC.

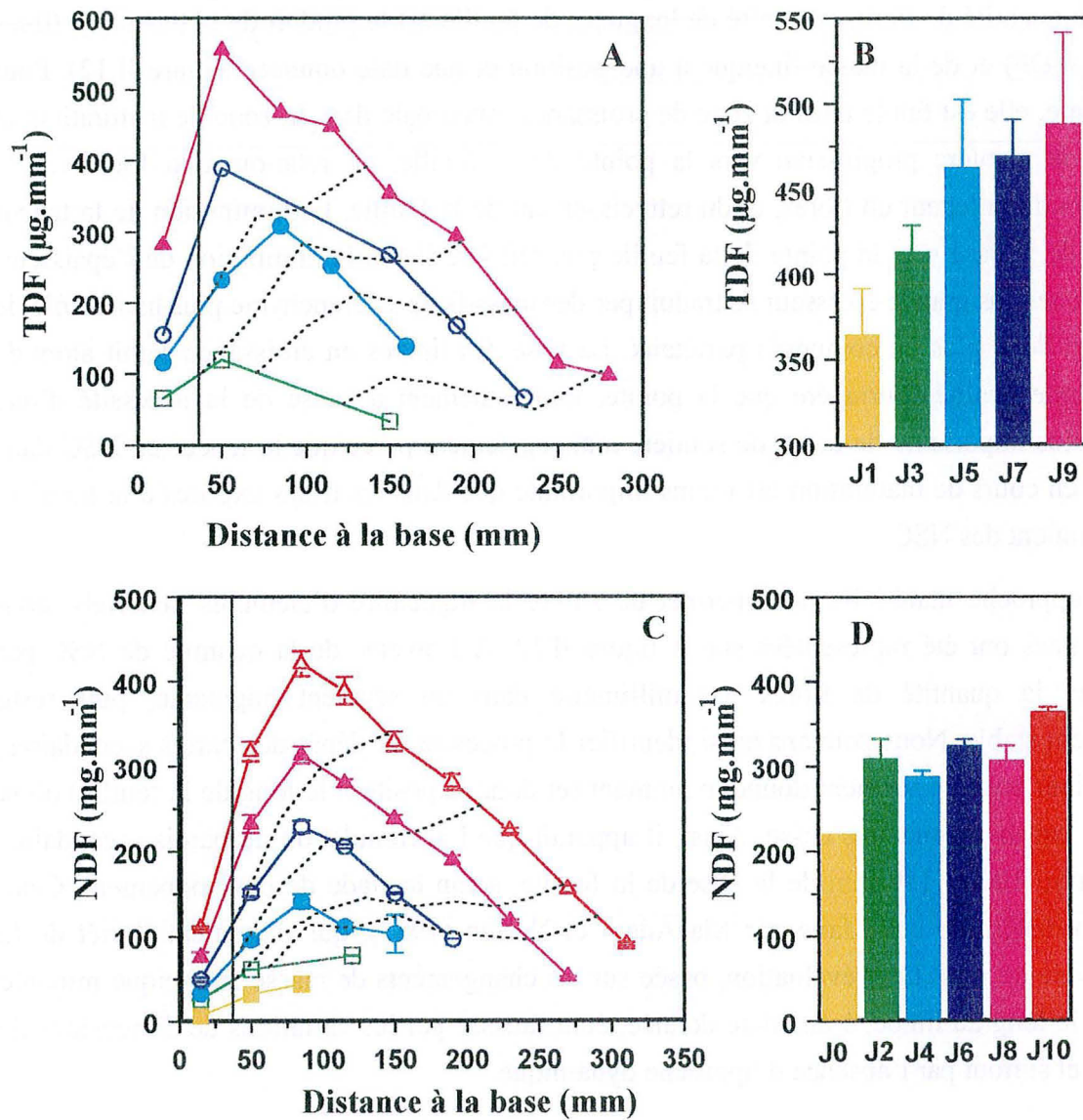
La quantité de fibres par unité de longueur de feuille est le produit de la teneur en fibres (NDF ou TDF) et de la masse linéique à une position et une date données (figure II.12). Pour chaque date, elle est faible dans la zone de croissance, maximale dans la zone de maturation, et diminue de manière progressive vers la pointe de la feuille, en relation à la fois avec la diminution de la teneur en fibres, et du rétrécissement de la feuille. La diminution de la teneur en fibres de la base vers la pointe de la feuille pourrait être liée à la diminution de l'épaisseur. En effet, une plus grande épaisseur se traduit par des massifs de sclérenchyme plus hauts (rôle de soutien) et donc plus de composés pariétaux. La base des limbes en croissance serait alors de moins bonne qualité fourragère que la pointe, non seulement à cause de la nécessité d'une quantité plus importante de tissus de soutien, mais également parce que la teneur en NSC dans les tissus en cours de maturation est moins importante que dans les tissus exposés à la lumière, qui accumulent des NSC.

L'approche matérielle nous permet de suivre la trajectoire d'éléments matériels, dont quelques unes ont été représentées sur la figure II.12. A l'inverse de la quantité de NSC par millimètre, la quantité de fibres par millimètre dans un segment augmente, puis reste relativement stable. Nous pouvons ainsi identifier le processus de dépôt des parois secondaires, et déterminer pour un segment donné le moment (et donc la position le long de la feuille) où le dépôt des parois secondaires cesse. Ainsi, il apparaît que l'accumulation de parois secondaires s'arrête entre 100 et 150 mm de la base de la feuille, selon le stade de développement. Cette évaluation diffère de celle faite par MacAdam et Nelson (1987), qui estimaient l'arrêt de la synthèse vers 80 mm. Leur évaluation, basée sur les changements de masse surfacique minorée des WSC le long du limbe, à une date donnée, était faussée par les variations de dimensions de la feuille, et surtout par l'absence d'approche dynamique.

Nous pouvons remarquer, pour les segments dont la trajectoire est représentée sur la figure II.12, que le dépôt des parois secondaires cesse au moment et à l'endroit précis où l'accumulation de NSC commence. Cette accumulation nette de NSC est donc la résultante de deux phénomènes simultanés : l'augmentation de l'activité de source du segment et de l'ensemble de la feuille (transition de puits à source de la feuille) ainsi que la diminution des besoins en sucres de ce segment, liée à la fin de la mise en place des parois secondaires.

Il est également intéressant de comparer l'augmentation de la quantité de fibres dans un segment particulier à la diminution de la quantité de NSC. En effet, prenons pour exemple un segment situé à 40 mm de la base de la feuille à J3 (pointillés sur les figures II.12.A et B). Si nous l'observons jusqu'à J5, il se trouve alors à 100 mm de la base, il a donc traversé l'ensemble de la zone de maturation, et est exposé à la lumière. Entre J3 et J5, la quantité de fibres TDF et

Figure II.12. Evolution de la quantité de fibres (TDF et NDF) par millimètre le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I (A). A J0 (■), J2 (□), J4 (●), J6 (○) J8 (▲) et J10 (△) pour l'expérimentation II (C). Le trait vertical indique la fin de la zone de croissance longitudinale.



NDF qu'il contient passe de 100 à 280 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ (+180%) et de 50 à 130 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ (+160%), respectivement. Par contre, durant le même laps de temps, la quantité de NSC qu'il contient passe de 64 à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ (-22%) et de 35 à 22 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ (-37%) respectivement. La diminution de NSC ne peut expliquer à elle seule l'augmentation de la quantité de fibres. La synthèse des parois secondaires s'effectue donc plus largement à partir de l'importation de NSC (vraisemblablement de saccharose) qu'à partir des NSC accumulés dans la zone d'élongation, ce qui confirme ainsi les résultats issus du marquage ^{14}C de Brégard (1996).

Conclusion

Les flux de matière dans la feuille en croissance varient au cours du temps :

- en réponse à la cinétique de mise en place de la feuille en terme de volume. Ainsi, le taux de dépôt de MS par unité de longueur, qui représente le flux net de MS dans les segments, augmente pour les éléments successifs (de plus en plus larges et épais) qui sont produits à la base de la feuille ;
- en fonction de l'équilibre trophique au niveau de la feuille. La transition de puits à source de la feuille en croissance influe sur la durée de mise en place des parois secondaires. En effet, si le taux de dépôt de MS par unité de volume, qui représente l'activité métabolique des segments, ne semble jamais limité, le taux de dépôt de MS par unité de volume est faible dans la zone de maturation quand la feuille émerge, mais augmente par la suite. Ainsi, les besoins liés à la mise en place des parois secondaires ne sont satisfaits que lorsqu'une surface de limbe suffisante est exposée à la lumière. Une fois la transition de puits à source de la feuille, les besoins en NSC pour la synthèse des parois secondaires dans les segments en cours de maturation sont de plus en plus rapidement satisfaits, malgré leur taille croissante.

Il semble donc y avoir une priorité de la zone de croissance sur la zone de maturation en ce qui concerne la satisfaction des besoins carbonés. Le chapitre suivant doit permettre de déterminer s'il existe ce type de priorité en termes d'azote.

CHAPITRE III.

FLUX D'AZOTE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA FEUILLE

L'objectif de ce chapitre est de préciser les zones d'incorporation de l'azote le long de la feuille en croissance, leur évolution dans le temps, et de relier ces résultats aux données déjà abordées concernant le fonctionnement de la feuille en croissance. Pour cela, nous allons appliquer les méthodes d'analyse des flux de matière, décrites dans le chapitre précédent, à l'azote. La connaissance précise des flux d'azote dans la feuille en croissance doit permettre de déterminer les mécanismes d'action de l'azote sur la croissance, et à terme, de sélectionner des génotypes dont l'utilisation de l'azote au niveau de la plante entière est optimale.

III.A) Analyse bibliographique.

III.A.1) L'azote dans la plante.

L'azote est un des principaux éléments minéraux de la plante. La plupart des plantes utilisent préférentiellement l'ion nitrate (NO_3^-) et, dans une moindre mesure, l'ammonium (NH_4^+), présents dans le sol. La réduction du nitrate en ammonium, précurseur des acides aminés, des protéines et des nucléotides, est un processus coûteux en énergie. Elle est essentiellement effectuée dans les tissus photosynthétiques (Bassham *et al.*, 1981 ; Meyer *et al.*, 1993). Selon les espèces, une partie plus ou moins importante de la réduction des nitrates peut cependant être effectuée dans les racines, en particulier dans les cellules épidermiques (Ruffy *et al.*, 1986). L'énergie est alors apportée sous forme de glucides des feuilles vers les racines (Andrews, 1986 ; Meyer *et al.*, 1993).

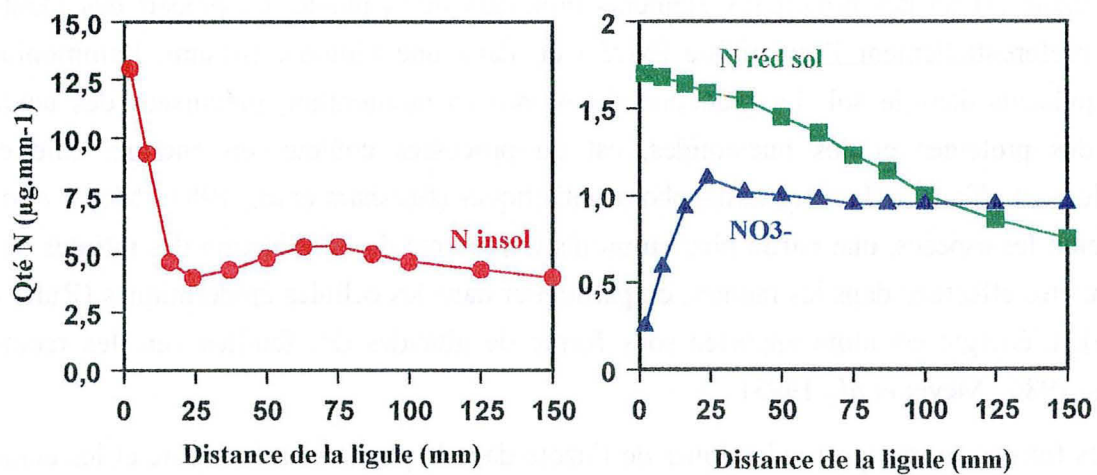
Les formes de transport xylémiques de l'azote dans la plante sont le nitrate et les acides aminés. Les acides aminés, dont certains sont synthétisés uniquement dans les feuilles, peuvent être transportés vers les racines *via* le phloème (Wallsgrave *et al.*, 1983). Ensuite, ils peuvent éventuellement être renvoyés vers les parties aériennes *via* le xylème. Il existe ainsi un pool d'azote circulant en permanence dans la plante (Cooper et Clarkson, 1989). Une partie du nitrate absorbé par la plante peut être accumulée dans les vacuoles, jusqu'à des concentrations cent fois supérieures à celles des sols après fertilisation (Naik *et al.*, 1982 ; Meyer *et al.*, 1993). Cela permet à la plante de constituer une réserve utilisable en cas de carence.

Tableau III.1. Paramètres cellulaires de la zone de croissance foliaire sous deux régimes de nutrition azotée (Volenc et Nelson, 1983).

*pas de différence significative ($P \leq 0.05$).

	VAF (mm.h ⁻¹)	Taille initiale des cellules (μm)	Taille finale des cellules (μm)	Taux d'élongation cellulaire ($\mu\text{m.h}^{-1}$)	Durée d'élongation (h)
N non limitant	0.64	14	111*	1.17	4.8*
N limitant	0.34	18	113*	0.96	3.6*

Figure III.1. Les différentes formes d'azote dans la feuille en croissance de fétuque élevée : (■) azote soluble sous forme réduite, (▲) azote nitrique, (●) azote sous forme insoluble (Gastal et Nelson, 1994).



L'azote possède un rôle central sur la croissance de la plante. Il influe sur la répartition de la croissance entre les parties aérienne et racinaire. Ainsi, une nutrition azotée non limitante favorise le développement de la surface foliaire et l'interception de la lumière (Gastal et Saugier, 1986) au détriment de la croissance racinaire (Song, 1992), alors que son action sur la capacité photosynthétique du couvert est faible (Gastal et Bélanger, 1993). La nature (hormonale, trophique...) de ce mécanisme n'est pas encore connue précisément.

Des études en conditions de nutrition azotée contrastées ont permis de déterminer les différents paramètres cellulaires de la feuille en croissance qui sont affectés par une carence (tableau III.1). Elles ont permis de montrer que l'azote n'affecte pas ou peu le taux d'élongation cellulaire, ni la durée d'élongation (la taille finale des cellules reste donc identique), mais il stimule la production de cellules au niveau du méristème foliaire, dont la taille est d'autant plus faible qu'elles se divisent rapidement (Volenc et Nelson, 1983 ; MacAdam *et al.*, 1989 ; Gastal et Nelson, 1994).

Une étude fine des flux d'azote au niveau des zones en croissance, en particulier la zone de croissance foliaire est nécessaire pour mieux définir le mode d'action de l'azote sur la croissance.

III.A.2) L'azote dans la feuille en croissance.

C'est à la base de la feuille que la teneur en azote est la plus importante, et cela se traduit également au niveau de la quantité d'azote, exprimée en milligrammes par millimètre (Gastal et Nelson, 1994). Cette dernière est élevée à la base de la feuille, diminue de manière marquée le long de la zone d'élongation, puis se stabilise voire augmente légèrement le long de la zone de maturation, pour enfin diminuer progressivement vers la pointe de la feuille, en relation avec la diminution de la largeur de la feuille (Gastal et Nelson, 1994). La teneur en azote des feuilles, et de la feuille en croissance en particulier est très dépendante du régime de nutrition azotée de la plante. Les teneurs en azote à la base de la feuille sont respectivement de 7.5 et 3% pour des feuilles non carencées et carencées en azote, tandis qu'à la fin de la zone d'élongation, elles sont respectivement de 3.5 et 1% (Gastal et Nelson, 1994).

Les protéines et les acides nucléiques (qui se retrouvent dans la fraction insoluble, lors d'une extraction à l'alcool) sont de loin la forme d'azote la plus abondante (figure III.1), en particulier à la base de la zone de croissance, où ils peuvent représenter jusqu'à la moitié de la MS (Gastal et Nelson, 1994). Ceci est à mettre en relation avec l'activité de division cellulaire située à la base de la zone de croissance, et les grands besoins en acides nucléiques et en polypeptides qui en résultent. Pour maintenir une concentration élevée de ces formes azotées

Figure III.2. (A) Microphotographie de cellules méristématiques d'une feuille en croissance de ray grass d'Italie (*Lolium multiflorum*, Lam.), arrangées de manière relativement dense, et contenant un cytoplasme riche en organelles juvéniles, en particulier de nombreux proplastides (Pp). La vacuolisation vient juste de commencer (flèches).

(B) Microphotographie de cellules du mésophylle dont la vacuole (V) est entièrement développée, repoussant le cytoplasme le long de la paroi cellulaire, et qui contiennent des plastides (P) caractéristiques de la région médiane exposée à la lumière de la feuille en croissance (Prioul *et al.*, 1980a).



dans une zone en croissance (où il y a dilution par entrée d'eau), un flux net (ou dépôt) important est nécessaire. Parmi les différentes formes d'azote, c'est la fraction insoluble qui se dépose le plus intensément. Le dépôt de protéines et d'acides nucléiques est important près de la base de la feuille, il diminue de manière marquée dans la zone d'élongation. Des dépôts faibles mais significatifs sont néanmoins observés à la fois dans la zone de maturation et dans les parties de la feuille exposées à la lumière. Ainsi, près de 70% de l'azote insoluble est incorporé dans les 30 premiers millimètres de la feuille, les 30% restant l'étant entre 30 et 110 mm de la base (Gastal et Nelson, 1994). Dans les tissus matures, une partie non négligeable des protéines se trouve dans les parois cellulaires, et représente environ 10% de l'azote total (Wilman *et al.*, 1977). Il s'agit principalement de glycoprotéines liées aux carbohydrates structuraux qui jouent un rôle dans l'expansion cellulaire (McQueen-Mason, 1995). Ces glycoprotéines ont pour appellation générale « extensines ». Chez les graminées, elles sont riches en thréonine et en hydroxyproline. Néanmoins, dans les tissus en croissance, il s'y trouve également une grande quantité d'enzymes (hydrolases, peroxydases...) impliquées dans le grandissement cellulaire (MacAdam *et al.*, 1992 ; Carpita, 1996).

Les acides aminés et les petits peptides (qui se retrouvent dans la fraction soluble, lors d'une extraction à l'alcool) sont nettement moins abondants que l'azote protéique, et suivent une diminution continue de la base à la pointe de la feuille. Leur dépôt net, sensiblement constant tout au long de la zone de croissance, est pratiquement nul plus loin de la base de la feuille.

L'azote nitrique ($N-NO_3^-$) est peu abondant dans la partie basale de la zone d'élongation. Il augmente de manière significative le long de la zone de croissance, et atteint 12% de l'azote total dans la partie distale de la feuille en croissance non carencée en azote (Gastal et Nelson, 1994). Le taux de dépôt de $N-NO_3^-$ est maximal là où le REGR est maximal, c'est à dire autour de 10 à 15 mm de la base de la feuille. Néanmoins, l'activité Nitrate Réductase n'est pas observée en dessous de 100 mm de la base de la feuille, ce qui implique que l'ensemble de l'azote utilisé dans ces segments est apporté sous forme réduite à partir des tissus matures (Gastal et Nelson, 1994). L'augmentation de la concentration en NO_3^- dans les tissus est concomitante à l'augmentation de la taille des cellules et de leur vacuoles (figure III.2), où les nitrates s'accumulent préférentiellement. Ainsi, les cellules de la base de la feuille, qui sont dans les premiers stades du développement, possèdent de petites vacuoles, ce qui limiterait l'accumulation de NO_3^- (Gastal et Nelson, 1994).

Les protéines chloroplastiques constituent une partie importante de l'azote présent dans un tissu mature. La Rubisco peut représenter jusqu'à 40% des protéines dans un tissu mature (Gastal et Nelson, 1994). Elle est peu abondante près de la base de la feuille, et sa synthèse rapide commence après la fin de la zone d'élongation (Dean et Leech, 1982 ; Gastal et Nelson, 1994). Cependant, la quantité de Rubisco et de chlorophylle par unité de surface est nettement inférieure à la pointe de la feuille en croissance par rapport à la pointe de la dernière feuille

totallement développée (Prioul *et al.*, 1980a). Deux phénomènes peuvent être avancés pour expliquer cette différence : le gradient de développement des cellules, qui existe le long de la feuille en croissance de graminées, ou encore la forte hétérogénéité des paramètres d'éclairement au niveau d'une feuille, et entre les différentes feuilles d'une talle. Il existe, en effet, une diminution naturelle de l'éclairement depuis la pointe jusqu'à la base de la feuille, liée au port particulier de la feuille de graminée, et aux gaines enroulées protégeant la feuille en croissance. Il faut noter cependant que les propriétés de type fibre optique des feuilles mises en évidence par Mandoli et Briggs (1984) permettent l'accès d'une certaine quantité de lumière à la base de la feuille en croissance (Vogelmann et Bjorn, 1986).

Prioul *et al.*, (1980b) ont montré que les composantes biochimiques de la capacité photosynthétique (chlorophylle, Rubisco) sont fortement réversibles et régulées par l'éclairement, contrairement à la géométrie de la feuille (épaisseur, structure du mésophylle...). Il résulte qu'il est délicat de comparer deux parties de feuille, voire deux feuilles différentes, du point de vue des caractéristiques biochimiques de la photosynthèse, en raison de ces interactions complexes entre milieu extérieur et paramètres « internes ».

III.A.3) Position du problème.

Le premier objectif de ce chapitre est de réévaluer l'évolution des flux d'azote le long de la feuille au cours des différentes phases de son développement. En effet, lors d'études précédentes, les variations de largeur ou d'épaisseur de la feuille, quand elles étaient non quantifiées, empêchaient l'analyse précise des données (Prioul *et al.*, 1980a ; Gastal et Nelson, 1994). Le calcul du taux de dépôt d'azote par unité de volume doit permettre de s'affranchir des variations de dimensions le long de la feuille, tout en intégrant les besoins liés à l'augmentation de largeur et d'épaisseur. De plus, les flux d'azote sont quantifiés à plusieurs stades de développement de la feuille. Il est donc possible de relier les flux observés aux différentes étapes du développement, comme par exemple les grandes phases de la synthèse protéique (mise en place des protéines photosynthétiques, fonctionnement de la feuille mature et début de la sénescence) observées par Hedley et Stoddart (1972).

Le deuxième objectif de cette étude est de tester l'hypothèse émise par Gastal et Nelson (1994) de recyclage interne de l'azote protéique au niveau de la zone de maturation, afin de satisfaire les besoins en acides aminés du processus de maturation. En effet, une grande partie des protéines photosynthétiques est mise en place avant que les tissus soient exposés à la lumière. Les tissus sont alors encore dépendants de parties de feuilles plus matures. Or, la plus grande partie (environ 70%) de l'azote incorporé dans un segment l'est dans la zone de

croissance (Gastal et Nelson, 1994). Il n'y a apparemment pas de dépôt d'azote protéique important, ni d'utilisation d'azote soluble dans la zone de croissance qui puissent être directement associés à la mise en place de l'appareil photosynthétique. Cela mène à l'hypothèse que les besoins en azote liés à la mise en place des protéines photosynthétiques sont sans doute satisfaits par un recyclage interne, à l'échelle des segments, de l'azote incorporé plus tôt, dans la zone de croissance. Nous avons donc effectué une expérimentation de marquage isotopique de l'azote de la solution nutritive pour déterminer les zones d'utilisation préférentielles de l'azote nouvellement incorporé, et pour déterminer si les segments se trouvant dans la zone de maturation au moment où la solution nutritive est marquée incorporent ou non de l'azote provenant de la solution marquée.

III.B) Matériel et méthodes.

Les résultats présentés dans ce chapitre proviennent de trois expérimentations différentes. Il s'agit, pour les deux premières, des expérimentations I et II décrites dans les chapitres précédents (voir les paragraphes I.B et II.B). La troisième est appelée expérimentation III. Il s'agit d'une répétition de l'expérimentation I, hormis le fait que les prélèvements ne sont effectués que sur une période de 4 jours au lieu de 8 jours pour l'expérimentation I. Dans l'expérimentation III, un marqueur isotopique de l'azote (^{15}N) a été utilisé pour distinguer, dans un segment, l'azote nouvellement assimilé de l'azote anciennement présent (Handley et Raven, 1992).

III.B.1) Expérimentation I.

La composition en carbone et azote du matériel végétal, obtenu selon le protocole de culture et de prélèvement décrit au paragraphe I.B.2, est déterminée par analyse élémentaire (Carlo Erba modèle CN 1500, Milan, Italy, Annexe V).

La teneur en azote de la MS est combinée aux résultats concernant la quantité de MS et les dimensions des segments pour donner l'évolution de la quantité d'azote volumique le long de la feuille en croissance au cours de son développement. Les trajectoires d'éléments matériels déterminés au paragraphe I.B.5 ont été combinées aux profils des quantités d'azote le long de la feuille pour suivre l'évolution du contenu en azote de différents segments. Les taux de dépôt

d'azote par unité de longueur et par unité de volume sont calculés à partir des équations (II.3) et (II.7).

III.B.2) Expérimentation II.

La teneur en fibres du matériel végétal, obtenu selon le protocole de culture et de prélèvement décrit au paragraphe II.B.1, est déterminée par la méthode NDF (paragraphe II.B.4). La teneur en azote des fibres est déterminée sur le résidu par analyse élémentaire (Carlo Erba modèle CN 1500, Milan, Italy, Annexe V). Le résultat est exprimé dans un premier temps par rapport à la MS totale, puis par rapport à la quantité de fibres.

III.B.3) Expérimentation III.

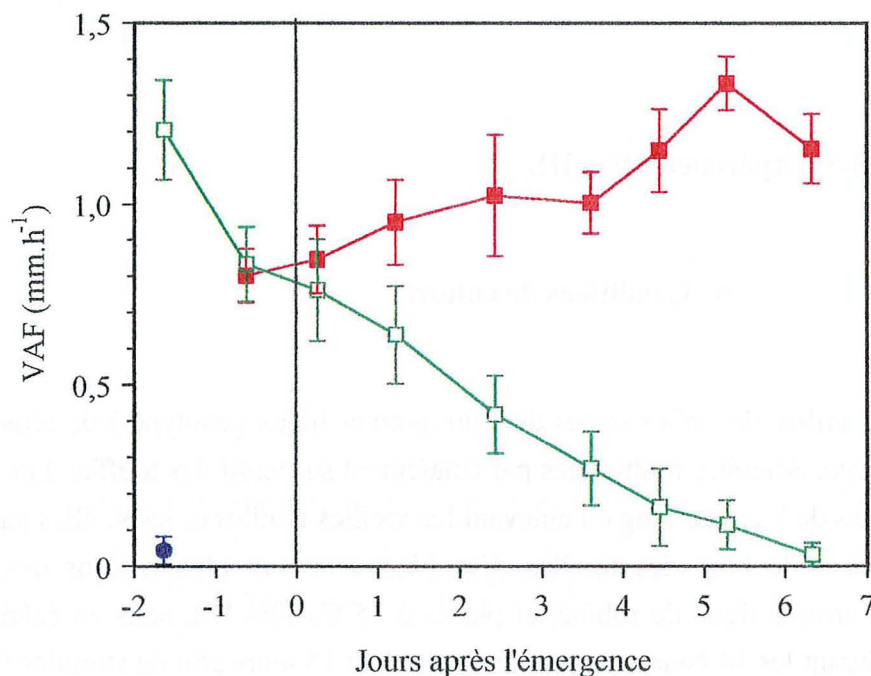
- **Conditions de culture.**

Nous avons utilisé des talles issues de deux graines (deux génotypes) de fétuque élevée (*Festuca arundinacea*, Schreb.), multipliées par éclatement successif des touffes. Les talles sont réduites en bâtonnets de 7 cm de long en enlevant les vieilles feuilles et les vieilles gaines, et en coupant les racines et le bout des feuilles. Ces bâtonnets sont plantés dans des coupelles remplies de sable, arrosés d'eau du robinet et placés à 15°C, 80% HR, sous un éclaircissement de 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durant les 14 heures de jour et ce pendant 18 jours afin de stimuler l'apparition de nouvelles racines.

Les plantes sont ensuite mises sur une sorte de tamis qui permet aux racines de plonger dans une solution nutritive tout en étant protégées de la lumière. La solution contient 7,5 mM.l⁻¹ de NO₃⁻, et est identique à celle utilisée pour l'expérimentation I. Elle est d'abord appliquée diluée au quart, puis progressivement concentrée. Les conditions de culture sont modifiées peu à peu pour arriver à 20°C, 80% HR, et jour continu (la transition dure 3 jours). Les plantes sont groupées par 15 dans des bacs de 60 litres (60 x 40 x 32 cm) en polyéthylène. La solution est changée tous les 12 jours au départ, puis toutes les semaines.

Après trois semaines de culture sur la solution non marquée, nous avons sélectionné des plantes à prélever ayant une feuille en croissance de même taille et en train d'émerger des gaines précédentes. Par analogie avec l'expérimentation I, le jour où 50% des feuilles en croissance

Figure III.3. Evolution de la vitesse d'allongement des feuilles successives lors de l'expérimentation III. f_n (■) est la feuille qui émerge à J0, f_{n-1} (□) et f_{n-2} (●) sont les deux feuilles précédentes. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne (n = 12).



sélectionnées ont émergé est appelé jour 0 (J0). Le jour 3, quand la feuille en croissance mesurait 158 ± 18 millimètres de long, la solution nutritive des bacs de culture est remplacée par une solution nutritive enrichie à 1% de ^{15}N .

- **Mesures.**

La vitesse d'allongement des feuilles est mesurée chaque jour sur 12 talles (figure III.3). Elle est comparable aux résultats de l'expérimentation I (figure I.21). Des capteurs d'élongation ont permis de vérifier que la croissance était stable dans le temps.

A J4, des empreintes de cellules épidermiques ont été réalisées le long de la zone de croissance, sur 15 talles. Une fine pellicule de solution de Formvar (1g pour 25 ml de chloroforme) est appliquée au pinceau le long de la zone en croissance, puis récupérée, une fois sèche, sur du ruban adhésif et collée sur une lame de verre. Ces empreintes épidermiques sont ensuite observées au microscope (Olympus BH2) et la longueur des cellules est mesurée, à différentes positions par rapport à la base de la feuille, à l'aide d'une table à digitaliser (Calcomp) couplée à un micro-ordinateur (20 cellules mesurées par position et par lame).

La vitesse de déplacement des éléments de feuille est calculée d'après la théorie développée par Gandar et coll. (Gandar et Hall, 1988 ; Gandar et Chalabi, 1989 ; Gandar et Rasmussen, 1991). Dans la zone d'élongation seule d'un organe en croissance longitudinale (zone de croissance en longueur où il n'y a pas de division cellulaire : Green, 1976), si $c(x)$, la densité de cellules à la position x est constante dans le temps, alors le nombre de cellules passant à la position x par unité de temps (autrement dit, le flux de cellules) est égal au flux de cellules sortant de la zone de croissance durant ce même temps :

$$c(x) v(x,t) = c(l_{zc}) v(t;l_{zc}) \quad (\text{III.1})$$

où $v(x,t)$ est la vitesse de déplacement à la position x , au temps t , l_{zc} est la position de la fin de la zone de croissance et $v(t;l_{zc})$ correspond à la vitesse de déplacement à la fin de la zone de croissance, c'est à dire à la VAF.

D'où

$$v(x,t) = \frac{c(l_{zc})}{c(x)} v(t;l_{zc}) \quad (\text{III.2})$$

Le REGR est déterminé jour par jour à chaque position de la manière suivante :

$$REGR(x,t) = \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right), \quad (\text{III.3})$$

Figure III.4. Déroulement de l'expérimentation III.

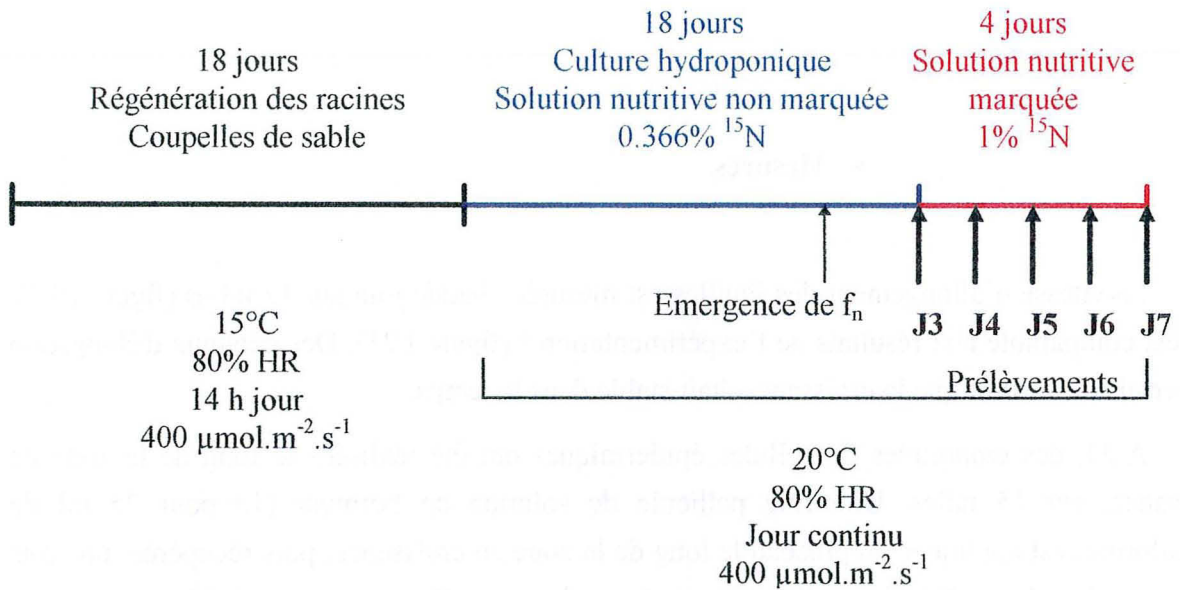
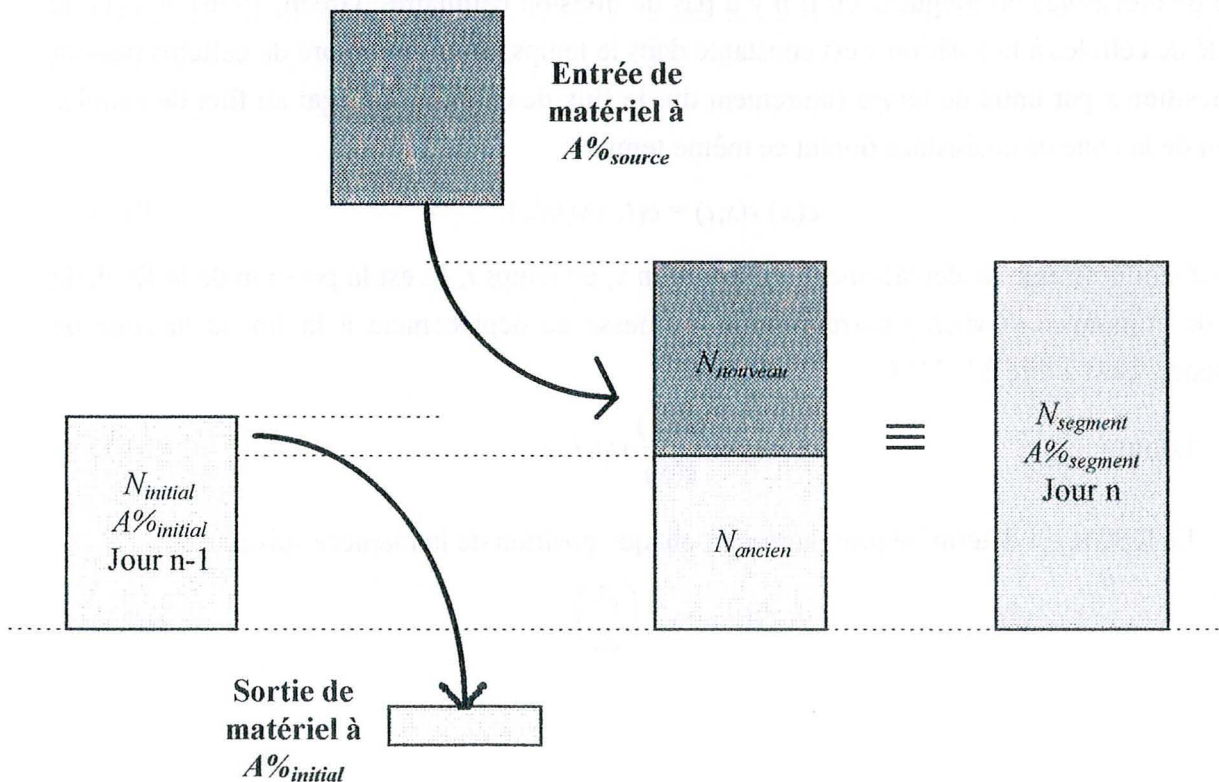


Figure III.5. Suivi du stock d'azote dans un segment d'un jour à l'autre. $A\%_{\text{initial}}$ et $A\%_{\text{segment}}$ sont les valeurs mesurées de la teneur en ^{15}N des échantillons aux jours $n-1$ et n respectivement. N_{initial} et N_{segment} sont les valeurs mesurées de la quantité d'azote présente dans le segment aux jours $n-1$ et n respectivement. La valeur de $A\%_{\text{source}}$ provient de l'estimation de la composition isotopique de l'azote circulant. Elle varie journalièrement. Ces valeurs permettent, à l'aide des équations (III.6) et (III.7), de calculer les quantités N_{ancien} et N_{nouveau} .



Les données d'allongement foliaire combinées aux données de distribution longitudinale de la croissance ont permis de déterminer la trajectoire de différents éléments matériels (voir paragraphe I.B.5).

- **Prélèvements.**

Cinq prélèvements sont effectués, à J3 (juste avant l'enrichissement de la solution nutritive), à J4, J5, J6 et J7 (figure III.4). A chaque prélèvement, 12 feuilles en croissance sont découpées, à partir de la base de la feuille, en 18 segments de 5 mm, 2 segments de 10 mm, et le reste du limbe est conservé en entier.

Les échantillons sont séchés à l'étuve pendant au moins 48 heures (70°C), puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. Les plus gros échantillons sont broyés dans un broyeur à bille. L'ensemble des échantillons est analysé à l'aide d'un spectromètre de masse (Roboprep TCD-Tracermass ; Europa Scientific, Crewe, UK) à l'Institut für Pflanzenbau de Bonn (Allemagne) pour déterminer la teneur en azote et la composition isotopique de chacun. Le principe de séparation des isotopes est détaillé en Annexe VI. L'abondance naturelle du matériel végétal (0,36609%) a été déterminée à partir des mesures effectuées à J3, avant que la solution nutritive ne soit marquée.

La composition isotopique d'un échantillon est exprimée par le pourcentage A%, qui représente la proportion d'atomes de ^{15}N parmi la population totale d'atomes d'azote :

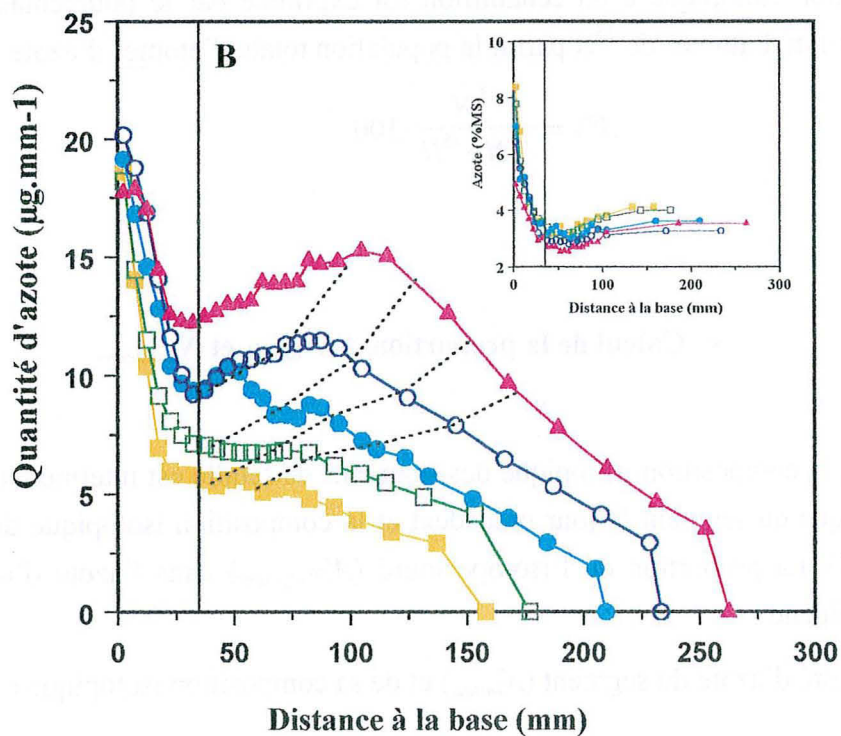
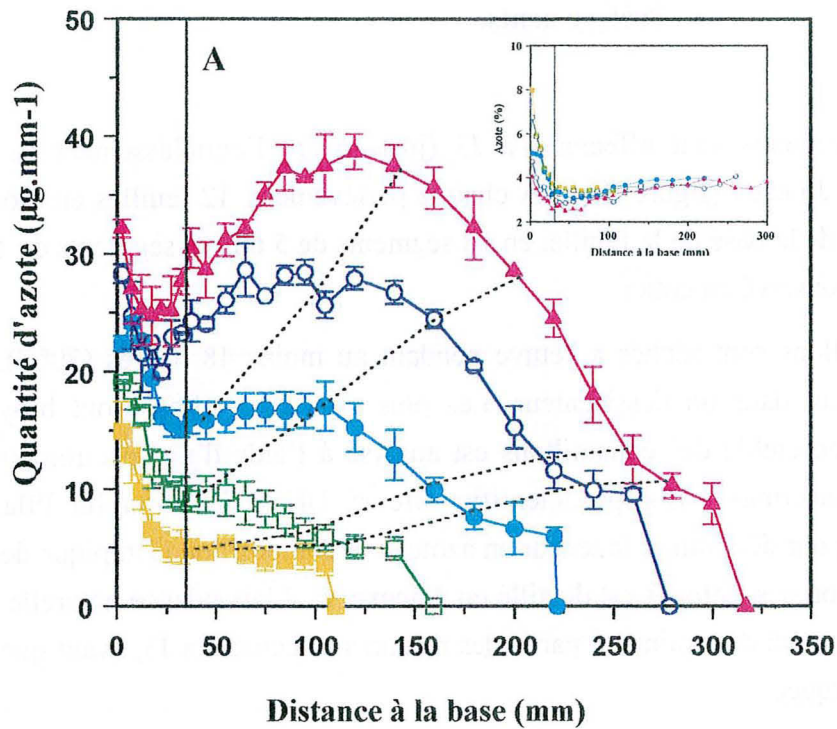
$$A\% = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}} \cdot 100 \quad (\text{III.4})$$

- **Calcul de la proportion de N_{ancien} et N_{nouveau}**

Chaque jour, la composition isotopique des segments de feuille est intermédiaire entre la composition isotopique du segment le jour précédent et la composition isotopique de la source d'azote (figure III.5). La proportion de l'isotope lourd ($A\%_{\text{segment}}$) dans l'azote d'un segment (N_{segment}) au jour n dépend :

- de la quantité d'azote du segment (N_{initial}) et de sa composition isotopique ($A\%_{\text{initial}}$) au jour n-1,

Figure III.6. Quantité d'azote par unité de longueur (azote linéique) le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérience I (A) et à J3 (■), J4 (□), J5 (●), J6 (○) et J7 (▲) pour l'expérience III (B). Les pointillés représentent les caractéristiques successives de différents éléments matériels, déduites des trajectoires et des profils d'azote linéique le long de la feuille en croissance. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne (n = 3).



- de la quantité d'azote incorporé ($N_{nouveau}$) à partir de la source d'azote entre le jour n-1 et le jour n,
- de la composition isotopique de la source ($A\%_{source}$).

Ainsi, la quantité de ^{15}N dans un segment peut s'exprimer comme suit :

$$A\%_{segment} \cdot N_{segment} = N_{ancien} \cdot A\%_{initial} + N_{nouveau} \cdot A\%_{source} \quad (\text{III.5})$$

avec $N_{ancien} + N_{nouveau} = N_{segment}$

D'où la possibilité de calculer l'évolution d'un jour à l'autre du stock d'azote présent dans un segment, quelle que soit sa position et la date considérée :

$$N_{nouveau} = \frac{A\%_{segment} - A\%_{initial}}{A\%_{source} - A\%_{initial}} \cdot QN_{segment} \quad (\text{III.6})$$

et $N_{ancien} = QN_{segment} - N_{nouveau} \quad (\text{III.7})$

La comparaison de N_{ancien} avec $N_{initial}$ donne l'évolution du stock d'azote d'un segment entre deux dates. En effet, si N_{ancien} est plus faible que $N_{initial}$ alors cela signifie qu'une partie de l'azote présent dans le segment au jour n-1 (NO_3^- , acides aminés, protéines) a été remobilisée et exportée.

III.C) Résultats et discussion.

III.C.1) Evolution des quantités d'azote le long de la feuille en croissance.

La teneur en azote (inserts sur les figures III.6.A et B) et la masse linéique de l'expérimentation III (donnée non présentée) sont légèrement inférieures à celles de l'expérimentation I à date équivalente. Par conséquent, la quantité d'azote par unité de longueur de feuille est plus faible pour l'expérimentation III que pour l'expérimentation I (N_{lin} , figures III.6.A et B). Il pourrait s'agir d'une différence de largeur et d'épaisseur de feuille. Les valeurs observées sont un peu supérieures aux valeurs rapportées par Gastal et Nelson (1994), notamment pour l'expérimentation I. Dans les deux expérimentations, des variations semblables sont observées à la fois le long de la feuille et au cours du temps. L'azote linéique est élevé à la

Figure III.7. Evolution de la quantité d'azote par unité de longueur dans un segment de limbe de la feuille f_{n-1} situé à 20 mm de la ligule à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) (Expérimentation I). La feuille f_{n-1} est ligulée à partir de J5 (fig. I.11). Le segment considéré se trouvait à 50 et 75 mm de la base de la feuille à J1 et J3 respectivement, donc hors de la zone de croissance.

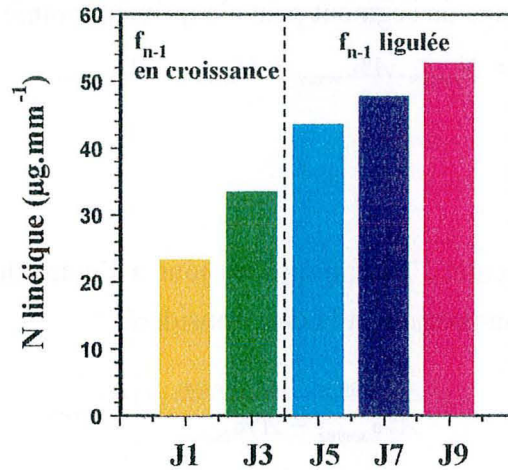
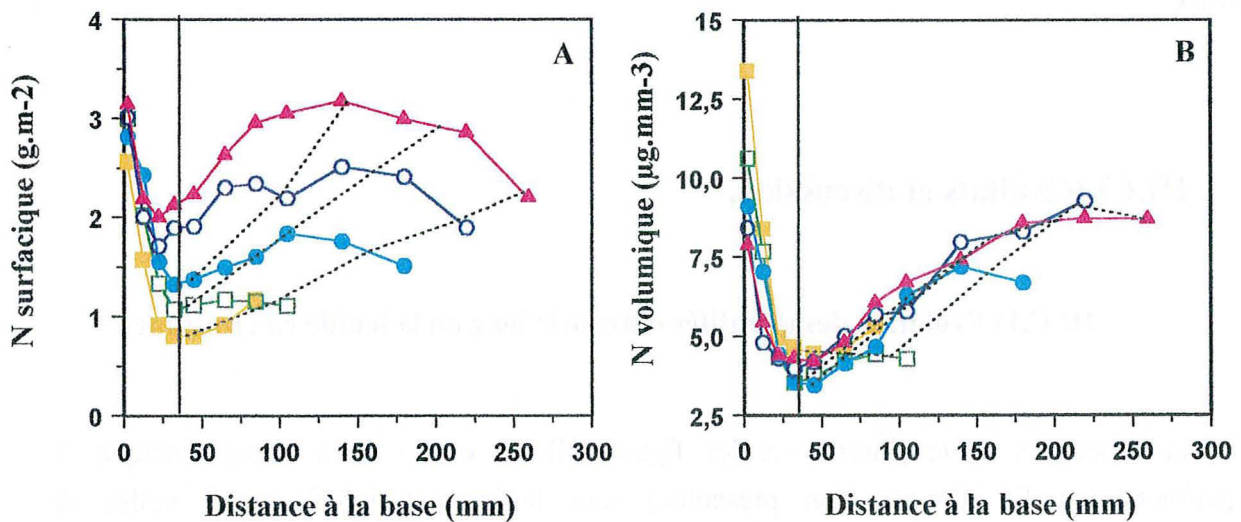


Figure III.8. (A) Quantité d'azote par unité de surface foliaire (azote surfacique) et (B) quantité d'azote par unité de volume foliaire (azote volumique) le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I.



base de la feuille (entre 15 et 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ pour l'expérimentation I, et autour de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ pour l'expérimentation III), diminue le long de la zone de croissance, puis marque soit un plateau soit une augmentation dans la zone de maturation, pour diminuer progressivement vers la pointe de la feuille. Quelle que soit la position par rapport à la base de la feuille, l'azote linéique des segments qui passent successivement à cette position augmente au cours du temps. Cela provient notamment de leur augmentation de largeur et d'épaisseur.

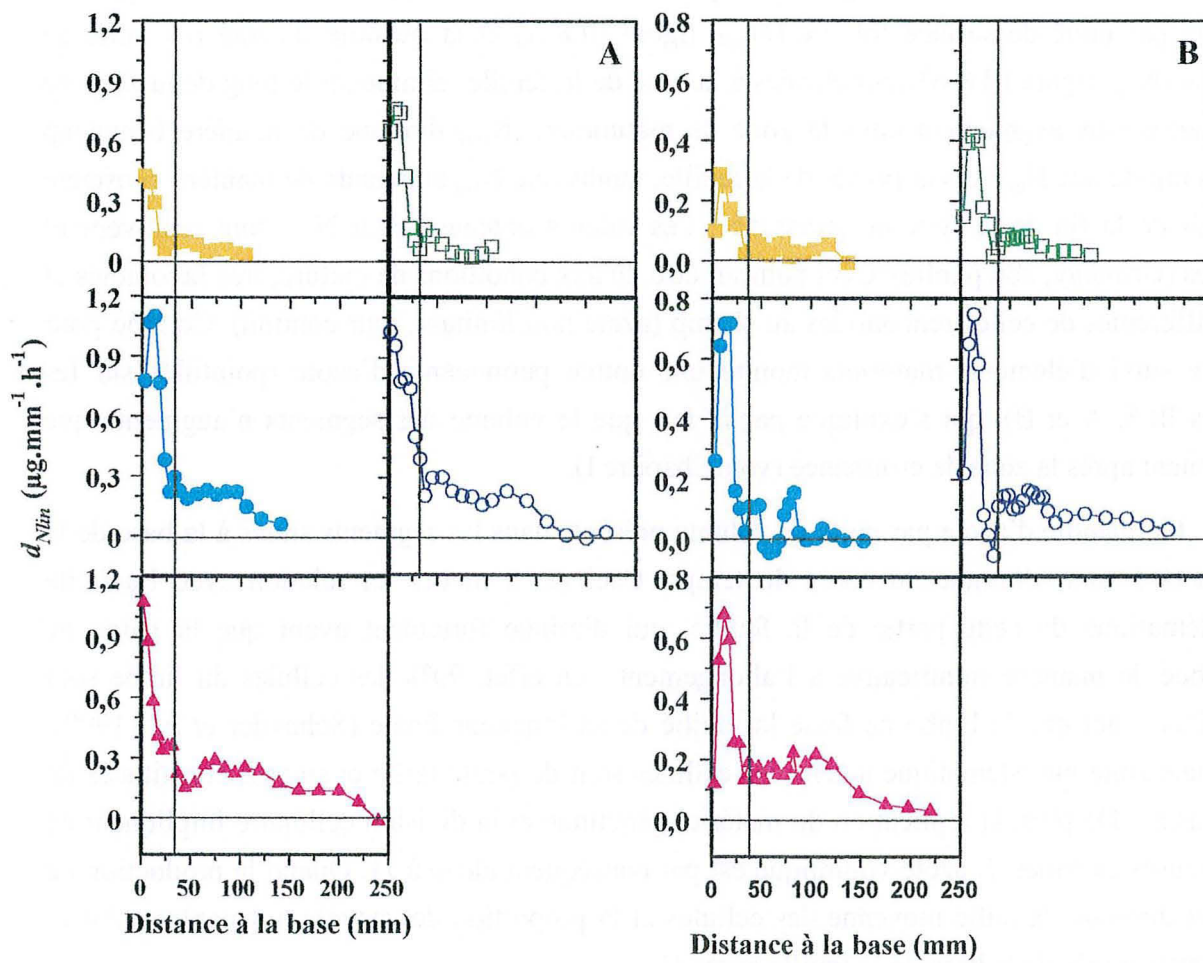
D'un point de vue dynamique, le suivi d'éléments matériels au cours du temps montre une forte augmentation de la quantité d'azote contenue dans les segments lorsqu'ils traversent la zone de maturation (30-35 mm à environ 100 mm de la base de la feuille) mais aussi lorsqu'ils sont exposés à la lumière (pointillés sur les figures III.6.A et B). Le suivi d'un segment situé à 20 mm de la base de la feuille f_{n-1} indique que cette accumulation d'azote se poursuit, avec un rythme moins important, même après l'arrêt de la croissance en longueur de la feuille (figure III.7).

Les données relatives aux variations de dimensions de la feuille permettent de s'affranchir des variations de largeur et d'épaisseur de la feuille. Ainsi, comme N_{lin} , la quantité d'azote par unité de surface foliaire (N_{surf} , figure III.8.A) et la quantité d'azote par unité de volume (N_{vol} , figure III.8.B) sont élevées à la base de la feuille, diminuent le long de la zone de croissance puis augmentent dans la zone de maturation. N_{surf} diminue de manière beaucoup moins rapide que N_{lin} vers la pointe de la feuille, tandis que N_{vol} augmente de manière constante à partir de la fin de la zone de croissance. Les valeurs obtenues pour N_{surf} sont relativement élevées (Grindlay, non publié). Ceci pourrait être dû aux conditions de culture, très favorables et très différentes de celles rencontrées au champ (azote non limitant, jour continu). Comme pour N_{lin} , le suivi d'éléments matériels montre une entrée permanente d'azote (pointillés sur les figures III.8. A et B), qui s'explique par le fait que le volume des segments n'augmente que faiblement après la zone de croissance (voir Chapitre I).

La quantité d'azote par unité de volume présente dans les segments situés à la base de la feuille (0-5 mm) diminue au cours du temps. Ceci est à mettre en relation avec l'activité méristématique de cette partie de la feuille, qui diminue fortement avant que la gaine ne contribue de manière significative à l'allongement : en effet, 90% des cellules du limbe sont produites avant que le limbe ne fasse la moitié de sa longueur finale (Schnyder *et al.*, 1990). Dans une zone méristématique active, les cellules sont de petite taille et surtout constituées de cytoplasme. De plus, la réplication du matériel génétique et la division cellulaire impliquent de nombreuses enzymes. L'azote volumique est par conséquent élevé à J1. Quand la production de cellules diminue, la taille moyenne des cellules et la proportion de vacuole augmentent. Ainsi, N_{vol} diminue près de la base de la feuille après J1.

Dans la zone de croissance en longueur, la prise en compte de l'augmentation simultanée de largeur et d'épaisseur accentue la diminution de l'azote dans les segments avec la distance,

Figure III.9. Dépôt d'azote par unité de longueur (d_{Nlin}) le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I (A) et à J3 (■), J4 (□), J5 (●), J6 (○) et J7 (▲) pour l'expérimentation III (B).



comme cela était le cas pour MV. La valeur minimale de N_{surf} et N_{vol} est observée à la fin de la zone d'élongation, c'est à dire à environ 35 mm de la base de la feuille. Cette valeur minimale augmente au cours du temps de manière beaucoup plus marquée pour N_{surf} que pour N_{vol} . L'augmentation de N_{surf} observée au cours du temps à la fin de la zone d'élongation est donc essentiellement liée à une augmentation d'épaisseur des segments. Dans la zone de maturation, la quantité d'azote volumique augmente. En effet, la valeur de N_{vol} pour un segment sortant de la zone de croissance à J9 correspond à la moitié de la valeur de N_{vol} pour un segment situé plus près de la pointe de la feuille et déjà exposé à la lumière. Il y a donc une entrée importante d'azote dans les segments situés dans la zone de maturation.

La prise en compte des variations de largeur et d'épaisseur le long de la feuille permet de mettre en évidence des variations de densité importantes le long de la feuille, qui se maintiennent au cours du développement.

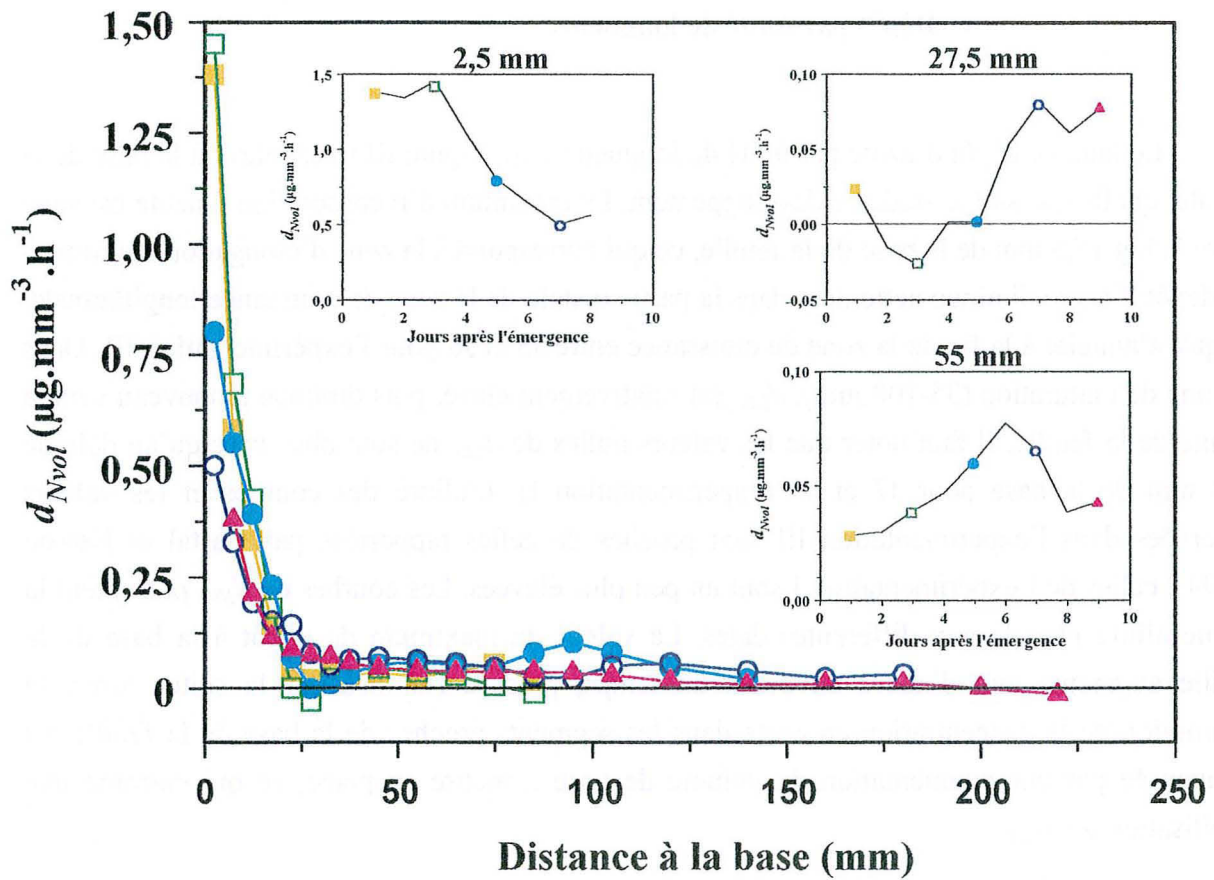
III.C.2) Dépôt d'azote.

- **Dépôt par unité de longueur.**

Le taux de dépôt d'azote par unité de longueur (d_{Nlin} , figure III.9) est élevé à la base de la feuille, quelle que soit le stade de développement. Le maximum d'incorporation d'azote est situé entre 7,5 et 17,5 mm de la base de la feuille, ce qui correspond à la zone d'élongation maximale. Le dépôt d'azote diminue nettement dans la partie distale de la zone de croissance longitudinale, jusqu'à s'annuler à la fin de la zone de croissance entre J3 et J6 pour l'expérimentation III. Dans la zone de maturation (35-100 mm), d_{Nlin} est relativement élevé, puis diminue à nouveau vers la pointe de la feuille. Il faut noter que les valeurs nulles de d_{Nlin} ne sont observées qu'au delà de 180 mm de la base pour J7 et J9 (expérimentation I). L'allure des courbes et les valeurs observées dans l'expérimentation III sont proches de celles rapportées par Gastal et Nelson (1994), celles de l'expérimentation I sont un peu plus élevées. Les courbes de d_{Nlin} présentent la même allure globale aux différentes dates. La valeur du maximum de dépôt à la base de la feuille augmente tout d'abord au cours du temps, puis se stabilise par la suite. Ainsi, la diminution de la concentration en azote dans les segments proches de la base de la feuille est compensée par une augmentation du volume de tissu à mettre en place, ce qui entraîne une stabilisation de d_{Nlin} .

Le taux de dépôt d'azote par unité de longueur représente le flux net d'azote dans les segments. d_{Nlin} est donc en partie déterminé par l'augmentation au cours du temps du volume des

Figure III.10. Dépôt d'azote par unité de volume (d_{Nvol}) le long de la feuille en croissance à J1 (■), J3 (□), J5 (●), J7 (○) et J9 (▲) pour l'expérimentation I.



segments à une même distance de la base (voir chapitre II). Comme cela avait été montré auparavant (Gastal et Nelson, 1994), la zone de croissance est un puits important pour l'azote, tandis que le dépôt dans la zone de maturation est nettement plus faible que dans la zone de croissance. Néanmoins, comme cela a été mentionné dans le chapitre II, la comparaison des taux de dépôt dans la zone de croissance et la zone de maturation est délicate, car la majeure partie du flux net dans la zone de croissance est liée au terme d'étirement. Ainsi, il y a un dépôt net d'azote très important à la base de la feuille, mais l'entrée d'eau liée à la croissance est telle qu'il se produit tout de même une diminution de la concentration en azote le long de la zone de croissance. Par contre, en l'absence de croissance, le dépôt net d'azote dans la zone de maturation conduit à une augmentation de la quantité d'azote par millimètre. Cette accumulation est beaucoup plus importante que ne l'avaient estimé Gastal et Nelson (1994). La différence entre les deux évaluations provient du fait que le terme temporel $\frac{\partial p}{\partial t}$ avait été négligé auparavant.

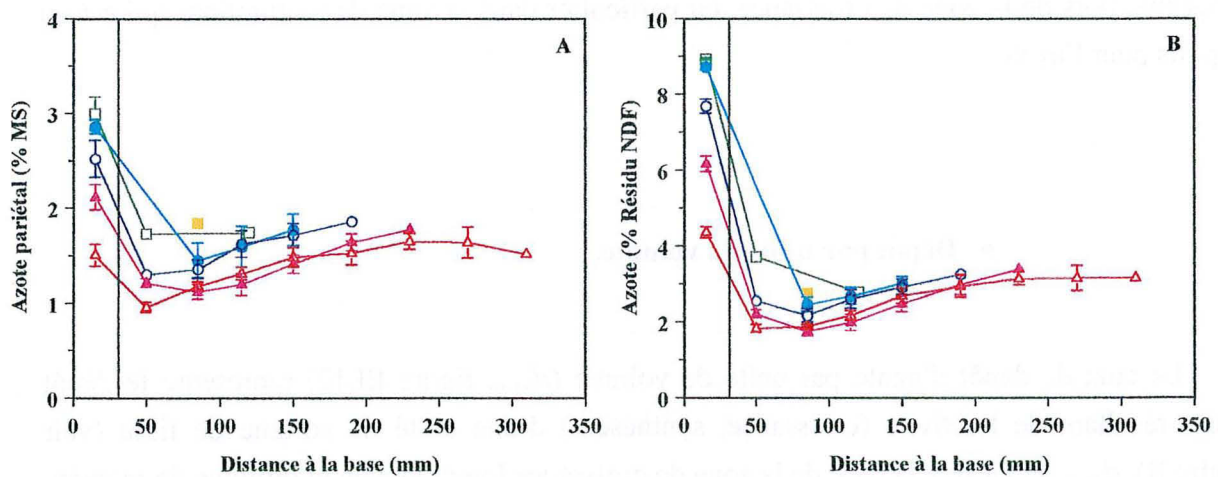
Le calcul du dépôt d'azote par unité de longueur montre donc que l'incorporation d'azote subit de fortes variations au cours du développement de la feuille, et qu'elle est loin d'être négligeable hors de la zone de croissance, en particulier dans la zone de maturation, qui est un fort puits pour l'azote.

- **Dépôt par unité de volume.**

Le taux de dépôt d'azote par unité de volume (d_{Nvol} , figure III.10) représente le dépôt d'azote résultant de l'activité (croissance, synthèse...) d'une unité de volume de tissu (voir chapitre II). d_{Nvol} est élevé à la base de la zone de croissance longitudinale et diminue de manière très marquée le long de la zone de croissance. A la fin de la zone de croissance en longueur, d_{Nvol} est très faible voire légèrement négatif, puis augmente à nouveau dans la zone de maturation, et diminue enfin vers la pointe de la feuille. Le dépôt après la zone de croissance est nettement moins important qu'à la base de la feuille, mais il n'est pas nul (sauf près de la pointe à J3 et J9).

Une diminution très nette de d_{Nvol} à la base de la feuille se produit entre J3 et J9 (insert 2.5 mm sur la figure III.10). Entre J3 et J7, cette diminution ne peut être attribuée à la diminution des taux relatifs d'élongation. En effet, le REGR entre 0 et 10 mm de la base de la feuille ne change pratiquement pas entre J1 et J7. De même, r_e ne diminue de manière importante qu'à partir de J5, tandis que la diminution de r_e observée à partir de J3 ne suffit pas à expliquer la diminution du dépôt d'azote par unité de volume. La diminution de d_{Nvol} est donc déterminée par la diminution de l'activité méristématique de la zone de division, qui se produit

Figure III.11. Azote pariétal exprimé en pourcentage de la MS (A) et en pourcentage des parois (B) à J0 (■), J2 (□), J4 (●), J6 (○), J8 (▲) et J10 (△) pour l'expérimentation II. La ligne verticale représente la fin de la zone de croissance. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne (n = 3).



relativement tôt (Schnyder *et al.*, 1990 ; Skinner et Nelson, 1994), et qui se traduit également au niveau de la vitesse d'allongement des feuilles (figure I.21). La diminution de d_{Nvol} entre la base de la feuille et la zone de maturation est plus faible à J7 et J9 qu'aux jours précédents, et il n'y a pas de minimum de dépôt à la fin de la zone de croissance, comme entre J1 et J5 (insert 27,5 mm sur la figure III.10). Le dépôt d'azote est relativement plus faible autour de 50 mm qu'à des positions plus proches de la base de la feuille. d_{Nvol} marque un pic entre J5 et J7, puis diminue légèrement à J9 (insert 55 mm sur la figure III.10). Dans les parties plus distales de la feuille, exposées à la lumière, le dépôt est faible mais non nul.

Pour interpréter ces données, il faut raisonner en identifiant différents compartiments azotés :

- un compartiment d'azote insoluble « interne » à la cellule, constitué d'une part d'acides nucléiques, d'autre part, de protéines cytoplasmiques, chloroplastiques ou mitochondriales,
- un compartiment d'azote soluble « interne » à la cellule, constitué de nitrate, d'acides aminés et de peptides (essentiellement des enzymes),
- un compartiment d'azote « externe » à la cellule, comprenant les glycoprotéines structurales intégrées à la paroi (insolubles), et les enzymes jouant un rôle dans le grandissement cellulaire, le dépôt ou l'épaississement des parois (Carpita, 1996). La teneur en azote des parois a été mesurée sur le résidu NDF obtenu lors de l'expérimentation II. Elle est plus élevée à la base de la feuille et peut représenter jusqu'à 9% des parois (figure III.11.B), ce qui correspond à environ 3% de la MS (figure III.11.A). En considérant que cet azote est essentiellement protéique et peptidique, 1 g d'azote équivaut à 6,25 g de protéines. Les composés azotés pariétaux représentent alors plus de la moitié de la masse de la paroi, et près de 20% de la MS totale à la base de la zone de croissance. Ces composés azotés sont cependant rapidement « dilués » lors du grandissement cellulaire : ils ne constituent plus que 20% de la paroi et 9% de la MS dans les parties matures de la feuille.

Le dépôt d'azote par unité de volume élevé dans la zone de division (0-10 mm de la base de la feuille) résulte vraisemblablement de plusieurs phénomènes. L'incorporation d'azote dans le compartiment d'azote insoluble « interne » est importante dans la zone de division pour permettre la réplication du matériel génétique et la mise en place de nouvelles structures cellulaires. Un dépôt significatif de glycoprotéines se produit également dans la paroi cellulaire, et s'accompagne d'une forte activité enzymatique. L'activité de division diminue assez tôt au cours du développement de la feuille (Schnyder *et al.*, 1990), ce qui se traduit par une diminution du dépôt d'azote par unité de volume à partir de J3 (insert 2,5 mm sur la figure III.10).

Le dépôt d'azote par unité de volume est faible, voire négatif, dans la partie distale de la zone de croissance de J1 à J5. Il augmente de manière marquée à J7 et J9 (insert 27,5 mm sur la

figure III.10). Cette augmentation pourrait être liée à la diminution de la longueur de la zone de croissance observée sur la figure I.22. Un segment situé à 27,5 mm de la base de la feuille avant J5 se trouverait alors dans la zone de croissance, tandis qu'à J7 ou J9, un segment situé à 27,5 mm serait déjà entré dans la zone de maturation. La maturation entraîne l'incorporation massive d'azote insoluble dans les chloroplastes, ainsi que la synthèse de la Rubisco. Le dépôt des parois secondaires s'accompagne également d'un dépôt non négligeable d'azote, comme en témoigne l'augmentation de la teneur en azote des parois entre 50 et 150 mm de la base de la feuille (figure III.11). De ces deux phénomènes résulte un d_{Nvol} important (insert 55 mm sur la figure III.10).

Le dépôt d'azote par unité de volume faible mais non nul dans les parties de la feuille exposées à la lumière témoigne d'une accumulation d'azote, ce qui indique que la feuille n'est pas limitée en azote. Cette accumulation correspond vraisemblablement à un phénomène de stockage (sous forme de NO_3^- ou d'acides aminés) dans le compartiment soluble « interne ». La vacuole des cellules épidermiques peut en effet fonctionner comme un compartiment de stockage temporaire d'assimilats carbonés et azotés (Dietz *et al.*, 1994). Ces assimilats peuvent apparemment être remobilisés facilement, notamment durant la nuit (Dietz *et al.*, 1994). Le régime de jour continu de l'expérimentation accentuerait encore le phénomène d'accumulation. La Rubisco pourrait également s'accumuler, comme le mentionnent Huffaker et Peterson (1974), jouant ainsi le rôle de protéine de réserve. Par contre, le compartiment pariétal n'interviendrait pas dans les flux d'azote après le dépôt des parois secondaires.

L'évaluation du dépôt d'azote par unité de volume et non par unité de longueur modifie assez fortement les profils de dépôt le long de la feuille, et leur évolution au cours du développement. Elle met en évidence une activité métabolique intense en ce qui concerne l'azote à la base de la feuille en croissance, qui était masquée par les différences de largeur et d'épaisseur des segments dans le calcul du taux de dépôt par unité de longueur. Elle montre également que les écarts de dépôt d'azote entre dates de prélèvement dans la zone de maturation sont largement déterminés par les différences de dimensions. Néanmoins, des différences de dépôt d'azote par unité de volume subsistent entre dates. L'origine de ces variations reste incertaine.

III.C.3) Utilisation de l'azote nouvellement assimilé.

La composition isotopique des feuilles en croissance montre une augmentation rapide de la proportion de ^{15}N à partir du début du marquage de la solution nutritive non seulement dans la

Figure III.12. Teneur en ^{15}N de l'azote total le long de la feuille en croissance à J3 (■), J4 (□), J6 (○) et J7 (▲) pour l'expérimentation III (n = 3).

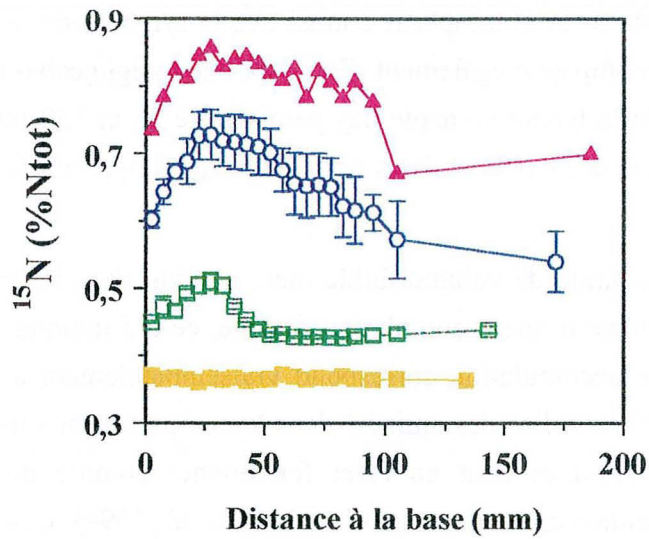
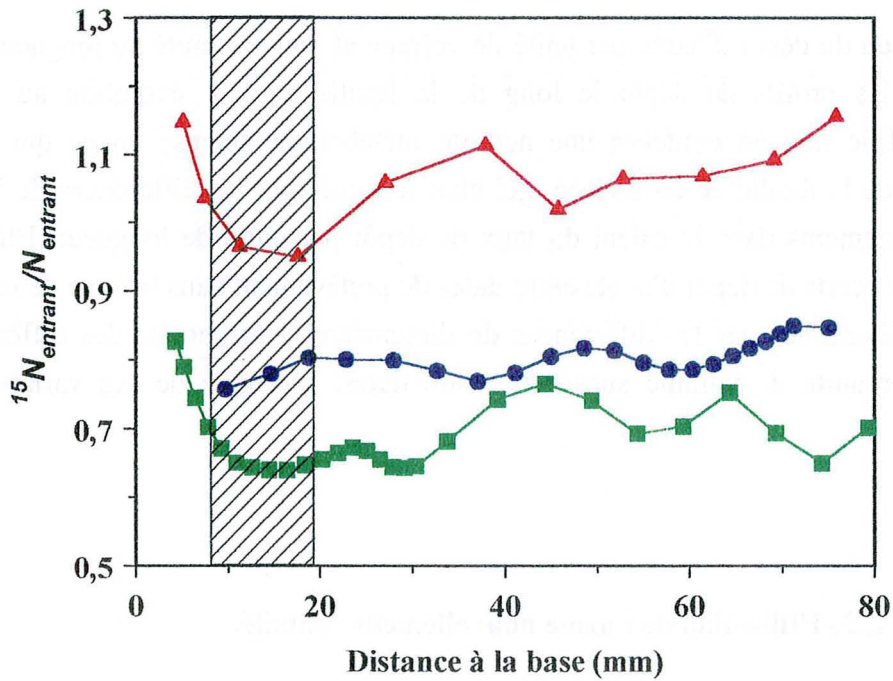


Figure III.13. Calcul du rapport ^{15}N entrant/N entrant le long de la feuille en croissance, durant trois intervalles de temps (J3-J4 (■), J4-J6 (●) et J6-J7 (▲)) de l'expérimentation III. La zone hachurée correspond à la zone où le taux de dépôt d'azote par unité de longueur est maximal.



zone de croissance, mais également tout le long de la feuille (figure III.12). Au jour suivant le changement de solution nutritive, l'abondance de ^{15}N la plus élevée se trouve dans les segments situés entre 10 et 30 mm de la base, qui ont traversé peu de temps auparavant la zone où l'incorporation d'azote est maximale. L'abondance de ^{15}N augmente encore à J4, J6 et J7 de manière plus marquée dans la zone de croissance (0-35 mm), en particulier là où l'incorporation d'azote est maximale. Le déplacement des segments se trouvant dans la zone de croissance à J3 entraîne progressivement l'augmentation de l'abondance en ^{15}N des parties plus distales de la feuille. Néanmoins, dans les parties exposées à la lumière, qui étaient déjà sorties de la zone de croissance lors du début du marquage, l'abondance de ^{15}N passe de 0,366% à environ 0,7% entre J3 et J7. Il y a donc partout le long de la feuille en croissance incorporation d'azote nouvellement assimilé.

- **Estimation de la composition isotopique de l'azote circulant.**

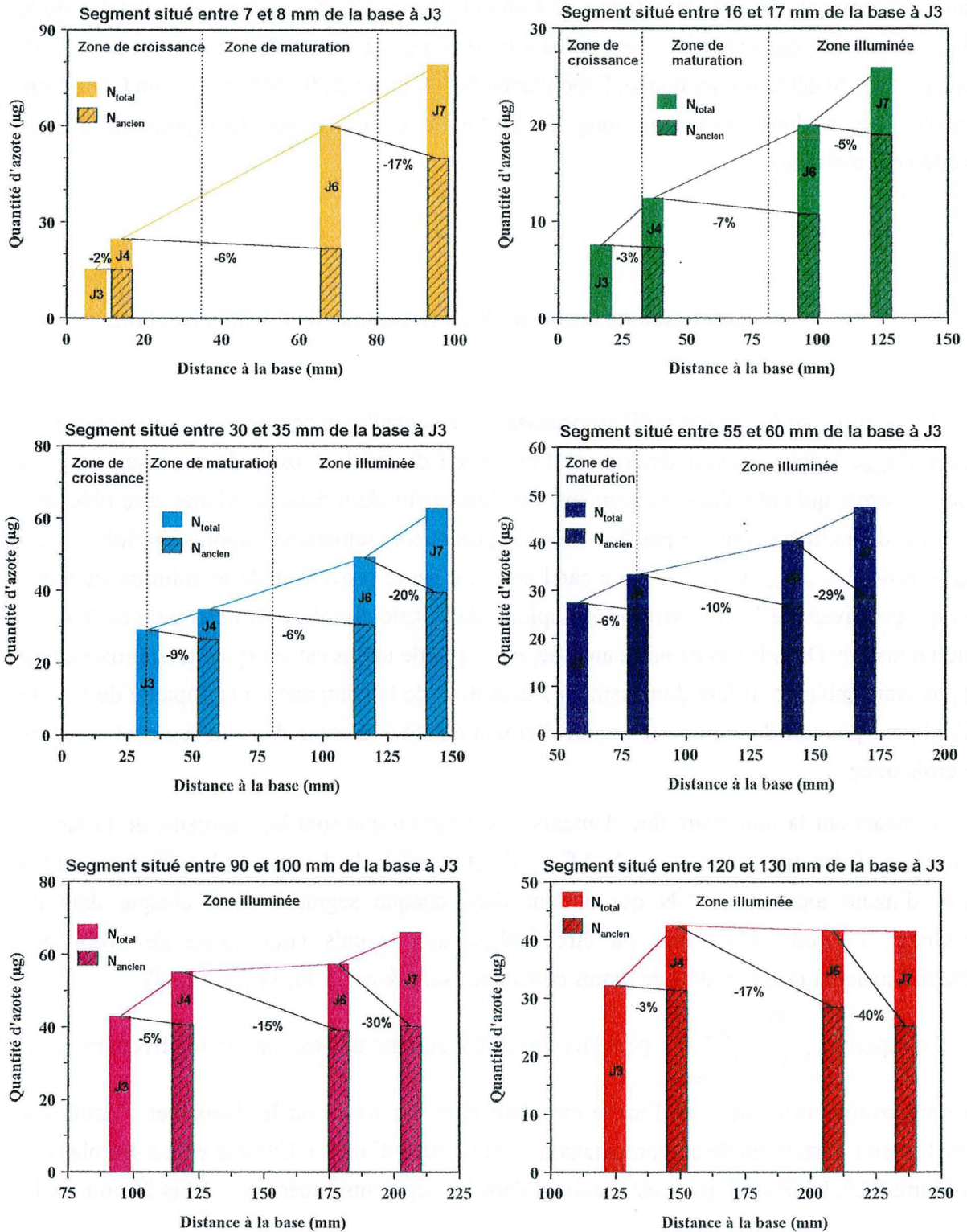
L'équation (III.6) montre qu'il est nécessaire de connaître la composition isotopique de la source ($A\%_{\text{source}}$) pour pouvoir déterminer l'évolution du stock d'azote dans un segment. La source de l'azote qui entre dans les segments est l'azote circulant dans le xylème et le phloème. Dans le cas de marquages sur un pas de temps long (plusieurs semaines) l'approximation $A\%_{\text{azote circulant}} = A\%_{\text{solution nutritive}}$ peut être faite car l'entrée d'azote provenant de la solution marquée amène progressivement la composition isotopique de l'azote circulant au niveau de celle de la solution nutritive. Dans le cas de notre analyse, où le pas de temps est court, cette approximation n'est pas vraisemblable. Il faut donc estimer l'évolution de la composition isotopique de l'azote circulant pour pouvoir déterminer le renouvellement du stock d'azote dans un segment au cours de sa croissance.

Connaissant la trajectoire des éléments « matériels » que sont les segments de la feuille (voir analyse cinématique au paragraphe I.B.5), il est possible de déterminer les quantités nettes de MS, d'azote total et de ^{15}N qui entrent dans chaque segment entre chaque date de prélèvement. Le jour 5 n'a pas pu être intégré aux calculs pour cause de problèmes d'échantillonnage. Les intervalles de temps considérés sont donc J3-J4, J4-J6 et J6-J7.

Le rapport $\frac{{}^{15}\text{N}_{\text{entrant}}}{({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})_{\text{entrant}}}$ peut être considéré comme une estimation relativement juste

de la composition isotopique de l'azote circulant dans les tissus où le dépôt net d'azote est maximal (sortie d'azote faible en comparaison avec l'entrée d'azote). Comme cela a été observé sur la figure III.9, le dépôt d'azote est maximal dans les segments situés entre 10 et 20 mm de la

Figure III.14. Evolution de la quantité d'azote total dans six segments différents, situés entre 7-8 mm, 16-17 mm, 30-35 mm, 55-60 mm, 90-100 mm et 120-130 mm de la base de la feuille à J3. Le marquage isotopique de la solution nutritive combiné à l'estimation de la teneur en ^{15}N de l'azote circulant permettent de déterminer, date par date, l'évolution du stock d'azote, en termes d'azote présent initialement (N_{ancien} en hachuré) et d'azote entrant (N_{nouveau}). Les pourcentages représentent la variation du stock d'azote ancien exprimée par 24 heures.



base de la feuille. Le rapport $\frac{{}^{15}\text{N}_{\text{entrant}}}{({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})_{\text{entrant}}}$ a été calculé pour chaque intervalle de temps considéré et pour chaque segment (figure III.13). Il est élevé près de la base de la feuille, diminue entre 0 et 10 mm de la base de la feuille, atteint un minimum entre 10 et 20 mm puis augmente au delà. Faisant l'hypothèse que dans les segments où le flux net est maximal la sortie de N_{ancien} est minimale, ce qui est en partie confirmé par l'observation d'un minimum dans le rapport $\frac{{}^{15}\text{N}_{\text{entrant}}}{({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})_{\text{entrant}}}$, ces minima ont été considérés comme une estimation de la composition isotopique de l'azote circulant. Ainsi, le pourcentage de ${}^{15}\text{N}$ contenu dans l'azote circulant est de 0.640, 0.757 et 0.951% entre J3 et J4, J4 et J6 et enfin J6 et J7 respectivement. Cela correspond à une entrée rapide de l'azote de la solution nutritive, puisque cinq jours après le début du marquage, l'azote circulant possède quasiment la même composition isotopique que la solution marquée.

Les valeurs du rapport $\frac{{}^{15}\text{N}_{\text{entrant}}}{({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})_{\text{entrant}}}$ supérieures à ces minima traduisent un recyclage partiel de l'azote dans les segments (voir figure III.5).

- **Evolution des stocks d'azote.**

L'estimation précédente nous permet donc de déterminer les quantités de N_{ancien} et de N_{nouveau} de chaque segment entre deux dates successives (équations III.6 et III.7), ce qui représente l'évolution du stock d'azote (figure III.14). Les pourcentages sur cette figure correspondent au rapport $\frac{N_{\text{ancien}}}{N_{\text{initial}}}$ pour 24 heures. Il s'agit donc de la variation journalière du stock d'azote.

Dans les segments les plus proches de la base de la feuille (7-8 mm, 16-17 mm, 30-35 mm, 55-60 mm et 90-100 mm), la quantité d'azote total augmente de manière importante tout au long de l'expérimentation, même lorsque les segments sont sortis de la zone de croissance longitudinale. Cela traduit les valeurs non nulles de dépôt d'azote dans les parties de la feuille exposées à la lumière. Seul le segment situé très près de la pointe (120-130 mm) n'accumule plus d'azote après J4. Dans la partie distale de la zone de croissance (segment 7-8 mm et segment 16-17 mm entre J3 et J4), la sortie d'azote est très faible, car seuls 2 à 3% de l'azote présent à J3 est exporté et remplacé par de l'azote circulant. Cela correspond au minimum du rapport $\frac{{}^{15}\text{N}_{\text{entrant}}}{({}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N})_{\text{entrant}}}$ observé dans la zone d'incorporation maximale de l'azote.

Dans la zone de maturation, le taux de renouvellement de l'azote ancien se situe entre 6 et 9% par jour. L'entrée d'azote nouveau est par contre très importante, ce qui doit permettre de satisfaire les besoins correspondant à la mise en place de l'appareil photosynthétique. Dans la zone exposée à la lumière, les entrées d'azote nouveau sont partiellement compensées par une sortie d'azote ancien (entre 10 et 40%), ce qui limite l'augmentation de la quantité d'azote total contenue dans ces segments.

Il ne semble pas y avoir d'évolution temporelle au niveau du renouvellement des stocks d'azote ancien. Les besoins en azote des différentes zones semblent en effet toujours être satisfaits, sans doute en relation avec l'alimentation azotée non limitante et les quantités importantes de sucres solubles présents dans la plante.

Pour interpréter ces données, il faut à nouveau se référer aux compartiments décrits plus haut. Les pourcentages de renouvellement journaliers élevés observés dans les parties de feuille exposées à la lumière ne peuvent pas a priori s'expliquer par un renouvellement important de la Rubisco. En effet, le turn over de la Rubisco est très faible, voire nul (Huffaker et Peterson, 1974). La Nitrate Réductase et les enzymes de synthèse de la chlorophylle possèdent par contre un taux de renouvellement beaucoup plus élevé, mais leur relativement faible abondance ne peut expliquer le renouvellement important de l'azote ancien (Huffaker et Peterson, 1974). L'explication se trouve plutôt dans le compartiment d'azote soluble « interne ». En effet, la réduction du nitrate est essentiellement effectuée dans les parties photosynthétiques de la plante. Les acides aminés et peptides résultants sont ensuite exportés vers d'autres parties de la feuille *via* le phloème (Wallsgrave *et al.*, 1983). Cela entraîne donc un influx de nitrates et un efflux de composés azotés réduits continuel dans les parties de la feuille exposées à la lumière. Dans le cas où la solution nutritive est marquée et où l'abondance de ^{15}N de l'azote circulant augmente progressivement, cela conduit à une diminution du stock d'azote ancien (les acides aminés et peptides exportés), remplacé par de l'azote circulant, plus riche en ^{15}N (nitrate importé en vue d'être réduit). L'important renouvellement de l'azote présent dans les segments exposés à la lumière d'un jour à l'autre pourrait ainsi correspondre à l'activité source d'azote réduit de cette partie de la feuille.

Ces résultats ne permettent ni de vérifier ni d'infirmer l'hypothèse de recyclage interne de l'azote protéique. En effet, même si les besoins en azote liés à la mise en place des protéines photosynthétiques peuvent vraisemblablement être satisfaits par les entrées d'azote dans la zone de maturation, le faible renouvellement du stock d'azote ancien entre 40 et 80 mm de la base de la feuille montre que l'azote présent dans les segments à la fin de la zone de croissance est en majorité conservé. Par ailleurs, Leech et Baker (1983) ont montré que le profil des polypeptides foliaires est très fortement modifié entre la base de la feuille, la zone de maturation et les parties exposées à la lumière de la feuille. Le fait que ces changements se produisent avec un renouvellement d'azote dans les tissus assez limité suggère un recyclage interne de l'azote

ancien non négligeable. Par contre, en l'absence de données sur le devenir des différents pools d'azote, le devenir de l'azote ancien est inconnu. De même, l'azote incorporé dans la zone de maturation peut être stocké dans la vacuole ou être utilisé pour la synthèse des protéines chloroplastiques. Il se peut également que ce phénomène de recyclage ne tienne pas une place essentielle dans l'économie de l'azote en condition de nutrition azotée non limitante.

Conclusion

Les données exposées dans ce chapitre confirment que la zone de croissance est un puits important pour l'azote, et que c'est à ce niveau qu'est incorporé la majeure partie de l'azote foliaire. Néanmoins, l'incorporation d'azote est fortement liée aux activités de division et de maturation. En régime de nutrition azotée non limitante, il ne semble pas y avoir de compétition entre la zone de croissance et la zone de maturation, car l'ensemble de besoins en azote semble satisfait. Il se produit même une augmentation de la quantité d'azote total dans des segments exposés à la lumière, vraisemblablement liée à une accumulation de NO_3^- ou d'acides aminés dans les tissus photosynthétiques.

Nous n'avons pas mis en évidence le phénomène de recyclage interne de l'azote protéique suggéré par les résultats de Gastal et Nelson (1994). La séparation et le suivi des différents pools d'azote (azote structural, azote protéique, acides aminés et nitrate) sont absolument indispensables à une telle mise en évidence. Néanmoins, il est possible qu'un tel mécanisme existe et joue un rôle prépondérant dans les situations où la nutrition azotée est limitante. En effet, ce type de recyclage permettrait de satisfaire les besoins de la zone de maturation, laissant l'azote circulant satisfaire les besoins de la zone de croissance.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un tissu en croissance, l'augmentation de masse ainsi que les flux de carbone et d'azote sont liés de manière indissociable à l'augmentation de volume des tissus. Quasiment toutes les études existantes sur feuille de graminée ont considéré la croissance sur la base monodimensionnelle (croissance en longueur). Même si cette composante est dominante, la largeur et l'épaisseur ne peuvent être oubliées dès lors qu'on s'intéresse à la croissance au cours de l'ontogenèse de la feuille et non plus à son fonctionnement sur une fenêtre de temps d'une durée très limitée. Nous avons donc caractérisé l'évolution des dimensions de la feuille, afin d'intégrer ces variations aux calculs de flux net.

Dans la feuille en croissance, la croissance en longueur se produit à la base de la feuille (0-35 mm). La largeur et l'épaisseur moyenne augmentent près de la base de la feuille, du fait de la croissance, puis diminuent au-delà, du fait de la diminution des dimensions finales des segments successifs qui composent la feuille.

La croissance en largeur et la croissance en épaisseur moyenne sont importantes sur la moitié proximale de la zone de croissance en longueur (0-10 mm). Elles diminuent de manière marquée dans la partie distale de la zone de croissance en longueur (10-35 mm). La croissance en largeur d'un segment s'annule à peu près à la même position que la fin de la zone de croissance en longueur, alors que l'épaisseur moyenne continue à augmenter sensiblement au delà, jusqu'à environ 50 mm de la base de la feuille. La mise en place des espaces gazeux intercellulaires provient essentiellement de la croissance entre 20 et 35 mm. Néanmoins, la croissance en épaisseur entre 30 et 50 mm de la base de la feuille contribue en partie à l'augmentation de la surface d'échange gazeux interne à la feuille.

La diminution de la largeur finale des segments du limbe de la ligule vers la pointe provient, dans la partie basale, de la disparition de faisceaux vasculaires aux marges du limbe. Près de la pointe, la diminution de largeur finale des segments est due à la diminution à la fois du nombre de faisceaux vasculaires présents dans la largeur et de la distance entre les faisceaux. Il reste à déterminer si ces variations de distance entre faisceaux proviennent de différences en termes de nombre de cellules ou de taille de cellules. De même, les caractéristiques de la diminution d'épaisseur moyenne finale de la ligule à la pointe de la feuille restent indéterminées.

Nous avons montré que la croissance en largeur et en épaisseur des segments, de même que les variations de leurs dimensions finales le long du limbe, ne sont pas négligeables, en particulier à la base de la zone de croissance. Il est donc nécessaire de mesurer les changements de dimensions de la feuille dans le cadre des études dynamiques de son fonctionnement. La croissance dans les différentes dimensions étant ainsi caractérisée, cet aspect a été intégré dans le calcul des flux nets de matière, en particulier le carbone et l'azote. Pour cela, il a été développé une méthodologie spécifique : le calcul des taux de dépôt a été effectué à partir du développement en trois dimensions de l'équation de continuité (Silk, 1984). Cela a permis d'intégrer les variations des caractéristiques de la croissance, ainsi que les variations de dimension le long du limbe. Néanmoins, l'approche suivie peut être qualifiée de « pseudo-3D ». En effet, nous avons considéré d'une part, que la croissance en largeur et en épaisseur sont réparties également sur toute la largeur et l'épaisseur du limbe, d'autre part, que la densité de matière, d'éléments ou de métabolites est homogène sur la largeur et l'épaisseur du limbe. Nous avons donc calculé une valeur du dépôt par unité de volume qui correspond à une moyenne dans la largeur et l'épaisseur.

Prenant en compte les changements de dimension liés à la croissance, nous avons pu comparer l'importance des dépôts dans les différentes zones à différents stades du développement. Trois grandes zones ont été distinguées dans la feuille : la zone de croissance en volume, la zone de maturation, et la partie de la feuille exposée à la lumière, ou zone autotrophe.

Du point de vue du carbone, les résultats obtenus confirment les observations précédentes (Schnyder et Nelson, 1987, 1989 ; Schnyder *et al.*, 1988 ; Allard et Nelson, 1991 ; Brégar, 1996) : Une accumulation nette de NSC importante est observée dans la zone de croissance en volume rapide, vraisemblablement sous la forme de fructanes. Dans la zone de maturation, en revanche, il se produit une diminution nette des quantités de NSC, indiquant une utilisation supérieure à l'accumulation. Néanmoins, la diminution de NSC ne suffit pas à expliquer quantitativement la synthèse de fibres NDF, ce qui implique un déchargement de saccharose significatif dans la zone de maturation. Ainsi, la zone de croissance est prépondérante et paraît prioritaire en ce qui concerne le dépôt de MS et la disponibilité en NSC. En effet, le phénomène de maturation semble limité en carbone au moment où la feuille émerge des gaines précédentes. Cela se traduit par des teneurs en NSC très faibles dans la zone de maturation et par un retard de la mise en place de parois secondaires. L'augmentation de la surface de la zone autotrophe et la transition progressive de puits à source de la feuille permet la satisfaction progressive des besoins en carbone dans la zone de maturation : la synthèse des parois secondaires est terminée à des positions

de plus en plus proche de la base, alors que la vitesse d'allongement de la feuille n'a pas encore diminué. Ainsi, le carbone nécessaire à la maturation des tissus semble en grande partie fourni par la feuille elle-même, c'est à dire par sa partie exposée à la lumière.

Du point de vue de l'azote, le dépôt est maximal dans la partie basale de la zone de croissance. La prise en compte des dimensions de la feuille et de leurs variations renforce encore cet état de fait. Il y a donc, par unité de volume de tissu, un déchargement important d'azote (vraisemblablement d'acides aminés) dans les 10 premiers millimètres de la feuille. Le déchargement étant *a priori* symplastique, il s'ensuit une entrée conjointe importante de saccharose dans les tissus. Nous pouvons supposer que cette entrée est supérieure à son potentiel d'utilisation. Dans ce cas, la synthèse et le stockage vacuolaire de fructanes pourrait être considérée comme un moyen de réguler la pression osmotique cytoplasmique.

La quantité d'azote importée dans la zone de maturation est beaucoup plus importante que ne l'indiquaient les données antérieures (Gastal et Nelson, 1994). Ceci provient de la sous estimation liée au fait que le terme temporel de l'équation de continuité avait été négligé. Cette incorporation d'azote dans la zone de maturation pourrait contribuer à la mise en place des protéines chloroplastiques. L'utilisation de ^{15}N nous a permis de montrer que les flux bruts vers les segments et des segments vers l'extérieur étaient beaucoup plus limités dans la zone de croissance et la zone de maturation que dans la zone autotrophe. Du fait de l'existence de forts remaniements protéiques dans les tissus de la zone de croissance et de la zone de maturation (Leech et Baker, 1983), l'existence d'un recyclage d'azote important est donc très probable. Néanmoins, une quantité non négligeable d'azote nouvellement assimilé est incorporée dans les tissus de la zone de maturation, ce qui semble en contradiction avec l'hypothèse proposée par Gastal et Nelson (1994).

Il existe cependant une forte accumulation d'azote dans les parties exposées à la lumière. La question de l'influence des conditions expérimentales, en particulier l'éclairage continu, sur cette accumulation reste posée. De même, l'entrée d'azote dans la zone de maturation pourrait ne correspondre qu'à une accumulation, comme celle observée dans les parties exposées à la lumière. Ainsi, il est possible que les protéines chloroplastiques aient été mises en place à partir des acides aminés provenant de la dégradation de protéines synthétisées dans la zone de division, en parallèle avec une accumulation d'azote dans la vacuole. En l'absence de données plus précises sur l'évolution des différents compartiments azotés, nous n'avons pu ni mettre en évidence, ni infirmer le phénomène de recyclage interne de l'azote.

Un certain nombre de questions restent donc posées :

- Existe-t-il un phénomène de recyclage d'azote dans la zone de maturation de la feuille en croissance de graminée ? Pour mettre en évidence un tel phénomène, il est nécessaire de déterminer l'évolution des différents types de composés azotés, ou encore d'étudier le devenir des stocks d'azote sur une plante carencée. En effet, dans le cas d'une carence, le recyclage de molécules azotées constituerait une économie de ressources et une forme d'adaptation aux conditions limitantes en azote.

- Quelles modifications entraîne une nutrition azotée limitante au niveau des flux de carbone et d'azote dans la feuille en croissance ? Une meilleure connaissance de l'ontogenèse foliaire (évolution de l'activité de division, transition de puits à source de la feuille en croissance...), ainsi que l'utilisation d'outils tels que les taux de dépôt par unité de volume (qui permettent d'intégrer les variations de dimensions provoquées par une carence) doivent permettre d'effectuer la comparaison de la croissance foliaire à différents niveaux de nutrition azotée dans de bonnes conditions.

- Quelle est la nature des mécanismes conduisant à la priorité de la zone de croissance sur la zone de maturation en ce qui concerne le carbone ? Un premier élément de réponse pourrait être donné par l'organisation spatiale de la feuille en croissance de graminée. En effet, tant que la partie de la feuille exposée à la lumière est insuffisante, les besoins en carbone et en azote de la feuille en croissance ne peuvent être satisfaits que par des assimilats provenant des feuilles matures de la talle. La zone de croissance étant située la première sur ce trajet, et possédant une forte capacité à prélever les assimilats azotés et carbonés dont les flux sont liés, il est possible qu'elle prélève la quasi totalité des assimilats présents dans le phloème, limitant ainsi la zone de maturation. Néanmoins, la question de la continuité des éléments du phloème (et du xylème), aussi bien en termes de présence physique que de fonctionnalité, reste ouverte.

- Y a-t-il un lien direct entre dépôt d'azote et activité de division cellulaire ? Le dépôt d'azote à la base de la feuille varie de manière importante au cours de l'ontogenèse foliaire. Il semble fortement lié à ce qui est connu de l'évolution de la production de cellules dans la zone de division. Néanmoins, le lien direct entre les deux phénomènes n'a pas encore été mis en évidence.

- Quels sont les mécanismes de régulation de la largeur et de l'épaisseur ? En particulier, les mécanismes contrôlant l'arrêt de la croissance en largeur et en épaisseur sont inconnus, alors qu'ils doivent posséder une influence décisive sur la forme finale de la feuille. De même le processus par lequel l'épaisseur moyenne augmente dans les segments sortis de la zone de croissance n'a pas été déterminé. Il pourrait s'agir d'un phénomène de

croissance de certaines cellules en particulier (cellules fibreuses du sclérenchyme, par exemple).

- Quels sont les flux de carbone et d'azote dans la feuille non émergée ?

En effet, les flux de carbone et d'azote dans la feuille lors des étapes précoces de sa croissance sont inconnus pour une question de méthodologie. La mise au point d'une méthode de mesure de la croissance dans une feuille non émergée permettrait de les déterminer.

Ces différentes questions constituent autant de points qu'il conviendrait d'approfondir dans des études ultérieures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbe E.C., Randolph L.F. and Einset J.** (1941) The developmental relationship between shoot apex and growth pattern of leaf blade in diploid maize. *Am. J. Bot.*, **28**: 778-784.
- Allard G. and Nelson C.J.** (1991) Photosynthate partitioning in basal zones of tall fescue leaf blades. *Plant Physiol.*, **95**: 663-668.
- Allard G., Nelson C.J. and Pallardy S.G.** (1991) Shade effects on growth of tall fescue : I. Leaf anatomy and dry matter partitioning. *Crop Sci.*, **31**: 163-167.
- Andrews M.** (1986) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Env.*, **9**: 511-519.
- Bassham J.A., Larsen P.O., Lawyer A.L. and Cornwell K.L.** (1981) Relationships between nitrogen metabolism and photosynthesis. In « *N and C metabolism* », Bewley (Ed.), 135-162.
- Beemster G.T.S. and Masle J.** (1996a) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.) : composition, number and size of epidermal cells in mature blades. *J. Exp. Bot.*, **47**: 1651-1662.
- Beemster G.T.S. and Masle J.** (1996b) The role of apical development around the time of leaf initiation in determining leaf width at maturity in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) with impeded roots. *J. Exp. Bot.*, **47**: 1679-1688.
- Beemster G.T.S., Masle J., Williamson R.E. and Farquhar G.D.** (1996) Effects of soil resistance to root penetration on leaf expansion in wheat (*Triticum aestivum* L.) : kinematic analysis of leaf elongation. *J. Exp. Bot.*, **47**: 1663-1678.
- Bernstein N., Silk W.K. and Läuchli A.** (1995) Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress : possible role of some mineral elements in growth inhibition. *Planta*, **196**: 699-705.
- Brégard A.** (1996) Transition de puits à source du limbe de fétuque élevée. *Thèse Université de Laval, Québec*, 97p.
- Bret-Harte M.S. and Silk W.K.** (1994) Fluxes and deposition rates of solutes in growing roots of *Zea mays*. *J. Exp. Bot.*, **45**: 1733- 1742.
- Brown W.V.** (1958) Leaf anatomy in grass systematics. *Bot. Gaz.*, **119**: 170-178.
- Burström H.** (1942) Über Entfaltung und Einrollen eines mesophilen Grasblattes. *Botaniska Notiser*, 351-362.

- Burström H.** (1957) Auxin and the mechanism of root growth. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 44-62.
- Buxton D.R and Fales S.L.** (1994) Plant environment and quality. In « *Forage quality, evaluation and utilization* », Fahey *et al.* (Ed.), 155-199.
- Casabianca H.** (1993) La spectrométrie de masse isotopique. Les couplages, la reproductibilité de la technique pour le carbone et l'azote. In « *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes* », INRA (Ed.), Paris, France, 11-26.
- Carpita N.C.** (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 445-476.
- Chaffey N.J.** (1996) Structure and function of the root cap of *Lolium temulentum* L. (Poaceae) : Parallels with the ligule. *Ann. Bot.*, **78**: 3-13.
- Cohen C.J., Chilcote D.O. and Frakes R.V.** (1982) Leaf anatomy and stomatal characteristics of four tall fescue selections differing in forage yield. *Crop Sci.*, **22**: 704-708.
- Cooper H.D. and Clarkson D.T.** (1989) Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals - A possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.*, **40**: 753-762.
- Cosgrove D.J.** (1986) Biophysical control of plant cell growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **37**: 377-405.
- Dale J.E.** (1985) The carbon relations of the developing leaf. In « *Control of leaf growth* », Baker *et al.* (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 135-153.
- Dale J.E.** (1988) The control of leaf expansion. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**: 267-295.
- Davidson J.L. and Milthorpe F.L.** (1966) Leaf growth in *Dactylis glomerata* following defoliation. *Ann. Bot.*, **30**: 173-184.
- Davies A., Evans M.E. and Pollock C.J.** (1989) Influence of date of tiller origin on leaf extension rates in perennial and italian ryegrass at 15°C in relation to flowering propensity and carbohydrate status. *Ann. Bot.*, **63**: 377-384.
- Dean C. and Leech R.M.** (1982) Genome expression during normal leaf development. I. Cellular and chloroplast numbers and DNA, RNA and protein levels in tissues of different ages within a seven-day-old wheat leaf. *Plant Physiol.*, **69**: 904-910.
- Deinum B., Sulastri R.D., Zeinab M.H.J. and Maassen A.** (1996) Effects of light intensity on growth, anatomy and forage quality of two tropical grasses (*Bracharia brizantha* and *Panicum maximum* var. *trichoglume*). *Neth. J. Agr. Sci.*, **44**: 111-124.

- Dietz K.J., Hollenbach B. and Hellwege E.** (1994) The epidermis of barley leaves is a dynamic intermediary storage compartment of carbohydrates, amino acids and nitrate. *Physiol. Plant.*, **92**: 31-36.
- Dimler R.J., Schaefer W.C., Wise C.S. and Rist C.E.** (1952) Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. *Analyt. Chem.*, **24**: 1411-1414.
- Durand J-L., Gautier H., Castell J-F. et Drouet J-L.** (1995) Eau, carbone, azote et zones de croissance. In « *Tome 1 : de la plante au couvert végétal.* », *Actes de l'Ecole-Chercheurs en Bioclimatologie, Le Croisic, 3-7 Avril 1995, INRA (Ed.)*, 197-216.
- Erickson R.O. and Sax K.B.** (1956) Elemental growth rate of the primary root of *Zea mays*. *Proc. Am. Philo. Soc.*, **100**: 487-498.
- Erickson R. et Silk W.K.** (1980) La cinématique de la croissance des plantes. *La Recherche*, 18-29.
- Esau K.** (1965) *Plant anatomy. 2nd edition*, J. Wiley (Ed.), New York, 767p.
- Gandar P.W.** (1980) The analysis of growth and cell production in root apices. *Bot. Gaz.*, **141**: 131-138.
- Gandar P.W.** (1983a) Growth in root apices. I. The kinematic description of growth. *Bot. Gaz.*, **144**: 1-10.
- Gandar P.W.** (1983b) Growth in root apices. II. Deformation and rate of deformation. *Bot. Gaz.*, **144**: 11-19.
- Gandar P.W. and Chalabi Z.S.** (1989) Estimation of velocity fields from cell number densities in nonsteady, one-dimensional growth. *Bot. Gaz.*, **150**: 93-100.
- Gandar P.W. and Hall A.J.** (1988) Estimating position-time relationships in steady-state, one-dimensional growth zones. *Planta*, **175**: 121-129.
- Gandar P.W. and Rasmussen H.** (1991) Growth pattern and movement of epidermal cells within leaves of *Asphodelus tenuifolius* (Cav.). *Ann. Bot.*, **68**: 307-315.
- Gastal F. and Bélanger G.** (1993) The effects of nitrogen fertilization and the growing season on photosynthesis of field-grown tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) canopies. *Ann. Bot.*, **72**: 401-408.
- Gastal F. and Nelson C.J.** (1994) Nitrogen use within the growing leaf blade of tall fescue. *Plant Physiol.*, **105**: 191-197.
- Gastal F. et Saugier B.** (1986) Alimentation azotée et croissance de la fétuque élevée. I. Assimilation du carbone et répartition entre organes. *Agronomie*, **6**: 157-166.

- Gebrehiwot L., Nelson C.J. and Coutts J.H.** (1995) Effect of temperature on cell wall and carbohydrate deposition in the leaf growth zone of tall fescue. *Agron. Abstr.*, 166.
- Goodwin R.H. and Stepka W.** (1945) Growth and differentiation in the root tip of *Phleum pratense*. *Am. J. Bot.*, **32**: 36-46.
- Green P.B.** (1976) Growth and cell pattern formation on an axis: critique of concepts, terminology, and modes of study. *Bot. Gaz.*, **137**: 187-202.
- Handley L.L. and Raven J.A.** (1992) The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant Cell Env.*, **15**: 965-985.
- Hanna W.W., Monson W.G. and Burton G.W.** (1973) Histological examination of fresh forage leaves after *in vitro* digestion. *Crop Sci.*, **13**: 98-102.
- Hedley C.L. and Stoddart J.L.** (1972) Patterns of protein synthesis in *Lolium temulentum* (L.). I. Changes occurring during leaf development. *J. Exp. Bot.*, **23**: 490-501.
- Ho L.C.** (1988) Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**: 355-378.
- Horst G.L., Nelson C.J. and Asay K.H.** (1978) Relationship of leaf elongation to forage yield of tall fescue genotypes. *Crop Sci.*, **18**: 715-719.
- Huffaker R.C. and Peterson L.W.** (1974) Protein turnover in plants and possible means of its regulation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **25**: 363-392.
- Jellings A.J. and Leech R.M.** (1982) The importance of quantitative anatomy in the interpretation of whole leaf biochemistry in species of *Triticum*, *Hordeum* and *Avena*. *New Phytol.*, **92**: 39-48.
- Keingatti R.K., Nelson C.J. and Coutts J.H.** (1995) Accumulation of minerals in developing tall fescue leaves. *Agron. Abstr.*, 115.
- Kemp D.R.** (1980) The location and size of the extension zone of emerging wheat leaves. *New Phytol.*, **84**: 729-737.
- Leech R.M. and Baker N.R.** (1983) The development of photosynthetic capacity in leaves. In « *The growth and functioning of leaves* », Dale and Milthorpe (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 271-307.
- MacAdam J.W.** (1988) Cellular dynamics, peroxidase activity and secondary cell wall deposition during tall fescue leaf blade development. *PhD thesis, University of Missouri, Columbia*, 132p.
- MacAdam J.W. and Nelson C.J.** (1987) Specific leaf weight in zones of cell division, elongation and maturation in tall fescue leaf blades. *Ann. Bot.*, **59**: 367-376.

- MacAdam J.W., Sharp R.E. and Nelson C.J.** (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. II. Spatial distribution of apoplastic peroxidase activity in genotypes differing in length of the elongation zone. *Plant Physiol.*, **99**: 879-885.
- MacAdam J.W., Volenec J.J. and Nelson C.J.** (1989) Effects of nitrogen on mesophyll cell division and epidermal cell elongation in tall fescue leaf blades. *Plant Physiol.*, **89**: 549-556.
- Mandoli D.F. and Briggs W.R.** (1984) Fibre-optic plant tissues : spectral dependence in dark-grown and green tissues. *Photochem. Photobiol.*, **39**: 419-424.
- McQueen-Mason S.J.** (1995) Expansins and cell wall expansion. *J. Exp. Bot.*, **46**: 1639-1650.
- Meeuse A.D.J.** (1938) Development and growth of the sclerenchyma fibers and some remarks on the development of the tracheids in some monocotyledons. *Rec. Trav. Bot. Neerl.*, **35**: 288-321.
- Meiri A., Silk W.K. and Läuchli A.** (1992) Growth and deposition of inorganic nutrient elements in developing leaves of *Zea mays* (L.). *Plant Physiol.*, **99**: 972-978.
- Metcalf C.R.** (1960) Anatomy of the monocotyledons. I. *Gramineae*. Oxford at the Clarendon Press, London, 731p.
- Meyer C., Hirel B., Morot-Gaudry J-F et Caboche M.** (1993) L'utilisation de l'azote par les plantes. *La Recherche*, **24**: 956-962.
- Mitchell K.J. and Soper K.** (1958) Effects of differences in light intensity and temperature on the anatomy and development of leaves of *Lolium perenne* and *Paspalum dilatatum*. *N. Z. J. Agric. Res.*, **1**: 1-16.
- Moore K.J. and Hatfield R.D.** (1994) Carbohydrates and forage quality. In « *Forage quality, evaluation and utilization* », Fahey et al. (Ed.), 229-280.
- Naik M.S., Abrol Y.P., Nair T.V.R. and Ramarao C.S.** (1982) Nitrate assimilation - Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochem.*, **21**: 495-504.
- Nelson C.J., Asay K.H. and Sleper D.A.** (1977) Mechanisms of canopy development of tall fescue genotypes. *Crop Sci.*, **17**: 449-452.
- Nelson C.J. and MacAdam J.W.** (1989) Cellular dynamics in the leaf growth zone. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, **8**: 207-223.
- Nelson C.J. and Spollen W.G.** (1987) Fructans. *Physiol. Plant.*, **71**: 512-516.
- Perry R.H. and Green D.W.** (1985) Perry's chemical engineers' handbook. McGraw-Hill Book, New York, 3-95.
- Prat H.** (1948) Histo-physiological gradients and plant organogenesis. *Bot. Rev.*, **14**: 603-643.

- Preston T.** (1992) The measurement of stable isotope natural abundance variations. *Plant Cell Env.*, **15**: 1091-1097.
- Prioul J-L., Brangeon J. and Reyss A.** (1980a) Interaction between external and internal conditions in the development of photosynthetic features in a grass leaf. I. Regional responses along a leaf during and after low-light or high-light acclimation. *Plant Physiol.*, **66**: 762-769.
- Prioul J-L., Brangeon J. and Reyss A.** (1980b) Interaction between external and internal conditions in the development of photosynthetic features in a grass leaf. II. Reversibility of light-induced responses as a function of developmental stages. *Plant Physiol.*, **66**: 770-774.
- Pritchard J.** (1994) The control of cell expansion in roots. *New Phytol.*, **127**: 3-26.
- Prosky L., Asp N-G., Furda I., DeVries J.W., Schweizer T.F and Harland B.F.** (1985) Determination of Total Dietary Fiber in foods and food products : collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**: 677-679.
- Raven J.A.** (1996) Into the voids : the distribution, function, development and maintenance of gas spaces in plants. *Ann. Bot.*, **78**: 137-142.
- Richards O.W. and Kavanagh A.J.** (1943) The analysis of the relative growth gradients and changing form of growing organisms : illustrated by the tobacco leaf. *Am. Nat.*, **77**: 385.
- Robson M.J.** (1972) The effect of temperature on the growth of S.170 tall fescue (*Festuca arundinacea*). I. Constant temperature. *J. Appl. Ecol.*, **9**: 643-653.
- Rufty T.W., Thomas J.F., Remmler J.L., Campbell W.H. and Volk R.J.** (1986) Intercellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol.*, **82**: 675-680.
- Schnyder H. and Nelson C.J.** (1987) Growth rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. *Plant Physiol.*, **85**: 548-553.
- Schnyder H. and Nelson C.J.** (1988) Diurnal growth of tall fescue leaf blades. I. Spatial distribution of growth, deposition of water, and assimilate import in the elongation zone. *Plant Physiol.*, **86**: 1070-1076.
- Schnyder H. and Nelson C.J.** (1989) Growth rates and assimilate partitioning in the elongation zone of tall fescue leaf blades at high and low irradiance. *Plant Physiol.*, **90**: 1201-1206.
- Schnyder H., Nelson C.J. and Coutts J.H.** (1987) Assessment of spatial distribution of growth in the elongation zone of grass leaf blades. *Plant Physiol.*, **85**: 290-293.
- Schnyder H., Nelson C.J. and Spollen W.G.** (1988) Diurnal growth of tall fescue leaf blades. II. Dry matter partitioning and carbohydrate metabolism in the elongation zone and adjacent expanded tissue. *Plant Physiol.*, **86**: 1077-1083.

- Schnyder H., Seo S., Rademacher I.F. and Kühbauch W.** (1990) Leaf growth in *Lolium perenne* (L.). I. Spatial distribution of growth rates and of epidermal cell lengths in the elongation zone during development. *Planta*, **181**: 423-431.
- Sharman B.C.** (1947) The biology and developmental morphology of the shoot apex in the Gramineae. *New Phytol.*, **46**: 20-34.
- Silk W.K.** (1983) Kinematic analysis of leaf expansion. In « *The growth and functioning of leaves* », Dale and Milthorpe (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 89-108.
- Silk W.K.** (1984) Quantitative descriptions of development. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 479-518.
- Silk W.K. and Erickson R.O.** (1979) Kinematics of plant growth. *J. Theor. Biol.*, **76**: 481-501.
- Silk W.K., Hsiao T.C., Deidenhofen U. and Matson C.** (1986) Spatial distributions of potassium, solutes and their deposition rates in the growth zone of the primary corn root. *Plant Physiol.*, **82**: 853-858.
- Silk W.K., Lord E.M. and Eckard K.J.** (1989) Growth patterns inferred from anatomical records. Empirical tests using longisections of roots of *Zea mays* (L.). *Plant Physiol.*, **90**: 708-713.
- Silk W.K., Walker R.C. and Labavitch J.** (1984) Uronide deposition rates in the primary root of *Zea mays*. *Plant Physiol.*, **74**: 721-726.
- Skinner R.H. and Nelson C.J.** (1994) Epidermal cell division and the coordination of leaf and tiller development. *Ann. Bot.*, **74**: 9-15.
- Skinner R.H. and Nelson C.J.** (1995) Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. *Crop Sci.*, **35**: 4-10.
- Song B.H.** (1992) Carbon and nitrogen metabolism and partitioning with respect to leaf and root growth in two genotypes of tall fescue. *PhD thesis, University of Missouri, Columbia*, 194p.
- Soper K. and Mitchell K.J.** (1956) The developmental anatomy of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *N. Z. J. Sci. Tech.*, **A37**: 484-504.
- Thévenin C.** (1984) Echanges de CO₂ et structure foliaire de *Festuca arundinacea*: Effet de l'azote et de la densité de culture. *Mémoire de DEA d'écologie végétale, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay*, 75p.
- Turgeon R.** (1984) Termination of nutrient import and development of vein loading capacity in albino tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **75**: 45-48.
- Turgeon R.** (1989) The sink-source transition in leaves. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, **40**: 119-138.

- Van Soest P.J., Robertson J.B. and Lewis B.A.** (1991) Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, **74**: 3583-3597.
- Vogelmann T.C. and Bjorn L.O.** (1986) Plants as light traps. *Physiol. Plant.*, **68**: 704-708.
- Volenec J.J. and Nelson C.J.** (1981) Cell dynamics in leaf meristems of contrasting tall fescue genotypes. *Crop Sci.*, **21**: 381-385.
- Volenec J.J. and Nelson C.J.** (1983) Responses of tall fescue leaf meristems to N fertilization and harvest frequency. *Crop Sci.*, **23**: 720-724.
- Volenec J.J. and Nelson C.J.** (1984a) Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. I. Relationship to genetically altered leaf elongation rates. *Plant Physiol.*, **74**: 590-594.
- Volenec J.J. and Nelson C.J.** (1984b) Carbohydrate metabolism in leaf meristems of tall fescue. II. Relationship to leaf elongation rates modified by nitrogen fertilization. *Plant Physiol.*, **74**: 595-600.
- Wallsgrave R.M., Keys A.J., Lea P.J. and Miflin B.J.** (1983) Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. *Plant Cell Env.*, **6**: 630-636.
- Watson D.J.** (1952) The physiological basis of variation in yield. *Adv. Agron.*, **4**: 101-144.
- Wilman D., Daly M., Koocheki A. and Lwoga A.B.** (1977) The effect of interval between harvests and nitrogen application on the proportion and digestibility of cell wall, cellulose, hemicellulose and lignin and on the proportion of lignified tissue in leaf cross-section in two perennial ryegrass varieties. *J. Agric. Sci.*, **89**: 53-63.
- Williams R.F.** (1975) The shoot apex and leaf growth. Williams (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 256p.
- Xu Q.Z., Nelson C.J. and Coutts J.H.** (1995) Stomatal development in tall fescue leaf blades. *Agron. Abstr.*, 115.
- Zhong H. and Läuchli A.** (1993) Spatial and temporal aspects of growth in the primary root of cotton seedlings: effects of NaCl and CaCl₂. *J. Exp. Bot.*, **44**: 763-771.

ANNEXES

ANNEXE I

Liste des publications et présentations.

Maurice I., Gastal F., Durand J-L.

Generation of form and associated mass deposition during leaf development in grasses : a kinematic approach for non-steady growth.

A paraître dans *Annals of Botany* (Novembre 1997).

Maurice I., Gastal F. (1996)

Anatomical and biochemical changes in grass leaves during development.

Abstract of the 4th ESA Congress, 07-11 July 1996, Veldhoven - Wageningen, pays Bas, 654-655 (*Poster*).

ANNEXE II

Relation entre le dépôt par unité de longueur et le dépôt par unité de volume.

L'équation de continuité (II.1) peut être développée en une ou plusieurs dimensions, comme cela a été décrit dans le chapitre II. Par exemple:

$$d_t = \frac{\partial \rho_t}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho_t}{\partial x} + \rho_t \frac{\partial v_x}{\partial x} \quad (\text{A.1})$$

où $d_t(x,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche par unité de longueur,
 $\rho_t(x,t)$ est la masse linéique de la feuille,
 v_x est la vitesse de déplacement le long de l'axe x .

De plus, dans le cas où la masse volumique est homogène dans la largeur et l'épaisseur à une position donnée de la base de la feuille sur l'axe longitudinal, nous pouvons écrire :

$$\rho_t(x,t) = L(x,t) \cdot \varepsilon(x,t) \cdot \rho_v(x,t) \quad (\text{A.2})$$

$$\text{et} \quad d_v = \frac{\partial \rho_v}{\partial t} + v_x \frac{\partial \rho_v}{\partial x} + \rho_v \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) \quad (\text{A.3})$$

où $L(x,t)$ est la largeur de la feuille,
 $\varepsilon(x,t)$ est l'épaisseur de la feuille,
 $\rho_v(x,t)$ est la masse volumique de la feuille,
 $d_v(x,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche par unité de volume,
 $\frac{\partial v_y}{\partial y}$ et $\frac{\partial v_z}{\partial z}$ représentent les vitesses de déplacement le long des axes y et z .

En combinant les équations (A.1) et (A.2), nous obtenons :

$$d_t = \frac{\partial}{\partial t} (\rho_v L \varepsilon) + v_x \frac{\partial}{\partial x} (\rho_v L \varepsilon) + (\rho_v L \varepsilon) \frac{\partial v_x}{\partial x} \quad (\text{A.4})$$

Soit :

$$d_t = \frac{\partial \rho_v}{\partial t} L \varepsilon + \rho_v \frac{\partial L}{\partial t} \varepsilon + \rho_v L \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + v_x \left(\frac{\partial \rho_v}{\partial x} L \varepsilon + \rho_v \frac{\partial L}{\partial x} \varepsilon + \rho_v L \frac{\partial \varepsilon}{\partial x} \right) + \rho_v L \varepsilon \frac{\partial v_x}{\partial x} \quad (\text{A.5})$$

Ou encore :

$$\frac{d_t}{L \varepsilon} = \frac{\partial \rho_v}{\partial t} + \rho_v \left(\frac{1}{L} \frac{\partial L}{\partial t} + \frac{1}{\varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} \right) + v_x \frac{\partial \rho_v}{\partial x} + v_x \left(\rho_v \frac{1}{L} \frac{\partial L}{\partial x} + \rho_v \frac{1}{\varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial x} \right) + \rho_v \frac{\partial v_x}{\partial x} \quad (\text{A.6})$$

Nous pouvons identifier les trois premiers termes de l'équation (A.3) en première, troisième et cinquième position dans le membre droit de l'équation (A.6).

De plus, la variation totale de la largeur et de l'épaisseur à une position x et un temps t donnés représentent la somme des taux d'élargissement et d'épaississement, c'est à dire :

$$\frac{\partial L}{\partial t} = \int_y \frac{\partial v_y}{\partial y} \cdot dy \quad (\text{A.7})$$

et

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial t} = \int_z \frac{\partial v_z}{\partial z} \cdot dz \quad (\text{A.8})$$

Si nous faisons l'hypothèse que les taux d'élargissement et d'épaississement sont constants dans la largeur et l'épaisseur, alors:

$$\frac{\partial L}{\partial t} = \frac{\partial v_y}{\partial y} \int_y dy \quad (\text{A.9})$$

et

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial t} = \frac{\partial v_z}{\partial z} \int_z dz \quad (\text{A.10})$$

d'où

$$\frac{\partial v_y}{\partial y} = \frac{1}{L} \frac{\partial L}{\partial t} \quad (\text{A.11})$$

et

$$\frac{\partial v_z}{\partial z} = \frac{1}{\varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} \quad (\text{A.12})$$

Combinées à l'équation (A.6), les équations (A.11) et (A.12) donnent:

$$\frac{d_\ell}{L\varepsilon} = d_v + v_x \left(\rho_v \frac{1}{L} \frac{\partial L}{\partial x} + \rho_v \frac{1}{\varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial x} \right) \quad (\text{A.13})$$

ou encore

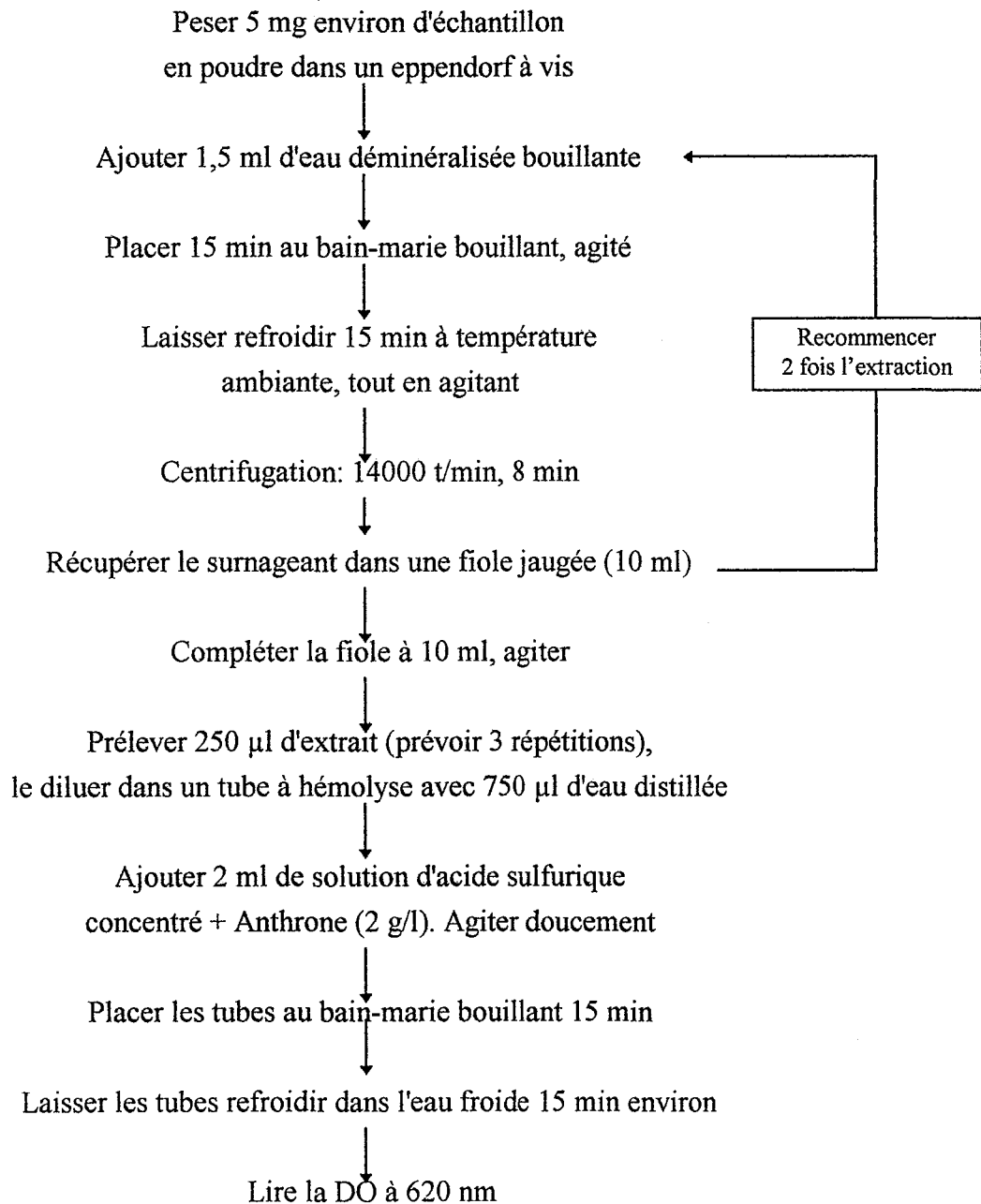
$$d_v = \frac{d_\ell}{A} - \frac{v_x \rho_v}{A} \cdot \frac{\partial A}{\partial x} \quad (\text{A.14})$$

où $d_v(x,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche par unité de volume,
 $d_\ell(x,t)$ est le taux de dépôt de matière sèche par unité de longueur,
 $A(x,t)$ est la section de la feuille,
 $v_x(x,t)$ est la vitesse de déplacement le long de l'axe x ,
 $\rho_v(x,t)$ est la masse volumique de la feuille.

Contrairement aux résultats de Silk *et al.* (1984), il n'existe pas de relation simple entre d_ℓ et d_v .

ANNEXE III

Protocole de dosage des WSC

d'après Dimler *et al.* (1952)

La gamme étalon se compose de solutions de fructose de 0 à 75 µg/l

ANNEXE IV

Composition du détergent NDS

Dosage pour 4 litres de NDS :

- placer 18.6g d'Hydrogène Phosphate Disodé Anhydre (Na_2HPO_4) dans une fiole jaugée de 2 litres,
- ajouter 27.24g de Borate de Sodium Décahydraté ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_{10} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$),
- compléter à 2 litres avec de l'eau déminéralisée, agiter,
- placer 74.44g d'EDTA dans une autre fiole jaugée de 2 litres remplie à moitié d'eau déminéralisée, agiter,
- ajouter doucement (porter un masque pour ne pas respirer les poussières) 120g de SDS, remplir d'eau déminéralisée jusqu'aux $\frac{3}{4}$ de la fiole,
- ajouter 40ml de triéthylène glycol (antimousse), compléter à 2 litres,
- agiter les fioles jusqu'à obtention de liquide transparent. Mélanger les deux solutions. Vérifier le pH, et éventuellement l'ajuster à 7.0.

Figure A.1. Schéma de l'autoanalyseur carbone azote. (1) passeur d'échantillons, (2) colonne de combustion, (3) colonne de réduction, (4) piège à eau, (5) colonne de séparation chromatographique, (6) détecteur à catharométrie.

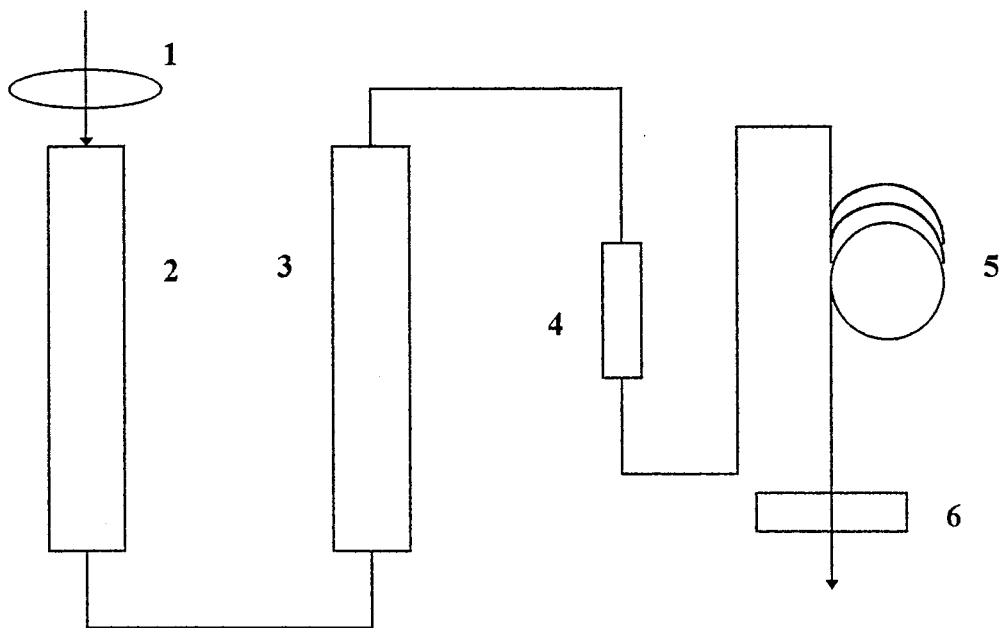
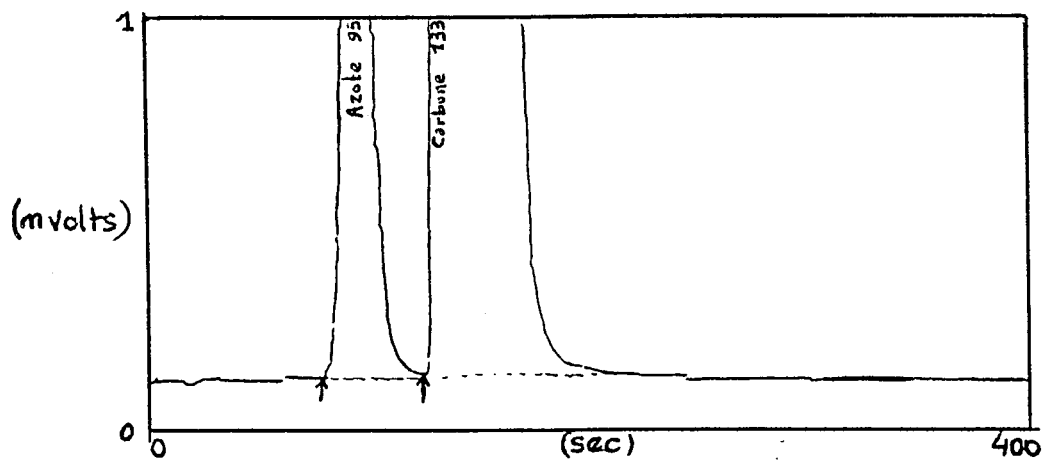


Figure A.2. Exemple d'enregistrement électrique lors du passage d'un échantillon. Le premier pic correspond à l'azote (90 secondes environ après l'envoi de l'échantillon), le second correspond au carbone (après environ 120 secondes). L'ensemble de l'analyse dure environ 400 secondes.



ANNEXE V

Principe de dosage du Carbone et de l'Azote

Le dosage du carbone total et de l'azote total utilisé ici repose sur la séparation des deux composants par chromatographie en phase gazeuse (après combustion).

L'autoanalyseur CN (représenté sur la figure A.1) est composé d'un passeur d'échantillons (1), d'une colonne de combustion (2), d'une colonne de réduction (3), d'un piège à eau (4), d'une colonne de séparation chromatographique (5) et d'un détecteur à catharométrie (6). L'ensemble est relié à un intégrateur.

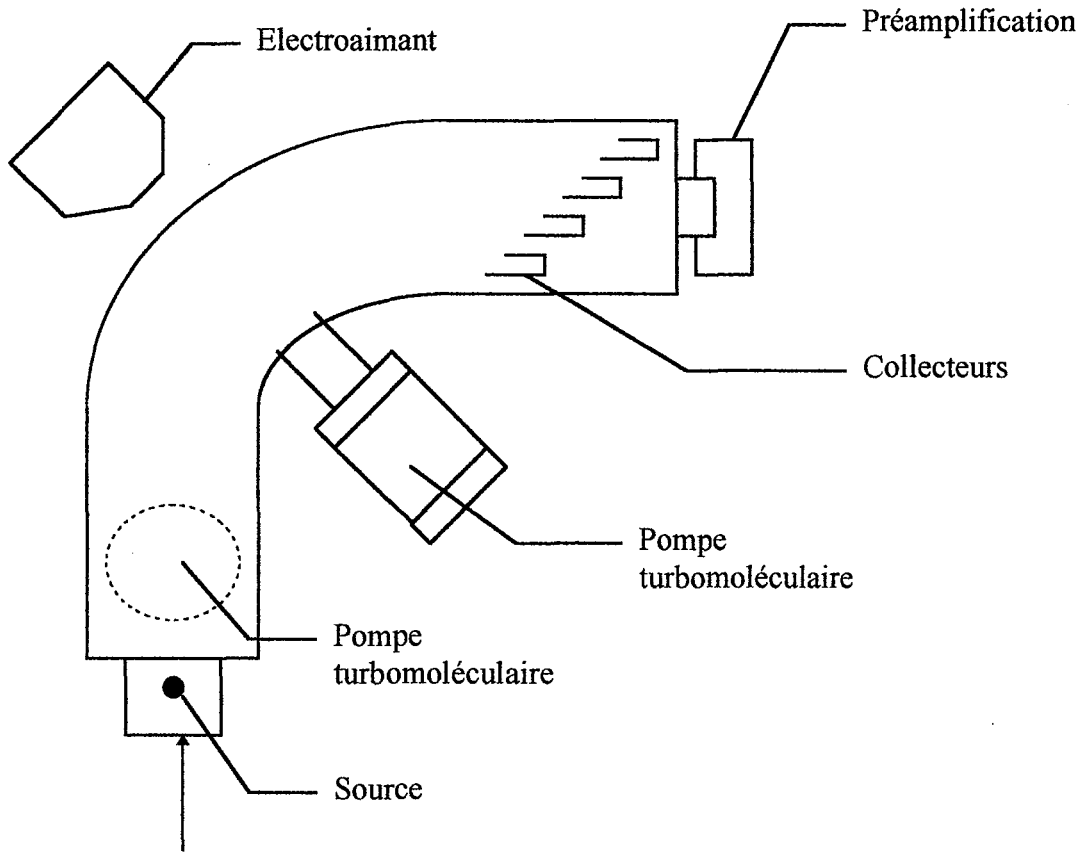
Les échantillons sont introduits dans la chambre de combustion par le passeur d'échantillons, en même temps qu'un flux d'O₂. La combustion est rapide et très lumineuse. La colonne de combustion (1021°C) comprend deux catalyseurs (chrome sesquioxyde granulaire et oxyde de cobalt) et conduit à la formation des gaz CO₂, H₂O et NO_x à partir des composés carbonés et azotés de l'échantillon à analyser.

Les gaz sont transportés dans un flux continu d'hélium qui les amène à la colonne de réduction. Celle-ci est portée à la température de 650°C, et contient du cuivre (Cu) qui permet de réduire les NO_x en N₂ et de piéger l'oxygène en excès. Les gaz restant dans le flux d'hélium sont CO₂, H₂O et N₂.

La vapeur d'eau est piégée dans une colonne de verre remplie de permanganate de potassium.

CO₂ et N₂ sont séparés dans une colonne de chromatographie (le CO₂ sort en premier) puis les gaz vont baigner deux électrodes tandis qu'un catharomètre mesure la résistance entre celles-ci. Le passage des gaz est donc repéré par un signal électrique (figure A.2). Un intégrateur calcule automatiquement la surface des pics, ce qui permet, grâce à un calibrage préalable (à l'Atropine) et au poids de l'échantillon (au centième de mg), de déterminer les pourcentages de carbone total et d'azote total dans la MS de l'échantillon.

Figure A.3. Schéma du spectromètre de masse. les échantillons sont au préalable minéralisés, et sont introduits dans un flux d'hélium (Casabianca, 1993).



ANNEXE VI

Principe de la mesure de la composition isotopique d'un échantillon

d'après Casabianca (1993) et Preston (1992).

Dans un système sous pression réduite, un ion de masse m et de charge z peut être accéléré par un potentiel V et être injecté dans un champ magnétique B uniforme. Dans ces conditions, l'ion considéré va subir une déviation qui a l'équation mathématique d'une orbite circulaire de rayon R :

$$R = \frac{1}{B} \sqrt{2V \frac{m}{z}}$$

Les échantillons sont minéralisés, réduits, séparés comme pour l'analyse élémentaire de carbone et d'azote, puis ionisés et injectés dans le spectromètre de masse (figure A.3.) qui mesure la proportion de gaz N_2 dont la masse moléculaire est 28 ($N^{14}N^{14}$), 29 ($N^{14}N^{15}$) et 30 ($N^{15}N^{15}$).

Il est nécessaire d'effectuer l'analyse sur un échantillon contenant au moins 40 μg d'azote. L'analyse dure environ 300 secondes.

GENERATION OF FORM AND ASSOCIATED CARBON AND NITROGEN DEPOSITION DURING LEAF DEVELOPMENT IN TALL FESCUE (*Festuca arundinacea* Schreb.).

SUMMARY

Leaf growth is particularly important to the yield of grasses, both in terms of forage quantity and forage quality. Therefore, we studied leaf growth with respects to growth in dimensions and to carbon and nitrogen fluxes, from the moment when the leaf emerged from the whorl of older sheaths until the growth in length ceased.

Leaf width and average thickness varied markedly between leaf base and leaf tip. Both were primarily generated in the longitudinal growth zone. Leaf width varied little beyond the longitudinal growth zone, whereas leaf average thickness still increased a little along the maturation zone. The local characteristics of growth in the three dimensions were then combined to the characteristics of dry matter (DM) composition, in order to carry out a kinematic analysis of carbon and nitrogen fluxes in zones of growth in volume, maturation and in mature parts of the leaf. Three kinds of representations were used to characterise the spatial distribution of DM fluxes in the growing leaf :

- We followed the successive characteristics of material elements (segments) inferred from their path lines and from the profiles of these characteristics along the leaf.
- We calculated the deposition rates on a unit length basis, which represents the total sink strength of the element studied.
- We calculated the deposition rates on a unit volume basis, which represents the metabolic activity of the element considered.

DM and nitrogen deposition were important at the basis of the growth zone. The decrease in the activity of the division zone, observed relatively early in leaf development, caused the net flux of DM and nitrogen on a unit volume basis to decrease. Yet, the growth zone remained the main sink for carbon and nitrogen, at whatever developmental stage.

With non limiting nitrogen nutrition, the maturation zone seemed to be limited in carbon assimilates at the moment when the growing leaf emerged. During the leaf progressive sink to source transition, this limitation disappeared. The carbon needed for the maturation process seems to have been provided by the part of the growing leaf exposed to the light. Although far less heavy than in the longitudinal growth zone, nitrogen deposition remained important in the maturation zone, at whatever developmental stage.

All these data were necessary for a comprehensive comparison of leaf growth at different levels of nitrogen nutrition to be held in the future.

Key words : *Festuca arundinacea* (Schreb.), tall fescue, leaf (growth, ontogenesis, developmeny, dimensions, anatomy), relative growth rates, kinematic analysis, deposition rate, sink to source transition, growth zone, maturation zone, C and N metabolism, water soluble carbohydrates, NDF fibers.

MISE EN PLACE DU VOLUME ET DEPOT DE COMPOSES CARBONES ET AZOTES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA FEUILLE DE FETUQUE ELEVEE (*Festuca arundinacea* Schreb.)

La croissance foliaire est une composante du rendement particulièrement importante chez les graminées fourragères, tant sur le plan de la quantité que sur le plan de la qualité de la biomasse produite. Nous avons donc étudié la croissance foliaire du point de vue de la mise en place des dimensions et des flux de carbone et d'azote, depuis le moment où la feuille en croissance émerge des gaines des feuilles précédentes jusqu'à la fin de la croissance en longueur.

La largeur et l'épaisseur moyenne de la feuille varient de manière importante entre la base et la pointe de la feuille. La largeur d'un segment est générée dans la zone de croissance en longueur, et varie peu par la suite. L'épaisseur moyenne d'un segment est principalement mise en place dans la zone de croissance en longueur, mais elle augmente sensiblement dans la zone de maturation. Les caractéristiques locales de la croissance dans les trois dimensions (intensité et distribution longitudinale) ont ensuite été combinées aux caractéristiques de composition de la Matière Sèche (MS) : sucres non structuraux (NSC), fibres (NDF), azote, en vue d'une analyse dynamique des flux de carbone et d'azote dans les zones de croissance en volume, de maturation et les parties matures de la feuille. Trois modes de représentation ont été utilisés pour caractériser la distribution spatiale des flux de matière dans la feuille en croissance :

- Suivi des caractéristiques successives d'éléments matériels (segments) à partir de leur trajectoire et des profils de ces caractéristiques mesurées le long de la feuille.
- Calcul des taux de dépôt par unité de longueur, qui représentent les forces de puits d'un élément d'un millimètre de long pour différents substrats (MS, azote).
- Calcul des taux de dépôt par unité de volume, qui représentent l'activité métabolique d'un élément d'un millimètre cube de volume pour différents substrats.

Le dépôt de MS et d'azote est très élevé à la base de la zone de croissance. Nous avons montré que la diminution de l'activité de la zone de division, qui se produit relativement tôt au cours du développement foliaire, se traduit par une diminution du flux net par unité de volume de MS et d'azote. Néanmoins, la zone de croissance reste le puits principal pour le carbone et l'azote, quel que soit le stade de développement.

En conditions de nutrition azotée non limitante, la zone de maturation semble limitée en assimilats carbonés lors de l'émergence de la feuille. Lors de la transition progressive de puits à source de la feuille, cette limitation s'estompe. Le carbone nécessaire à la maturation semble donc en grande partie fourni par la partie de la feuille en croissance exposée à la lumière. Le dépôt d'azote dans la zone de maturation, bien que beaucoup moins intense que dans la zone de croissance, reste néanmoins important quel que soit le stade de développement.

L'ensemble de ces données doit permettre d'effectuer une comparaison complète de la croissance foliaire à différents niveaux de nutrition azotée (dimensions, activité de la zone de croissance et de la zone de maturation, existence du phénomène de recyclage de l'azote).

Mots clés : *Festuca arundinacea* (Schreb.), fétuque élevée, feuille (croissance, ontogenèse, développement, dimensions, anatomie), taux de croissance relatif, analyse cinématique, taux de dépôt, transition de puits à source, zone de croissance, zone de maturation, métabolisme C et N, sucres solubles, fibres NDF.

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

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur SCHNYDER Hans, Professeur, Université de Munich (Allemagne),
Monsieur TARDIEU François, Directeur de Recherches, INRA Montpellier.**

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

Mademoiselle MAURICE Isabelle

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

**"Mise en place du volume et dépôt de composés carbonés et azotés au
cours de la croissance de la feuille de fétuque élevée (*Festuca
arundinacea* Schreb.)".**


en vue de l'obtention du titre de :


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

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, **20 Octobre 1997**

Le Président de l'IN.P.L.,


J. HARDY



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

