



HAL
open science

Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres : application au noyer *Juglans regia* L.

Guillaume Charrier

► **To cite this version:**

Guillaume Charrier. Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres : application au noyer *Juglans regia* L.. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22111 . tel-00662461

HAL Id: tel-00662461

<https://theses.hal.science/tel-00662461>

Submitted on 24 Jan 2012

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. 2111

UNIVERSITE D'Auvergne
ANNEE 2011

***Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé Agronomie et
Environnement***

N° d'ordre 543

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal en vue de l'obtention du grade de

Docteur d'université

Discipline : Sciences de l'environnement
Spécialité : Ecophysiologie végétale

Soutenue le 14 Mars 2011

Guillaume CHARRIER

Mécanismes et modélisation de l'acclimatation au gel des arbres

Application au noyer Juglans regia L.

Devant la commission d'examen formée de :

Président :

Jean-Louis JULIEN, Professeur d'Université, UMR 547 PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand.

Membres :

Thierry AMÉGLIO, Directeur de Recherche INRA, UMR 547 PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand
(directeur de thèse).

Isabelle CHUINE, Chargée de Recherche CNRS, UMR 5175 CEFE CNRS-UMI-UMII-UMIII-
SupAgro-CIRAD-EPHE, Montpellier.

Jenny RENAUT, PhD, CRP Gabriel Lippman, Luxembourg.

Rapporteurs :

Erwin DREYER, Directeur de Recherche INRA, UMR 1137 EEF, INRA-UHP, Nancy.

Éric DUFRÊNE, Directeur de Recherche CNRS, UMR 8079 ESE Université Paris Sud-CNRS-
AgroParisTech, Orsay.



*L'automne colorait en jaune le feuillage des chênes, en rouge certains peupliers.
Les pins demeuraient impassibles au passage des saisons. Ils n'avaient cure de la
venue de l'hiver. Les arbres réagissaient par un hivernage de la sève. Celle-ci
désormais contenait ses avancées silencieuses et secrètes en attendant les élans du
printemps.*

(Dissidence de la broussaille, Rodolphe Christin)

Remerciements

Ecrire ces remerciements est à la fois un moment tant attendu et une page qui se tourne dans l'expectative de l'imprévu qui va s'écrire sur la suivante. Quoiqu'il en soit, c'est le moment ou jamais pour exprimer ce que le quotidien camoufle.

Ainsi, pour commencer et du fond du cœur, un gros merci collectif à tous les gens du PIAF, ce petit village rive droite de l'Artière laboratoire dont l'ambiance a été parfaite pour s'épanouir au cours de cette tranche de vie.

A tous ceux avec qui j'ai partagé le quotidien, également. Dans ce bureau, qui petit à petit a porté les séquelles de son occupation, du dragon au tableau blanc sans oublier de choisir Jésus. Donc, je n'oublierai pas ceux qui, lors des moments de travail mais également après ont été présent lors de ces moments :

A Renaud (qui a attendu la fin de ma thèse pour enfin finir sa truffade), à Mathieu (devenu un vrai biologiste maintenant, et même bioclimatologue écophysiologiste, n'oublie pas que tout a une fin, même la croissance des peupliers), à Fabiano (Dople Dotore, un abrazo mi amigo, muito obrigado por tudo), à Alex (n'oublie pas tes gants en sortant, les chatons se déshydratent tellement vite).

Cette thèse n'aurait pas eu la même portée sans l'aide précieuse qui m'a été apportée. Je ne l'oublierai pas. Merci, Christian, toi qui es maintenant vacciné du LT₅₀, Christophe qui le sera tôt ou tard. Merci à Brigitte, à Marc et également à Brigitte. Ces quelques dosages m'auront été très utiles. Merci à Pierre, à Stéphane pour leur présence.

Durant ce travail, il a fallu prendre du temps pour faire le point quelques fois, et les regards extérieurs apportés lors de réunion marathon m'auront été très utiles. Je voudrais donc remercier Agnès, André, Hervé, Isabelle, Marc, Philippe et Sylvain, pour leur patience devant l'étalage de tous ces résultats (car tous n'apparaissent pas dans ce manuscrit) ainsi que pour la pertinence de leurs commentaires.

A l'ensemble des gens qui ont traversé plus ou moins rapidement, plus ou moins éphémèrement le labo. Ana, David, Delphine, Estelle, Jean-Christophe, Jhing, Ludo, Magalie, Matthieu, Pemp, Sophie, Vince. A ceux qui n'ont pas encore fini leur séjour : Anaïs, Aude, Boutheina, David, Fai, Fanette, Hossam, Jun, Mélanie. Rémi. A ceux qui ne l'ont pas encore commencé : J-B...à celui qu'on attend encore, en fait.

A tous les pairs (maintenant) qui m'ont tant appris lors de discussion anodines, ou de fond. Aurélie, Bruno, Boris, Catherine, Einke, Eric, Flavio, Gabriel, Jean-Claude, Rémi, Tapani, Xavier, Yann... et j'en oublie.

Danke schöne Stefan für die empfang in die Institute für Botanik und dein tyrol. Danke schöne für die mittagspause group : Barbara, Erich, Jürgen, Daniela, Manuel.

A ma famille,

Aux Charentes, aux cagouilles et aux Charentais(es).

A Egide, (j'ai oublié pourquoi d'ailleurs).

A Agnès, Philippe, Sylvain, à J-B (peut-être viendras-tu un jour au PIAF qui sait ?)

À Camille, Mattev, Franco, Solène, Benj, Raymond Bar et tout ces gens croisés dans les nuits clermontoises.

Un merci à Carlos pour avoir lancé une vocation : « On lui souhaite bon courage ! »
Et aussi, je ne voudrais pas oublier le Marquis Bertrand de Moleville, l'ingénieur inventeur du sécateur, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu d'être.

...Et puis, à Katline...

A Isabelle Chuine, Jenny Renaut, Éric Dufrêne et Erwin Dreyer, Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A Jean Louis, merci de ta confiance.

Et puis un gros merci à Thierry pour cette aventure commune, avec tout ce qu'il a investi j'espère qu'il en est heureux.

Et à tous ceux qui se reconnaîtront.

Table des Matières

Introduction.....	13
Synthèse Bibliographique.....	17
1. Conditions environnementales durant la période hivernale	17
1.1. Quelques définitions	17
1.2. Bioclimatologie hivernale	21
1.3. Et les changements climatiques ?.....	24
2. Stress induit par le froid, le gel sur les plantes :.....	25
2.1. Effet des basses températures	26
2.1.1. Impact sur les membranes	26
2.1.2. Perturbations métaboliques	27
2.1.3. Echelle macroscopique	29
2.2. Effet du gel.....	29
2.2.1. Formation de la glace dans les tissus végétaux	30
2.2.2. Congélation intracellulaire	32
2.2.3. Stress secondaires engendrés par la congélation.....	34
2.2.4. Lésions macroscopiques.....	41
3. Mécanismes de résistance	43
3.1. Evitement du stress thermique :.....	44
3.1.1. Par évitement de l'aléa (production ou conservation de chaleur).....	44
3.1.2. Par évitement de l'exposition (phénologie).....	46
3.2. Résistance aux basses températures : Evitement de la contrainte due au froid	47
3.3. Résistance aux températures gélives.....	48
3.3.1. Evitement de la formation de glace	49
3.3.2. Tolérance à la glace	52
3.4. Résistance à l'embolie hivernale	53
4. Perception des signaux environnementaux.....	55
4.1. Température.....	55
4.2. Photopériode.....	58
4.3. Transduction des signaux.....	59
5. Dynamique de la réponse aux conditions hivernales	60
5.1. Phénologie	62
5.1.1. Arrêt de croissance et sénescence foliaire.....	62
5.1.2. Entrée en dormance des bourgeons.....	63
5.1.3. Levée de dormance.....	64
5.2. Résistance au gel.....	66
5.2.1. Initiation de l'endurcissement.....	67

5.2.2. Désendurcissement	73
5.2.3. Variabilité génétique.....	75
6. Implications écologiques de la résistance au gel.....	76
7. Modélisation de la biologie hivernale.....	79
7.1. Cycle annuel de développement	80
7.1.1. Modélisation de l'Endodormance.....	81
7.1.2. Modélisation du débourrement :	82
7.2. Résistance au gel.....	83
7.2.1. Relations empiriques entre température / évolution de la résistance	83
7.2.2. Relation résistance au gel / physiologie de l'acclimatation	84
7.3. Résistance au gel en fonction du cycle de développement.....	85
8. Relation biologie hivernale, changement climatique et aire de répartition.....	87
Objectifs de la thèse.....	91
Résultats et discussion.....	93
Résistance au gel et limite de distribution.....	93
Résistance au gel des cellules vivantes : variabilité spatio temporelle.....	98
Relation avec le cycle annuel de développement.....	104
Variations physiologiques lors de l'acclimatation / désacclimatation ...	108
Modélisation de l'humidité pondérale.....	113
Modélisation du métabolisme carboné	116
Prédiction de la vulnérabilité au gel	118
Conclusions et perspectives	121
Références Bibliographiques	124
Article 1 : Limite altitudinale potentielle des arbres et résistances au gel	141
Article 2 : Mécanismes physiologiques de l'acclimatation au gel du noyer	159
Article 3 : Risques de dommages liés au gel : identification des périodes critiques.....	173
Article 4 : Impact de la chute des feuilles sur la capacité à s'acclimater au gel du noyer	183
Article 5 : La sortie de dormance et l'acclimatation au gel chez le noyer sont- elles sous contrôle environnemental et/ou génotypique ?.....	191
Article 6 : Modélisation de la résistance au gel du noyer au cours de l'hiver	203

Table des figures

Synthèse Bibliographique :

Figure 1.1. Agencement tridimensionnel de molécules d'eau en fonction de la température avec, en pointillé les transitions entre les différents états de la matière.

Figure 1.2. Température et changement d'état au cours de la congélation et de la décongélation d'eau pure (a) et d'une solution aqueuse (b). NT : Température de Nucléation, SC : Surfusion, FP : point de congélation, MP : point de fusion, Δ : Dépression du point de fusion (d'après Sakai & Larcher, 1987).

Figure 1.3. Courbe d'équilibre d'une solution de chlorure de sodium en fonction de la température (θ) Lorsqu'une solution $[\text{NaCl}] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$ est placée à -10°C , sa température s'abaisse d'abord jusqu'à $-2,5^\circ\text{C}$ (point α) ; de la glace se forme et la solution se concentre progressivement jusqu'au point d'équilibre β . Un refroidissement ultérieur produit une nouvelle formation de glace. La concentration en chlorure de sodium peut augmenter jusqu'au point eutectique EU (5,4 mol), où la glace cesse de se former ; les nouveaux cristaux qui apparaissent sont constitués du mélange eutectique ($\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$). Pour des solutions plus concentrées, c'est le sel qui précipite le premier. Ce schéma indique les 5 mélanges qui peuvent exister en fonction de la température et de la concentration en NaCl (d'après Derreudre & Gazeau, 1992).

Figure 1.4. Bilan énergétique moyen de la terre ; Set : Energie solaire entrante, Sr : Energie réfléchiée par l'atmosphère, Src : Energie réfléchiée par les nuages, Srs : Energie réfléchiée par la surface terrestre, Sa : Energie absorbée, Lus : Energie émise par la surface terrestre, La : Energie absorbée par l'atmosphère, Ld : Energie réémise vers la surface terrestre par les nuages et l'atmosphère, Luw : Part de l'énergie émise par la surface terrestre qui part vers l'espace extraterrestre directement. Lu : Energie émise par l'atmosphère et les nuages (d'après Woodward, 1987).

Figure 1.5. Températures minimales de différentes parties d'un bananier, de l'air et du sol durant un évènement de refroidissement radiatif (d'après Shmueli, 1960).

Figure 1.6. Prédiction d'évolution de la distribution des températures (source IPCC).

Figure 1.7. Système lamellaire de mélanges de phospholipides : $L\alpha$ chaînes aliphatiques désordonnées, fluide (hautes températures) ; $L\beta$ chaînes aliphatiques rigides (basses températures). $L\gamma$: Séparation de phases de composition différentes aux températures intermédiaires (d'après Côme et al., 1992).

Figure 1.8. Diagrammes d'Arrhenius pour l'oxydation du succinate par des extraits de mitochondries chez des plantes sensibles (en haut) ou résistantes au froid (en bas) (d'après Lyons & Raison, 1970).

Figure 1.9. Cellule végétale à température ambiante (a), congelée, en plasmolyse (b) et après décongélation, les membranes biologiques lysées (c) (d'après Molish, 1897).

Figure 1.10. Effet de la vitesse de congélation sur la survie d'une cellule. Lorsque la vitesse est lente, l'exosmose est importante et la concentration du cytosol devient lésante. Lorsqu'elle est rapide, on observe la formation de glace intracellulaire (d'après Muldrew et al., 2004).

- Figure 1.11.** Humidité pondérale et indice de sécheresse relative (Déficit hydrique / déficit à partir du quel apparaissent les premiers dommages) en fonction de la position sous le couvert neigeux pour des plantes en limite altitudinale (d'après Larcher, 1963).
- Figure 1.12.** Modification de volume et comportement des membranes en situation de gel/dégel. Contraction générant des vésicules d'endocytose (A et B). Contraction générant des extrusions exocytiques et capacité pour ces extrusion à disparaître au dégel (C) ou non (D) (d'après Uemura et al., 2006).
- Figure 1.13.** Quantités d'eau non congelable en fonction de la température (T) dus à des effets osmotiques et d'hydratation dans un système contenant des membranes (lignes épaisses), des macromolécules (cercles gris), des solutés (S), de l'eau (blanc) et de la glace (gris). La présence de solutés et de surfaces hydrophiles abaisse la température de congélation (T_f) à des températures négatives. Quand $T < T_f$, le potentiel chimique de l'eau non congelable peut être abaissé au niveau de celui de la glace par deux effets : concentration en solutés dans la phase liquide et la succion engendrée par les forces d'hydratation entre surfaces hydrophiles (d'après Wolfe et al., 2002).
- Figure 1.14.** Formation d'embolie au sein d'un vaisseau par formation de bulles de gaz quand la sève gèle (2) qui peuvent emboliser ou non le vaisseau en fonction de la taille de la bulle et de la tension de la sève au dégel (3 puis 4). T : Température, P_g Pression de la phase gazeuse, P_l pression de la phase liquide (d'après Cruziat et al., 2002).
- Figure 1.15.** Pourcentage de perte de conductivité après un cycle gel dégel en fonction du diamètre hydraulique des éléments conducteurs du xylème (d'après Davis et al., 1999).
- Figure 1.16.** Coupe transversale d'un tronc d' *Abies sacchalinensis* ayant subi une gélivure (d'après Sakai & Larcher, 1987).
- Figure 1.17.** Inflorescence de *Symplocarpus foetidus* perçant la glace au printemps (d'après <http://www.lookfordiagnosis.com>).
- Figure 1.18.** Niveaux de résistances au gel observés dans les différents types morphologiques définis selon la classification de Raunkier. Les parties persistantes en hiver sont en noir (d'après Sakai & Larcher, 1987).
- Figure 1.19.** Différents mécanismes de résistance à la formation d'embolie hivernale (d'après Cruziat et al., 2002).
- Figure 1.20.** Mécanismes de perception et de réponses cellulaires à la température (d'après Ruelland & Zachowski, 2010).
- Figure 1.21.** Evolution de l'état de dormance des bourgeons et de tolérance au gel lors de l'année avec les signaux environnementaux moteurs lors de chaque étape (d'après Welling & Palva, 2006).
- Figure 1.22.** Voie Métabolique de dégradation de l'amidon en saccharose et polyols avec l'effet des températures chaudes (en rouge) ou froides (en bleu) sur l'expression de chacune des enzymes impliquée (U Activation, D inhibition). (d'après Guy et al., 2008).
- Figure 1.23.** Résistance au gel et contenu en sucres chez *Robinia pseudoacacia*, les sucres sont représentés en teneur (cercles blancs) ou en équivalent osmotique (cercles noirs) d'après Yoshida & Sakai, 1968.

Figure 1.24. Températures observées et résistances au gel en fonction de la date calendaire ou du stade phénologique pour trois provenances extrêmes au sein de l'aire de répartition de *Fraxinus ornus* (d'après Larcher & Mair, 1968).

Figure 1.25. Evolution de la limite des neiges éternelles (« Snowline ») et la limite des arbres (« Treeline ») en fonction de la latitude (d'après Körner, 2003).

Figure 1.26. Relation entre température de formation d'un exotherme avec la distribution latitudinale chez *Quercus rubra* (a), *Populus tremuloides* (b) ou avec la limite altitudinale potentielle (d'après Burke et al., 1976 et Kaku & Iwaya, 1979)

Figure 1.27. Unités de Froid (« Chilling Units ») en fonction de la température selon différents modèles usuels de levée d'endodormance.

Résultats et discussion :

Figure 2.1. a) Relation entre limite altitudinale potentielle et pourcentage de perte de conductivité hydraulique après soit 1 seul cycle gel/dégel (à l'automne) ou la valeur maximale observée durant l'hiver chez 11 espèces communes d'arbres européens, b) Relation entre le pourcentage de perte de conductivité après 1 cycle gel/dégel et le diamètre hydraulique des vaisseaux chez les mêmes espèces (Charrier *et al.*, en révision).

Figure 2.2. a) Relation entre limite altitudinale potentielle et LT₅₀ (température létale pour 50% des cellules) minimales durant l'hiver chez 11 espèces communes d'arbres européens, b) Relation entre la LT₅₀ minimales et la quantité de glucides non structuraux à l'automne chez les mêmes espèces (Charrier *et al.*, en révision).

Figure 2.3. Résistance au gel dans différents organes de jeunes noyers (*J.regia* L.) : racines fines, grosses racines, pivot, tronc et rameaux, prélevés à l'automne, en hiver et au printemps lors de 3 années différentes. Les barres indiquent l'erreur standard, et des lettres différentes des différences significatives entre années pour un organe donné.

Figure 2.4. Evolution de la résistance au gel dans différents tissus de rameaux de l'année de noyers adultes : bois, écorce, rameau entier, bourgeons (distinction entre apicaux et latéraux au débourrement). Les symboles représentent la moyenne et les barres l'erreur standard de 5 répétitions.

Figure 2.5. Résistance au gel des bourgeons terminaux en fonction de leur stade phénologique prélevés au cours de l'avancée de leurs cycles de développement chez 3 variétés de noyer européens Chandler et Franquette et des hybrides *J.regia x nigra*.

Figure 2.6. a) Températures minimales observées durant la période 1985-2010 en plaine (ligne fine) et moyenne montagne (ligne épaisse) b) Températures minimales observées lors de l'hiver 2008-2009 dans les mêmes sites c) Résistance au gel observées chez différentes variétés de noyer (Hybrides tardifs : carrés, Hybrides précoces : cercle, Franquette : triangle, et Lara : Losange) en plaine (ligne pointillée, symboles blancs) et en moyenne montagne (ligne pleine, symboles pleins) et dans les bourgeons de Franquette en plaine (Bourgeons apicaux : croix à 8 branches, bourgeons latéraux : croix à 4 branches). Au débourrement, les bourgeons apicaux et latéraux sont distingués. Chaque point représente la moyenne et les barres l'erreur-standard de 5 échantillons.

Figure 2.7. Evolution de la résistance au gel de différentes variétés de noyer (Franquette, Lara, Hybride précoce et Hybride Tardif) en plaine (alt: 340m, pointillé)

et moyenne montagne (alt: 870m, trait plein) en fonction des unités de froid calculées selon le modèle de Landsberg accumulées à partir du 15 Septembre. Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Figure 2.8. Relation entre dates de débourrement simulées et dates observées pour différentes variétés de noyer en plaine et moyenne montagne aux alentours de Clermont-Ferrand.

Figure 2.9. Relation entre humidité pondérale et résistance au gel dans différents organes et tissus de Noyer. Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Figure 2.10. Relation entre contenu en sucres solubles et résistance au gel dans différents organes et tissus de noyer en excluant les échantillons prélevés en été (a) ou exprimés selon différentes classes d'humidité pondérale incluant les échantillons prélevés en été (b). Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Figure 2.11. Relation entre résistance au gel observée et simulée pour différents tissus des organes aériens de noyer lors de la calibration du modèle de prédiction en fonction de l'humidité pondérale et du contenu en sucres solubles.

Figure 2.12. Evolution hivernale chez de jeunes noyers en conditions de sénescence naturelle (gauche, cercles) et anticipée (droite, triangles) de l'humidité pondérale (c et d), du contenu en sucres solubles (g et h) et de la résistance au gel (i et j) pour le témoin (noir), en conditions extérieures (gris) et privés de froid (blanc). Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Figure 2.13. Relation entre humidité pondérale minimale et la quantité maximale de sucres solubles observés durant l'hiver pour différents traitements de défoliation ou température chez de jeunes noyers.

Figure 2.14. Relation entre humidité pondérale observée et humidité pondérale simulée selon le modèle.

Figure 2.15. Cinétique d'évolution de l'humidité pondérale chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés bleus indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d'endodormance et de débourrement, respectivement.

Figure 2.16 Relation entre contenu en sucres solubles observé et simulé selon le modèle.

Figure 2.17. Cinétique d'évolution du contenu en sucres solubles chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés orange indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d'endodormance et de débourrement, respectivement.

Figure 2.18 Architecture du modèle : composé de 3 sous modèles : Cycle annuel avec comme variable d'entrée T_{air} (Température de l'air, simulant les dates de levée d'endodormance et de débourrement), Contenu en eau, dirigé par 2 processus absorption (variable d'entrée T_{-50} : température du sol à 50cm de profondeur) et Evaporation (Variable d'entrée ETP : Evapotranspiration potentielle) et sous modèle

Contenu en sucres simulant une interconversion entre l'amidon et les sucres solubles. (variable d'entrée T_{air} et modulé par l'état de développement dans le cycle annuel et par l'humidité pondérale). Seuls les sorties des sous modèles humidité pondérale et contenu en sucres sont utilisées pour prédire la résistance au gel, respectivement, négativement et positivement. Les flèches grises représentent les perspectives d'évolution de l'architecture pour prédire l'état d'avancement dans le cycle annuel en fonction du contenu en eau et en sucres solubles (directement ou par l'intermédiaire de la résistance au gel).

Figure 2.19 Relation entre résistance au gel observée et simulée selon le modèle.

Figure 2.20. Cinétique d'évolution de la résistance au gel chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés orange indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d'endormance et de débourrement, respectivement.

Tableau 2.1. Dates de débourrement des bourgeons apicaux (A) et latéraux (L) chez différentes variétés de noyers européens (Chandler, Franquette, Lara et Serr) et hybrides entre noyer européen et américain (précoces et tardifs) exprimés en jours juliens \pm écart-type; des lettres différentes indiquent des différences significatives au sein de la même année et site. Dans les deux dernières colonnes sont indiquées les heures de froid nécessaire pour lever l'endormance et le délai moyen de débourrement à 25°C un fois l'endormance levée.

Introduction

Les basses températures, et notamment le gel, constituent l'un des facteurs majeurs limitant l'aire potentielle de répartition des végétaux. En effet, la croissance, la capacité photosynthétique, la capacité du xylème à conduire la sève brute et la survie sont fortement limitées par ce facteur. De ce fait, les végétaux pérennes ont développé des mécanismes d'acclimatation afin de supporter les risques de gel lors des périodes où ils sont les plus fréquents et intenses. Malgré cette capacité à développer une résistance, le gel peut provoquer des dommages importants lors des phases de transitions entre période végétative et période de repos hivernal. En effet, à ces périodes, le niveau de résistance peut être plus faible que l'intensité des gels rencontrés.

Ce mécanisme d'acclimatation se déroule en étroite relation avec les conditions environnementales : déclenché par la diminution de la photopériode à la fin de l'été, puis, par la suite, par les basses températures. A la fin de l'hiver, la remontée des températures provoque une diminution de cette résistance au gel. Concomitamment, on observe une phase d'inhibition de la croissance des bourgeons, la dormance, sous contrôle des mêmes signaux environnementaux et permettant aux arbres de ne pas exposer de jeunes feuilles particulièrement fragiles à une période peu favorable à leur fonction : la photosynthèse.

De ce fait, l'évolution future des températures telles que prédite par le GIEC (2007) pourrait fortement influencer les niches climatiques potentielles des espèces végétales. Au niveau de leurs marges chaudes (limite méridionale ou de basses altitudes de leur niche climatique) pourrait être observée, par exemple, une insuffisance des besoins de froid pour lever la dormance. Par ailleurs, au niveau de leurs marges froides (limite septentrionale ou de hautes altitudes), des températures plus chaudes pourraient engendrer un débourrement accéléré impliquant une augmentation des risques d'exposition aux gels tardifs, une acclimatation ralentie et une désacclimatation accélérée. Différentes études ont été publiées récemment sur l'impact de ces changements globaux sur les cycles annuels de croissance, ou sur l'évolution de l'état d'acclimatation au gel essentiellement par l'intermédiaire de relations directes entre température et évolution de la résistance au gel ou de la dormance.

Outre la relation directe avec les conditions environnementales, le mécanisme d'acclimatation est un phénomène actif, nécessitant la mobilisation des réserves, notamment de l'amidon stocké au cours de la période d'activité photosynthétique. De nombreuses études

Introduction

ont montré le lien entre résistance au gel et contenu en eau et en sucres solubles, et il a été récemment publié un modèle permettant de prédire la résistance au gel en fonction du contenu en eau, en sucres solubles et des températures. Ainsi, un stress subi au cours de la période estivale peut, sans être létal, avoir des conséquences différées quant à la résistance vis-à-vis du gel, l'hiver suivant, en limitant les capacités d'endurcissement.

Dans ce contexte-là, il apparaît donc important de pouvoir prédire l'évolution de la résistance au gel, à partir de variables climatiques uniquement, afin d'utiliser en variables d'entrées, les sorties des modèles d'évolution climatique, mais en utilisant une approche intégrant les mécanismes physiologiques de l'acclimatation au gel, en tant que variables intermédiaires. L'objectif de ce travail est de développer cette approche, en caractérisant l'évolution du contenu en eau et du contenu en sucres solubles en fonctions de variables climatiques.

Ce travail s'articule autour de 6 projets de publications. Dans un premier temps, la réponse de différentes espèces aux contraintes engendrées par le gel a été caractérisée en terme de sensibilité à l'embolie hivernale, à la lyse cellulaire ainsi qu'en terme de besoins de température nécessaire au débourrement. Ces capacités de résistances (cellules vivantes et système vasculaire) ont été caractérisées et mises en relation avec la limite altitudinale potentielle de chaque espèce, trait phénotypique sous le contrôle des basses températures essentiellement (Article 1).

Cette étude ayant permis de sélectionner une espèce modèle, le noyer *Juglans regia* L., il nous a paru important de caractériser les variations spatio-temporelles de sa sensibilité et les modifications physiologiques déclenchées (Article 2). Ceci permis d'estimer les risques relatifs à cette espèce dans les conditions environnementales actuelles, notamment les périodes critiques vis à vis du climat au regard de l'évolution de la résistance au cours de l'hiver (Article 3).

Puis, différents conditionnements ont été réalisés sur de jeunes arbres en contrôlant la température (froides ou douces) et le contenu en eau de la plante (par défoliation plus ou moins précoce) afin de mieux caractériser les interactions entre climat, contenu en eau, en sucres et leurs impacts sur la résistance au gel (Article 4).

La relation entre les dynamiques d'acclimatation et de dormance a également été étudiée entre différentes variétés de noyer afin de mettre en évidence la part des déterminismes environnemental et génétique dans ces processus (Article 5).

Enfin, à partir des conclusions principales tirées de l'ensemble de ces données, un modèle prédictif de la dynamique de dormance et de l'évolution de la résistance au gel en

Introduction

fonction de variables environnementales (température de l'air, du sol et évapotranspiration potentielle) a été élaboré (Article 6).

Ce modèle permet un couplage avec d'autres modèles prédisant la physiologie en période estivale et ainsi, peut faire l'objet de simulations en fonction de paramètres climatiques futurs, prédire la vulnérabilité de cette espèce et l'évolution potentielle de son aire de répartition.

Synthèse Bibliographique

1. Conditions environnementales durant la période hivernale

Préalablement à l'étude de l'effet des conditions hivernales sur les végétaux, la définition de ces conditions semble nécessaire d'un point de vue physique, notamment sur le solvant biologique, l'eau. Puis pour comprendre les variations des conditions environnementales, quelques notions de climatologie seront abordées.

1.1. Quelques définitions

Qu'est ce que la température ? Il s'agit d'une grandeur physique caractérisant l'agitation thermique des particules au sein d'un système défini. En effet, aux échelles atomique et moléculaire, on observe une agitation permanente sous forme d'un mouvement brownien (*i.e.* électrons autour du noyau ou molécules en phase liquide ou gazeuse), pour peu que la température soit supérieure au 0 absolu (0K, -273,15 °C). Cette agitation est d'autant plus rapide que la température est élevée. Ainsi, selon ce degré d'agitation, les différents états physiques de la matière sont engendrés (Figure 1.1) :

- molécules très espacées et agitées : état gazeux,
- molécules plus rapprochées, agitation plus faible : état liquide
- arrangement entre molécules stable avec une vibration autour d'une position moyenne : état solide.

L'unité de mesure de la température est le Kelvin (Système International depuis 1954) dont l'origine (appelé 0 absolu) correspond à une agitation moléculaire nulle, +273,15K à la transition d'état solide/liquide de l'eau pure et +373,15K à la transition liquide/gaz à la pression atmosphérique moyenne (1013 hPa). Cette agitation thermique est une énergie cinétique qui peut donc être transférée d'une molécule à une autre par chocs aléatoires et successifs. On considère trois modes de transfert de la chaleur : la conduction par contact, la convection par déplacement d'un corps avec l'énergie qu'il contient et le rayonnement par émission de rayons lumineux (Monteith, 1972).

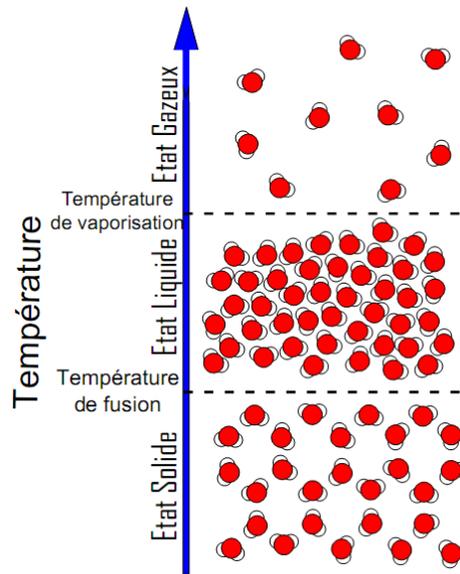


Figure 1.1. Agencement tridimensionnel de molécules d'eau en fonction de la température avec, en pointillé les transitions entre les différents états de la matière.

Le froid n'est qu'une grandeur relative soumise à l'appréciation de l'observateur. On peut le définir comme étant un état thermodynamique pour lequel les molécules ont une faible énergie cinétique et l'on considère généralement qu'une température inférieure à 5°C est froide, du moins en biologie. La notion de gel, elle, n'est utilisée que lorsque la température est inférieure à la température de cristallisation de l'eau pure. En deçà de cette température, l'eau passe de l'état liquide (arrangement désordonné des molécules) à l'état solide (arrangement ordonné par établissement de 4 liaisons hydrogènes par molécule d'eau formant une structure cristalline) sous forme de glace ou de neige.

La formation de cristaux de glace ne peut s'effectuer que s'il existe un point de nucléation permettant la formation d'une structure cristalline des molécules d'eau et sur lesquelles peuvent s'établir des liaisons hydrogènes. Tant que les molécules d'eau ne rencontrent pas de point de nucléation, elles peuvent rester à l'état liquide à des températures très inférieures à 0°C (Muldrew *et al.*, 2004), ce que l'on appelle un état de surfusion (ou « supercooling »).

On distingue deux types de nucléation : hétérogène et homogène. La nucléation hétérogène a lieu lorsqu'une particule constitue le point initiateur de la cristallisation, cela peut-être une irrégularité de paroi, une bactérie (INA : Ice Nucleation Active bacteria ; Guy, 2003) ou tout autre particule (organites, macromolécules) avec lesquelles les molécules d'eau peuvent établir des liaisons hydrogène stables. Cette nucléation intervient généralement à des températures comprises entre 0 et -8°C. La nucléation homogène est, elle, initiée exclusivement par des molécules d'eau. Dans ce cas, la température doit être beaucoup plus

basse ; jusqu'à -38°C pour de l'eau pure, température qui constitue ce qu'on appelle le point de nucléation homogène (Fletcher, 1970 ; Rasmussen & Mc Kenzie, 1972). En solution, les molécules d'eau interagissent par établissement de liaisons hydrogène transitoires et, plus la température diminue, plus la durée d'existence de ces liaisons augmente. Lorsque les molécules commencent à s'agréger en couches, elles forment des agglomérats. La cristallisation s'initie lorsque ces agglomérats atteignent une taille critique de 1,13 nm de diamètre, soit environ 190 molécules (Sakai & Larcher, 1987).

Les molécules d'eau, en passant de l'état liquide (instable) à l'état solide (plus stable), créent des liaisons intermoléculaires, et cette augmentation de la stabilité s'accompagne d'un dégagement de chaleur latente (80 cal.g^{-1}) observable par l'augmentation transitoire de la température, appelé exotherme (Figure 1.2). A l'inverse, lors de la fusion, il y a rupture des liaisons entre molécules qui est une réaction endothermique. Ainsi, si l'on congèle un liquide, la température va diminuer jusqu'à la température de nucléation, puis la création des liaisons au sein du cristal réchauffe le milieu réactionnel (exotherme de formation de la glace).

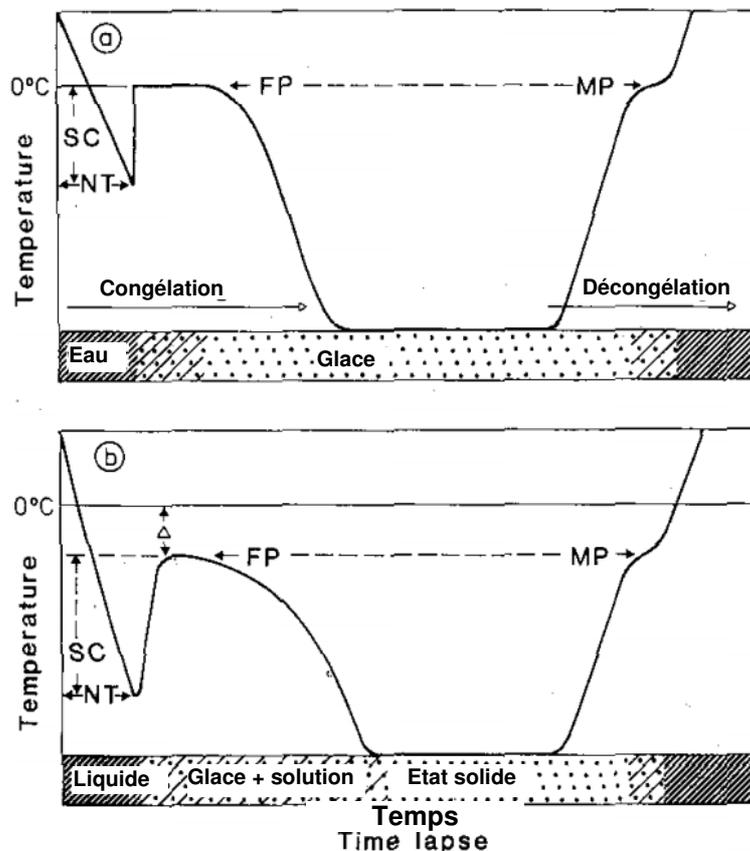


Figure 1.2. Température et changement d'état au cours de la congélation et de la décongélant d'eau pure (a) et d'une solution aqueuse (b). NT : Température de Nucléation, SC : Surfusion, FP : point de congélation, MP : point de fusion, Δ : Dépression du point de fusion (d'après Sakai & Larcher, 1987).

Si l'on considère, non plus de l'eau pure mais un liquide biologique qui contient de nombreux solutés, le comportement diffère un peu. Sachant que, les molécules solubilisées dans le solvant aqueux vont interagir en créant des liaisons faibles avec les molécules de solvant, la présence de solutés induit la nécessité d'une température plus basse pour former des liaisons cristallines entre molécules d'eau, ce phénomène est appelé dépression du point de fusion (Mazur, 2004). Ainsi, pour une solution diluée, la dépression du point de fusion créée est :

$$\Delta T = \left(\frac{R \times T_m^2}{\Delta H_{fus}} \right) \times XB$$

où ΔT : dépression du point de fusion ; R : la constante des gaz parfaits ; T_m : température de fusion du solvant pure ; ΔH_{fus} enthalpie de fusion du solvant ; XB concentration du soluté).

Généralement, on considère, en cryobiologie, que la dépression du point de fusion est de $1,86^\circ\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ceci implique qu'un liquide physiologique contenant de 0,5 à 1 mole de solutés voit son point de fusion abaissé de quelques degrés au maximum.

Lorsqu'il y a congélation d'une solution diluée, le solvant forme une structure cristalline pure en expulsant le soluté dans la phase liquide résiduelle abaissant proportionnellement son point de fusion. A l'équilibre, le potentiel chimique de la glace est égal à celui de l'eau liquide en contact. Et, si la température diminue encore, le solvant en phase liquide va être de plus en plus concentré, son point de fusion de plus en plus bas,

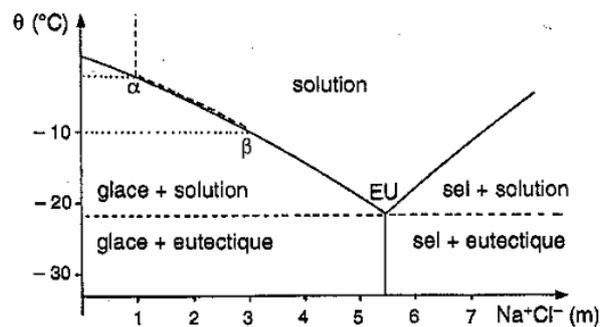


Figure 1.3. Courbe d'équilibre d'une solution de chlorure de sodium en fonction de la température (θ) Lorsqu'une solution $[\text{NaCl}]=1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est placée à -10°C , sa température s'abaisse d'abord jusqu'à $-2,5^\circ\text{C}$ (point α) ; de la glace se forme et la solution se concentre progressivement jusqu'au point d'équilibre β . Un refroidissement ultérieur produit une nouvelle formation de glace. La concentration en chlorure de sodium peut augmenter jusqu'au point eutectique EU (5,4 mol), où la glace cesse de se former ; les nouveaux cristaux qui apparaissent sont constitués du mélange eutectique ($\text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$). Pour des solutions plus concentrées, c'est le sel qui précipite le premier. Ce schéma indique les 5 mélanges qui peuvent exister en fonction de la température et de la concentration en NaCl (d'après Derreudre & Gazeau, 1992).

jusqu'à une température à laquelle l'ensemble de la solution va cristalliser, le point eutectique (Figure 1.3). Ce point eutectique est le point de fusion d'un mélange de deux corps ayant le comportement d'un corps pur, autrement appelé un eutectique (Muldrew *et al.*, 2004).

1.2. Bioclimatologie hivernale

Dans tout système, selon le premier principe de la thermodynamique, il y a conservation de l'énergie. On retrouve cet équilibre entre la géosphère et l'espace ; l'énergie absorbée sous forme de radiations solaires étant égale à l'énergie émise vers l'espace. Néanmoins, il existe des contrastes importants au sein du système géosphère entre les différents compartiments (*i.e.* atmosphère vs lithosphère) qui conduisent à des évolutions des conditions environnementales selon des gradients spatio-temporels. Environ la moitié de l'énergie solaire arrivant au niveau de l'atmosphère (1360 W.m^{-2}) est absorbée par la surface terrestre (47%), 27% sont réfléchis (directement, par le couvert nuageux ou par la surface terrestre) et 26% absorbée par l'atmosphère (Figure 1.4). Cette situation ne peut pas être stable car chaque corps, ayant une température supérieure à 0K, émet des radiations proportionnellement à sa température de surface. L'énergie absorbée est réémise sous forme de radiations de longueurs d'ondes plus longues (supérieures à 4000 nm soit essentiellement dans le domaine des infrarouges ; Nobel, 1987). Une quantité supérieure à l'énergie solaire entrante est émise par la surface terrestre (111%) dont une majeure partie est directement renvoyée à la surface terrestre (96%) par ce que l'on appelle l'effet de serre. Et, seulement 73% de l'énergie entrante est renvoyée vers l'espace en provenance de l'atmosphère. Des différences importantes dans la quantité d'énergie entrante existent selon la latitude (moyenne annuelle comprise entre 400 W.m^{-2} à l'équateur et 200 W.m^{-2} aux pôles ; Woodward, 1987).

On observe une évolution similaire de l'équateur vers les latitudes élevées, ou de l'été à l'hiver. En effet, l'angle d'incidence des rayons lumineux est perpendiculaire à l'équateur et diminue avec la latitude alors que l'épaisseur de la couche atmosphérique traversée, elle, augmente. Entre été et hiver, on observe également la même tendance. Ainsi la quantité d'énergie solaire entrante diminue fortement. Par exemple, -80% entre été et hiver à Kew Garden ($51,5^\circ\text{N}$) : de $40,4 \text{ MJ.m}^{-2}$ en été à $8,7 \text{ MJ.m}^{-2}$ en hiver (Monteith & Unsworth, 1990).

Des gradients sont également observés à l'échelle locale à cause, par exemple, de variations topographiques (*i.e.* exposition Nord (ubac) / Sud (adret)), de variation du couvert nuageux (qui renvoie environ 90% de l'énergie radiative émise par le sol), de la présence d'un

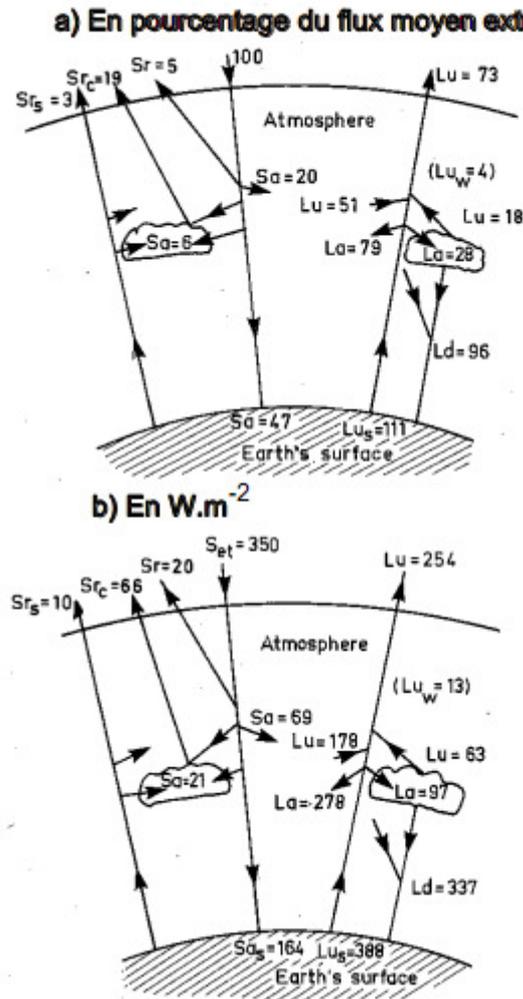


Figure 1.4. Bilan énergétique moyen de la terre ; S_{et} : Energie solaire entrante, S_r : Energie réfléchiée par l'atmosphère, S_{rc} : Energie réfléchiée par les nuages, S_{rs} : Energie réfléchiée par la surface terrestre, S_a : Energie absorbée, L_{us} : Energie émise par la surface terrestre, L_a : Energie absorbée par l'atmosphère, L_d : Energie réémise vers la surface terrestre par les nuages et l'atmosphère, L_{uw} : Part de l'énergie émise par la surface terrestre qui part vers l'espace extraterrestre directement. L_u : Energie émise par l'atmosphère et les nuages (d'après Woodward, 1987).

couvert neigeux qui peuvent affecter l'albédo (rapport entre l'énergie solaire réfléchiée et l'énergie solaire incidente). Bootsma (1976) a relevé une différence de température de $6^{\circ}C$ entre une cuvette et un sommet distants d'1 km dans un paysage collinéen. Ces différences de températures relevées dépendent de la nature du terrain et de la possibilité pour l'air froid de sortir des dépressions (vallées vs cuvettes). L'énergie radiative émise par le sol étant relativement constante (25 à $30 MJ.m^{-2}$ journalier à Hamburg ; Monteith & Unsworth, 1990), un couvert nuageux aura un effet différent selon la saison. En été, l'effet principal sera de diminuer l'énergie arrivant au sol alors qu'en hiver, il aura plutôt l'effet inverse, limitant la réflexion de l'énergie radiative ascendante et, donc, le refroidissement radiatif.

Un autre facteur influençant fortement l'albédo (notamment en altitude et en milieu continental) est la neige, qui est une forme de précipitation. Elle est observée lorsque dans un

nuage, des molécules d'eau cristallisent autour d'un point de nucléation. Si tout au long de leur chute, la température est inférieure à 0°C, ils s'agrègent les uns aux autres pour former des flocons. Au sol, ils forment une couche plus ou moins dense qui peut réfléchir jusqu'à 98% des rayons lumineux. Le manteau neigeux, composé de multiples couches de flocons et d'air exerce un effet isolant ($0,05 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ en moyenne), permettant de maintenir une température du sol positive. Le manteau neigeux peut même constituer une protection thermique permettant une différence de 30°C entre la température de l'air et celle du sol (Ylimaki, 1962).

La température de l'air influe sur la température du végétal (Figure 1.5). Un organe végétal s'équilibre en général rapidement avec son environnement proche (i.e. bourgeons de pommiers en 10-20 minutes, Pisek, 1958). Les parties souterraines resteront relativement protégées par l'effet isolant et l'inertie thermique au sein du sol et ce, d'autant plus que son humidité est importante (Kreutz, 1942). Mais les parties aériennes, pour leur part, seront plus exposées aux variations de températures. A l'échelle d'un couvert végétal, les températures les plus froides sont en général relevées à l'interface végétation/atmosphère (Tappeiner, 1985). Et la canopée, en limitant la perte thermique radiative, limite les risques de températures gélives dans le sous bois. En revanche, la réaction d'évaporation de l'eau à partir des tissus est endothermique ; elle abaisse leur température, ainsi la température du végétal est généralement inférieure de 1 à 3°C à la température de l'air environnant (Cannell & Smith 1986 ; Sakai & Larcher, 1987).

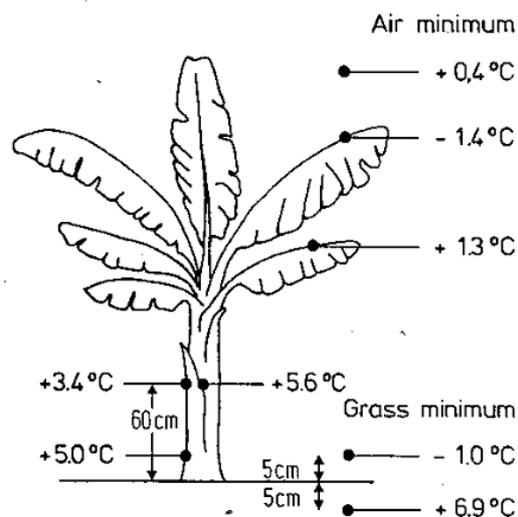


Figure 1.5. Températures minimales de différentes parties d'un bananier, de l'air et du sol durant un événement de refroidissement radiatif (d'après Shmueli, 1960).

La température des organes aériens d'une plante sera dépendante essentiellement de l'heure de la journée, de l'époque de l'année, de la présence d'un couvert nuageux, de la vitesse du vent, de la position dans la canopée, de la hauteur par rapport au sol ainsi que du ratio surface/volume. Concernant les racines, l'heure de la journée et l'époque de l'année ont une influence non négligeable mais sa profondeur dans le sol et les propriétés influençant sa balance énergétique (humidité, densité, couleur, épaisseur de la litière, du couvert neigeux) sont à prendre en compte également. Ces conditions ne sont pas homogènes mais constituent une mosaïque complexe de microclimats qui influencent, chacun, une partie de la plante ou du couvert (Fitter & Hay, 1987). L'ensemble de ces éléments est à prendre en considération dans l'évolution des conditions environnementales et dans l'étude de leur impact sur la physiologie des plantes pérennes.

1.3. Et les changements climatiques ?

Selon le rapport du GIEC, à l'échelle globale, onze des douze années, durant la période 1995-2006, ont figuré parmi les douze années les plus chaudes depuis le début de l'enregistrement des températures (1850). On observe une élévation du niveau des mers en accord avec la tendance de réchauffement. De plus, une nette diminution des surfaces couvertes par les neiges (couvert neigeux et glaciers) d'environ 6% est observée depuis les années 1980. Le GIEC estime très probable une diminution du nombre de journées froides, de nuits froides et de gel sur les terres émergées depuis 50ans (IPCC, 2007).

Ces variations de température ne sont expliquées par des modèles climatiques qu'en intégrant des forçages naturels (excentricité de l'orbite, obliquité de l'axe, précession des équinoxes, activité solaire, volcanique) et anthropiques (augmentation des gaz à effet de serre, notamment). En effet, si l'on considère les forçages naturels uniquement, les températures auraient dû refroidir durant les cinquante dernières années. Ainsi, il est probable que les activités anthropiques soient la cause d'évènements climatiques extrêmes (chauds et froids) plus fréquents. Mais, à cause de la multitude de facteurs interagissant au sein du système climatique, l'ensemble des conséquences engendrées sur les systèmes physiques et biologiques par ce réchauffement ne pourra être estimé qu'à travers une durée plus importante des études d'impact (IPCC, 2007).

Sous l'effet de températures moyennes plus élevées, la diminution de surface du couvert neigeux risque de constituer une rétroaction climatique car la diminution de l'albédo

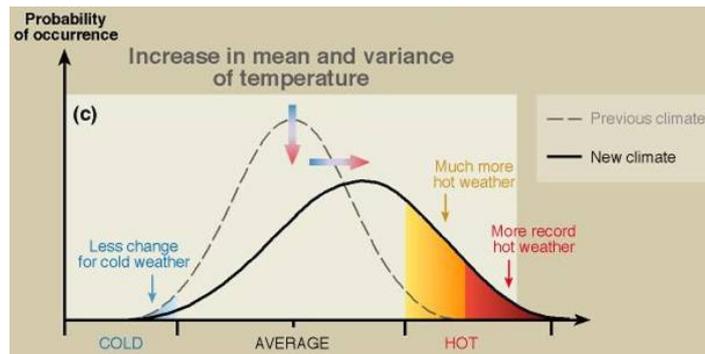


Figure 1.6. Prédiction d'évolution de la distribution des températures (source IPCC).

de surface va engendrer une température de surface supérieure réchauffant l'environnement proche. Ce paramètre risque d'être particulièrement important dans les régions boréales. Quelque soit le modèle et le scénario utilisé, l'augmentation des températures moyennes sera plus importante en été, mais significative également en automne, hiver et printemps : entre 2 et 5°C d'augmentation (Christensen & Christensen 2007). Par ailleurs, la moyenne mais également la variance des températures seront très probablement augmentées avec une fréquence des événements de gel, certes plus faible, mais une intensité similaire (Figure 1.6). Ainsi, la distribution, l'intensité et la fréquence des événements de gel risquent d'être profondément modifiés dans les futures décennies (Woldendorp *et al.*, 2008).

2. Stress induit par le froid, le gel sur les plantes

Après ces quelques éléments permettant de mieux comprendre l'évolution des conditions environnementales, nous allons voir comment les végétaux sont affectés par leur environnement thermique. Le stress engendré par les conditions hivernales est multifactoriel. En hiver, les plantes pérennes subissent un effet prolongé des basses températures (Chilling : températures positives et inférieures à cinq degrés) et, plus transitoirement, un effet du gel (Freezing : températures négatives). En réalité, ce que l'on définit comme stress dû au gel est une contrainte supplémentaire due à la formation de glace engendrée par le stress des basses températures. Lorsqu'il y a gel, au stress strictement thermique s'ajoute d'autres stress secondaires tels que stress osmotique, hydrique, mécanique. Si le stress dû aux faibles températures n'exerce une contrainte significative que sur les plantes tropicales, le stress dû au gel, lui, en exerce une sur l'ensemble des végétaux et, en particulier, sur leurs parties pérennes. Nous allons détailler les effets de ces stress sur les plantes à différentes échelles (moléculaire, cellulaire, de l'individu et de l'espèce).

2.1. Effet des basses températures

2.1.1. Impact sur les membranes

A l'interface entre la cellule et le milieu environnant, c'est-à-dire au niveau membranaire, lorsque la température baisse, les queues hydrophobes des lipides contenus au sein d'une bicouche passent d'un état désordonné, fluide (L_α) à un état gélifié, plus rigide (L_β) (Figure 1.7). Les interactions hydrophobes entre chaînes carbonées sont renforcées et les rotations des chaînes autour des liaisons C-C ralenties (Côme *et al.*, 1992). Les mouvements des lipides (diffusion latérale, rotation et flip-flop) se trouvent ralentis, la viscosité augmente au sein de la bicouche et la membrane passe d'un état liquide pour s'approcher de l'état de gel (Lyons, 1973, Lee 1975). Cet état rigidifié va limiter les échanges à l'intérieur de la bicouche lipidique et, surtout, entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Au froid, l'agitation moléculaire plus faible ralentit la diffusion simple de molécules à travers la membrane, et, les lipides membranaires figés vont également exercer des contraintes plus ou moins importantes sur les protéines membranaires. Parmi ces protéines, certaines sont des protéines intrinsèques exerçant une fonction de canal, c'est-à-dire permettant la diffusion facilitée et les transports actifs de molécules au travers la membrane. La contrainte infligée par la rigidification des lipides restreint la possibilité de réarrangement tridimensionnel nécessaire à l'accomplissement de leur activité biologique (Wolfe, 1978). Certaines pourront être bloquées en position ouvertes, d'autres fermées. D'autres protéines membranaires ont une activité enzymatique qui va également être perturbée par une rigidification de la membrane comme l'ATPase (Grisham & Barnet 1973).

Par ailleurs, l'effet sur la perméabilité membranaire dépend de la vitesse et de la durée du refroidissement. Lors d'un refroidissement lent et maintenu, la membrane est dans un état contracté qui restreint le passage de petites molécules, diminuant sa perméabilité à l'eau d'un

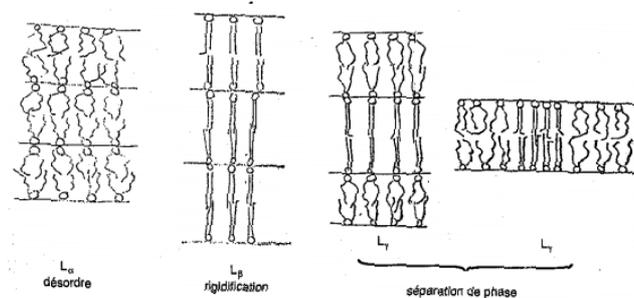


Figure 1.7. Système lamellaire de mélanges de phospholipides : L_α chaînes aliphatiques désordonnées, fluide (hautes températures) ; L_β chaînes aliphatiques rigides (basses températures) et L_γ séparation de phases de composition différentes aux températures intermédiaires (d'après Côme *et al.*, 1992).

tiers (Blok *et al.*, 1976). Une perméabilité diminuée au niveau des racines provoque un déséquilibre de la balance absorption/transpiration engendrant un stress hydrique (Sachs, 1864 ; Molish, 1896). Mais si le refroidissement est rapide et non uniforme, on peut retrouver une contraction hétérogène, créant ainsi des fractures au sein de la membrane et une fuite potentielle. Dans ce cas, la perméabilité est augmentée et les cellules peuvent se retrouver en état de pseudo-plasmolyse (Levitt, 1980).

2.1.2. Perturbations métaboliques

La température exerce une influence sur la vitesse des réactions chimiques, et, par conséquent, biologiques, par application du principe de Van't Hoff (1884) : « Une élévation de température appliquée à un système fermé en équilibre et maintenu à pression ou à volume constant entraîne un déplacement voire une rupture d'équilibre dans le sens de la réaction qui, à température et pression ou volume constants, est endothermique. ». Autrement dit, selon le principe de Le Chatelier (1884), les équilibres réactionnels vont être déplacés : « Lorsque les modifications extérieures apportées à un système physico-chimique en équilibre provoquent une évolution vers un nouvel état d'équilibre, l'évolution s'oppose aux perturbations qui l'ont engendrée et en modère l'effet. ». Par conséquent, si l'on se place dans le sens d'une diminution de la température ambiante, cela va favoriser les réactions chimiques dans le sens exothermique, donc dans le sens catabolique au détriment de l'anabolisme. Les réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes dont l'activité est dépendante de l'exponentielle de l'opposé de l'inverse de la température ($k = a \times e^{-\frac{E_a}{R \times T}}$; Arrhenius, 1889). Ainsi, une baisse de la température limite fortement la vitesse des réactions métaboliques (Côme *et al.*, 1992). Chez les plantes sensibles, un effet seuil existe, en deçà duquel, la constante catalytique chute rapidement. Ce seuil est différent selon les enzymes et espèces mais se situe généralement dans une gamme de températures comprises entre 5 et 12°C (Lyons & Raison, 1970) (Figure 1.8).

Au delà de l'effet sur la cinétique réactionnelle, les macromolécules étant stabilisées par des interactions faibles (du type interactions de van der Waals, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, interactions ioniques), celles-ci peuvent être affectées par la température. Ainsi, la stabilité et la solubilité des protéines globulaires peuvent être directement affectées (Siddiqui & Caviocchioli, 2006). Il a été montré que les basses températures pouvaient également engendrer la dénaturation de la structure quaternaire des protéines ou des complexes protéiques (Pastore *et al.*, 2007). Les ARN sont également

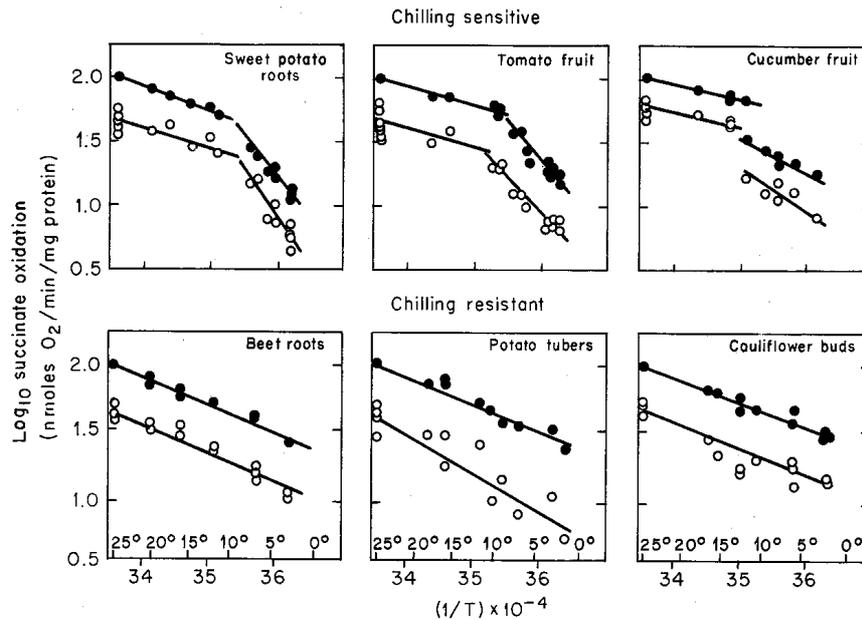


Figure 1.8. Diagrammes d'Arrhenius pour l'oxydation du succinate par des extraits de mitochondries chez des plantes sensibles (en haut) ou résistantes au froid (en bas) (d'après Lyons & Raison, 1970).

influencés, et leurs structures secondaires stabilisées, ce qui peut diminuer l'accès des séquences Shine-Dalgarno aux ribosomes et donc diminuer la traduction de différentes protéines (Ruelland *et al.*, 2009).

Les basses températures engendrent également un déséquilibre au niveau de la photosynthèse (Ensminger *et al.*, 2006 ; Huner *et al.*, 1993). On observe un appauvrissement en phosphate inorganique qui n'est plus recyclé vers le chloroplaste (Furbank *et al.*, 1987; Hurry *et al.*, 1993, 2000). L'augmentation de la viscosité membranaire, diminue la diffusion de la plastoquinone et la chaîne de transport d'électrons est ralentie (Griffith *et al.*, 1984a ; 1984b). Les réserves carbonées vont de ce fait progressivement diminuer car la perte engendrée par l'activité respiratoire ne sera plus compensée par la photosynthèse.

De plus, au sein des antennes collectrices des photosystèmes, la chaîne de transport des électrons va être saturée et les électrons en excès participer à la formation de composés toxiques en interagissant avec l'O₂ par des ruptures homolytiques de liaisons formant donc, des radicaux libres (molécules contenant un électron non apparié) (Benson & Bremner, 2004). Ces radicaux libres vont, en arrachant un électron à la couche périphérique d'un autre atome, pouvoir reformer un doublet tout en créant un autre radical libre, on parle de ROS (« Reactive Oxygen Species ») (Ruelland *et al.*, 2009 ; Soitamo *et al.*, 2008 ; Yun *et al.*, 2010). Ces ROS vont s'accumuler car les enzymes du métabolisme antioxydatif sont peu actives à basse température (Miller *et al.*, 2008).

Ces ROS peuvent réagir avec différentes classes de molécules :

- ADN : avec lesquels ils induisent des mutations (Breen & Murphy, 1995)
- Lipides : par peroxydation des doubles liaisons des acides gras insaturés (Esterbauer *et al.*, 1988 ; 1991)
- Protéines : en créant des ponts interprotéiques ou déstabilisant les structures secondaires, tertiaires ou quaternaires (Esterbauer *et al.*, 1991).

2.1.3. Echelle macroscopique

A l'échelle individuelle, l'influence des basses températures se traduit essentiellement à travers l'effet sur la vitesse de réactions catalytiques, en un ralentissement de la croissance des plantes et un retard de leur phénologie. Par conséquent, la durée de leur cycle annuel de croissance peut être prolongée jusqu'à une période où les températures diminuent et les risques de gel augmentent. On peut déterminer une température moyenne en deçà de laquelle elles ne peuvent se reproduire (Tranquillini, 1979). Ainsi, dans les Alpes européennes, on ne trouve des arbres qu'à des altitudes où les températures moyennes dépassent 5°C pendant 100 jours (Brockmann-Jerosch, 1919 ; Ellenberg, 1963 ; Körner, 2003). En deçà de ces températures, la croissance et la capacité reproductive se trouvent fortement limitées. Par exemple, *Juncus squarrosus* produit des graines à une altitude inférieure à 840m, mais à une altitude supérieure, on ne peut rencontrer des individus de cette espèce que suite à la dispersion des graines par zoochorie (par moutons ou oiseaux), car les températures sont trop basses pour permettre l'accomplissement du cycle reproductif entier (Pearsall, 1968, d'après Körner, 2003).

Des températures comprises entre 0 et 10°C peuvent avoir un effet lésant sur les plantes tropicales (par diminution de la fluidité membranaire et des enzymes associées, essentiellement), mais les plantes originaires des climats tempérés ne sont pas lésées par ces températures. Chez différentes espèces d'arbres, la photosynthèse ne peut être complètement inhibée qu'après la formation de glace extracellulaire (Neilson *et al.* 1972) et ceci peut être expliqué physiquement par l'arrêt de la diffusion du CO₂ par la glace (Larcher *et al.*, 1973).

2.2. Effet du gel

Les blessures infligées par le gel sur les plantes peuvent être directes ou indirectes et la mort cellulaire n'est pas le résultat d'un seul mécanisme mais de la conjonction de plusieurs effets tels que les contraintes osmotique et mécanique (Steponkus, 1981). Les blessures

directes engendrées par le gel ont lieu si la glace se forme à l'intérieur des cellules et aura notamment pour résultat de déstabiliser les membranes (membrane plasmique de la cellule et des organites), en influençant leur perméabilité et leur continuité (Ziegler & Kandler, 1980) (Figure 1.9). Mais d'autres stress sont créés si la glace est formée au niveau extracellulaire. La présence de glace peut interrompre les transferts d'eau ou d'oxygène (Pearce, 2001 ; Sakai & Larcher, 1987), via une déshydratation poussée, engendrer une contraction et une rupture de la membrane ou des stress mécaniques (Ruelland *et al.*, 2009).

2.2.1. Formation de la glace dans les tissus végétaux

Lorsque les températures sont négatives, le cytosol et l'eau apoplasmique vont rester à l'état liquide (en surfusion) jusqu'à ce qu'un point de nucléation (homogène ou hétérogène) engendre la formation de glace. En milieu extracellulaire, la nucléation n'est que très rarement homogène, car elle nécessite des températures de l'ordre de -40°C ou des volumes d'eau supérieurs à ceux que l'on rencontre chez les végétaux (même chez les plus grands arbres ; Pearce, 2001). L'initiation de la congélation peut se localiser à la surface des tissus (à cause d'une humidité importante) chez la majorité des herbacées (Fuller & Wisniewski, 1998), par la neige ou par des débris organiques et inorganiques (Pearce, 2004). Les bactéries actives pour la nucléation de la glace sont des agents particulièrement importants dans l'initiation de cristaux de glace (Gurian-Sherman & Lindow, 1993 ; Wolber, 1993). Elles peuvent induire la formation de cristaux de glace à partir de -2°C , mais ne sont souvent pas assez abondantes pour être biologiquement significatives (Lindow, 1990 ; Pearce & Ashworth, 1992). Ces

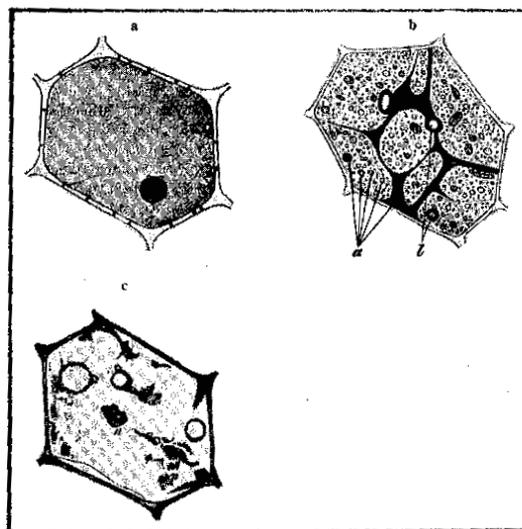


Figure 1.9. Cellule végétale à température ambiante (a), congelée, en plasmolyse (b) et après décongélation, les membranes biologiques lysées (c) (d'après Molish, 1897).

bactéries ont adopté une stratégie pathogène visant à générer la formation de glace au sein des espaces intercellulaire afin d'augmenter les dommages dus au gel au sein des tissus (Nejad *et al.*, 2004), notamment en produisant une protéine ayant un rôle d'agent de nucléation (Lindow *et al.*, 1978 ; 1982). Il s'agit de bactéries du genre *Pseudomonas* (*syringae*, *fluorescens*, *viridiflava*), *Erwinia* (*herbicola*, *amylovora*) ou *Xanthomonas campestris*. Les cellules végétales ainsi lysées constituent un substrat nutritif pour la croissance de ces bactéries, essentiellement par l'intermédiaire du fructose (Lindow & Leveau, 2002).

Certains agents de nucléation ont été extraits de plantes et leur composition semble être variée. Ils ont été identifiés chez *Opuntia* et *Lobelia* comme étant des mucilages et des sucres (Goldstein & Noble, 1991 ; Krog *et al.*, 1979) ou des protéines (Brush *et al.*, 1994). Mais leur importance biologique est contestée car, isolés, ils permettent la nucléation de la glace entre -5 et -7°C, alors que la formation de glace dans les plantes à partir desquelles ils sont extraits s'effectue à partir de -2°C (Griffith & Antikienien, 1996).

La cristallisation de l'eau tissulaire intervient, généralement au niveau apoplasmique (extracellulaire) *i.e.* les vaisseaux de large diamètre (Asahina, 1956) pour plusieurs raisons. Le volume apoplasmique est plus important que le volume intracellulaire, donc d'un point de vue strictement stochastique, la probabilité de formation d'un point de nucléation y est plus importante. Par ailleurs, la concentration en soluté y est plus faible, donc la dépression du point de fusion plus faible.

Chez les espèces ligneuses, il semblerait que les évènements de nucléation soient principalement intrinsèques (Pearce, 2001 ; Wisniewski *et al.*, 1997) ; alors que chez les herbacées, le point de nucléation est, plus généralement, d'origine extérieure. La glace croît à l'intérieur des tissus en passant par différentes ouvertures comme les stomates (Wisniewski & Fuller, 1999), ou, la majorité des évènements de gel ayant lieu la nuit alors que les stomates sont fermés, par des hydathodes (structures présente sur les feuilles de nombreuses espèces) portant un pore ouvert en permanence (Pearce & Fuller, 2001).

Une fois formée, la glace va se propager tout le long des espaces connexes à une vitesse relativement rapide (34 cm.min⁻¹.°C⁻¹, Levitt 1980). Les membranes constituent une barrière à l'extension des cristaux de glace (Chambers & Hall, 1932). La glace va également plus difficilement s'étendre au niveau des parois cellulaires car l'eau y est contenue dans des microcapillaires inférieurs à 0,1 µm. Cette configuration abaisse la pression de vapeur de l'ordre de 1% (Moor, 1960), ce qui abaisse la dépression du point de fusion (Levitt, 1980). D'autres barrières existent à la croissance de la glace mais elles ne sont pas clairement identifiées (Wisniewski & Fuller, 1999). Ainsi au printemps la croissance du xylème au

niveau des bourgeons à l'approche du débourrement chez le forsythia et le pommier débloquent une barrière à l'extension de la glace (Ashworth *et al.*, 1992).

La durée de congélation semble n'exercer que peu d'influence sur les blessures engendrées jusqu'à 12 jours (Levitt, 1956 ; Palta *et al.*, 1977). Par la suite, on retrouve une relation entre blessures et temps de congélation jusqu'à 1 ou 2 ans (Sakai, 1956 ; Asahina, 1967). La répétition de cycles gel/dégel influence la sensibilité à la température dans certains cas (Winkler, 1913 ; Thomas & Lazenby, 1968), mais pas toujours (Bird & Mc Lachlan, 1974 ; Krasavtsev, 1973 ; Palta *et al.*, 1977).

2.2.2. Congélation intracellulaire

La congélation intracellulaire constitue une blessure directe engendrée par le gel ; alors que la congélation extracellulaire n'engendre que des dommages indirects provoqués essentiellement par la déshydratation poussée des protoplastes (Figure 1.10). La congélation intracellulaire provoque toujours la mort cellulaire (Mazur, 1963 ; Wolfe & Bryant, 2001), à l'exception de certaines conditions artificielles de congélation si les cristaux ne dépassent pas une taille de 0,05 μm (Shimada & Asahina, 1975). En effet, lors de sa formation, la glace exclue tous les solutés présents dans le cytosol et, la concentration en certains composés devient toxique. De plus, le potentiel osmotique de l'eau liquide résiduelle étant tellement important que l'ensemble des interactions moléculaires (notamment hydrophobes) est perturbé (Wolfe & Bryant, 2001).

On observe de congélation intracellulaire que si la congélation est rapide ($< 8\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$; Siminovitch *et al.*, 1978). Dans la nature, les vitesses de congélation sont généralement plus faibles : de l'ordre de $5\text{K}\cdot\text{hr}^{-1}$ (Levitt, 1980 ; Sakai & Larcher, 1987). Cette vitesse est

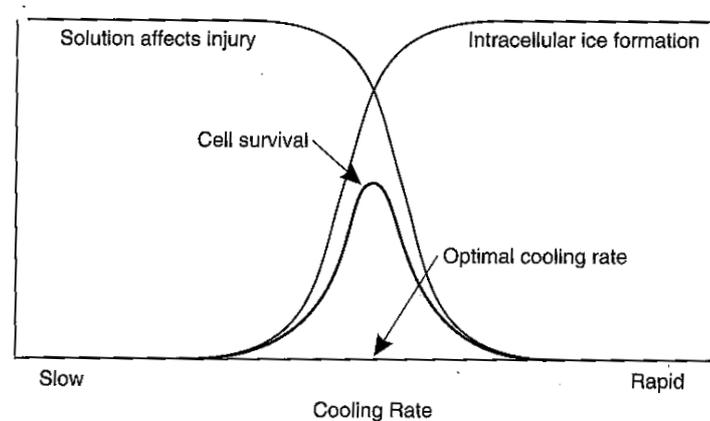


Figure 1.10. Effet de la vitesse de congélation sur la survie d'une cellule. Lorsque la vitesse est lente, l'exosmose est importante et la concentration du cytosol devient lésante. Lorsqu'elle est rapide, on observe la formation de glace intracellulaire (d'après Muldrew *et al.*, 2004).

considérée comme rapide et capable de produire de la congélation intracellulaire dans le cas de plantes entières (Levitt, 1958), mais pas sur des sections de tissus (Levitt, 1957). Ainsi, la congélation sera intracellulaire si l'eau n'a pas le temps de diffuser hors de la cellule avant d'atteindre la température de congélation.

En fait, la congélation intracellulaire est générée lorsque la cellule n'est pas capable de maintenir l'équilibre avec l'extérieur. Par exemple, lors de congélation rapide, la formation de glace et donc la concentration en solutés extracellulaires se produisent plus rapidement que la capacité de réponse de la cellule par exosmose (phénomène de flux d'eau s'établissant de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur visant à rééquilibrer les potentiels osmotiques du cytosol et de l'eau apoplasmique). Le cytosol se retrouve en état de surfusion et la probabilité d'une nucléation est augmentée. Les conditions exactes de la congélation intracellulaire ne sont pas encore totalement expliquées car la membrane constitue théoriquement une barrière efficace à la croissance de la glace (Chambers & Hale, 1932 ; Luyet & Gibbs, 1937 ; Mazur, 1965) et on n'y retrouve pas d'agents de nucléation (Franks *et al.*, 1983 ; Rasmussen *et al.*, 1975). Trois théories sont évoquées à l'heure actuelle :

- La théorie protéine-pore selon laquelle la glace pourrait croître à travers des protéines membranaires (Mazur, 1965). Le rayon minimal pour qu'une dendrite de glace soit stable est dépendant de la température, ainsi quelque soit la taille d'un pore, il existe une température en dessous de laquelle la glace peut croître à travers ce pore (Acker *et al.*, 2001 ; Elliott, 2001 ; Mazur, 1965). D'autres études plus récentes confortent cette théorie après observation de propagation de glace intracellulaire à travers des pores membranaires protéiques entre des couches lipidiques confluentes (Acker & McGann, 1998 ; Acker *et al.*, 2001) ou des tissus (Berger & Uhrik, 1996).
- Une autre hypothèse consiste en une rupture de la membrane préalablement à la formation de glace intracellulaire (Asahina, 1962). Ces ruptures peuvent être créées à la suite de différences de potentiels électriques transitoires dus à la séparation des charges à l'interface glace/eau liquide (Steponkus *et al.*, 1984).
- L'existence d'un phénomène de nucléation intracellulaire constitue la dernière hypothèse. La glace extracellulaire pourrait induire la formation d'un point de nucléation sur la membrane sans la rompre par une interaction restant à identifier (chimique, électrique, mécanique, ionique ou thermique ; Toner *et al.*, 1990).

2.2.3. Stress secondaires engendrés par la congélation

En hiver, les contraintes sont multiples et les dommages engendrés par l'interaction de différents phénomènes. Par exemple, lorsque le sol ou les tissus conducteurs du xylème sont gelés, l'absorption d'eau par l'appareil racinaire est inhibée. L'évaporation de l'eau contenue dans les tissus n'étant pas nulle, en particulier lors de journées fortement ensoleillées, la plante se dessèche progressivement (Sakai & Larcher, 1987). Ce phénomène est relativement fréquent chez les jeunes arbres en conditions montagneuses (Michaelis, 1934 a b ; Henson, 1952, Larcher, 1957 ; 1977 ; Wardle, 1971 ; Tranquillini, 1979). Le manteau neigeux exerce un effet protecteur, chez *Rhododendron ferrugineum*, les individus protégés ne subissent pratiquement pas de perte d'eau alors que ceux à découvert deviennent extrêmement déshydratés ; la totalité de l'eau libre s'évaporant (Larcher, 1963) (Figure 1.11).

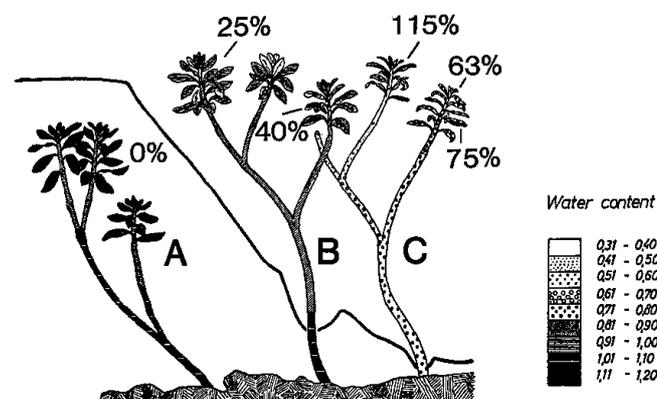


Figure 1.11. Humidité pondérale et indice de sécheresse relative (Déficit hydrique / déficit à partir duquel apparaissent les premiers dommages) en fonction de la position sous le couvert neigeux pour des plantes en limite altitudinale (d'après Larcher, 1963).

Mais le manteau neigeux peut s'avérer également dommageable pour les plantes lorsqu'il est compact, glacé. La diffusion des gaz est très ralentie et la concentration en CO₂ issu de la respiration peut atteindre 44% (v/v), et celle en O₂ chuter à 3 à 5% (Freyman & Brink, 1967 ; Rakitina, 1970 ; Smith & Olien, 1981). Ces conditions hypoxiques génèrent l'apparition de composés toxiques, et de lésions cellulaires. Si ces conditions apparaissent alors que les plantes sont peu endurcies, leur capacités d'endurcissement se trouvent limitées (Rakitina, 1965 ; 1967). Dans les zones à fort enneigement, l'épaisseur de neige est telle que les contraintes mécaniques engendrées sur les plantes peuvent générer des dommages importants. Cette pression est dépendante de l'épaisseur et de la densité de la neige.

2.2.3.1. Déshydratation engendrée par la glace

Durant la cristallisation extracellulaire, tous les solutés sont expulsés dans une couche d'eau non gelée très concentrée qui va engendrer une différence de potentiel chimique entre apoplasme et symplasme. L'eau va donc traverser la membrane afin de rétablir l'équilibre osmotique. Ce nouvel équilibre va être dépendant des concentrations intra et extra cellulaires. Et, le volume final de la cellule peut être déterminé à l'aide de l'équation de Boyle - van't Hoff :

$$V = \pi_{e0} (V_0 + b) \cdot 1/\pi_e + b$$

où V : volume cellulaire ; π_e : osmolalité de la solution extracellulaire ; b volume osmotiquement inactif de la cellule ; π_{e0} et V_0 : volume cellulaire et osmolalité, respectivement, pour l'état isotonique.

La pression de vapeur en équilibre avec l'eau liquide est supérieure à celle de la glace quelques soit la température (Häckel, 1985). Ainsi, la glace va exercer une force d'attraction des molécules d'eau à l'état liquide et les recruter au sein de la structure cristalline. La pression de vapeur en équilibre avec la glace diminue avec la baisse des températures, déshydratant d'autant plus le contenu cellulaire (Gusta *et al.*, 1975 ; Pearce, 1988). La relation entre l'osmolarité d'une solution en équilibre avec la glace et la température est :

$$\text{Osmolarité} = \text{degrés en dessous de } 0^\circ\text{C} / 1,86 \text{ (Pitt, 1990)}$$

Cette différence d'osmolarité engendre des mouvements d'eau à travers la membrane dont la vitesse de transfert est limitée par la perméabilité membranaire et par le gradient chimique imposé par la glace. Ce flux peut être calculé :

$$\frac{dVW}{dt} = L_p \cdot A \cdot R \cdot T \cdot (\pi_i - \pi_e)$$

où VW : est le volume d'eau de la cellule ; t : le temps ; L_p : la conductivité hydraulique ; A : la surface membranaire ; R : la constante des gaz parfaits ; T : la température en Kelvin et π_i et π_e : les osmolalités intra et extracellulaires, respectivement ; Muldrew *et al.*, 2004).

Ainsi, à $-18,6^\circ\text{C}$, l'osmolarité intracellulaire sera de l'ordre de 10, environ 10 fois plus que l'osmolarité initiale et il ne restera dans la cellule qu'un dixième de l'eau initiale et donc une forte réduction de son volume (Pearce, 1988).

Les mouvements d'eau s'exercent à travers des protéines de membrane à fonction de pores spécifique à l'eau (aquaporines) mais aussi par des transferts directs à travers la membrane (Finkelstein, 1987). Ainsi, la perméabilité membranaire est dépendante de la

température (selon la relation d'Arrhenius), alors que le volume final est seulement dépendant de la différence d'osmolalités.

Dans le cas de cellules non endurecies, lors du gel, l'efflux d'eau provoque une plasmolyse (contraction de la cellule) et la réponse membranaire pour diminuer sa surface est soit de former des microvacuoles d'endocytose soit des extrusions exocytiques (Côme *et al.*, 1992 ; Ruelland *et al.*, 2009) (Figure 1.12). Si la perte de volume dépasse un seuil, la réversibilité de ces mécanismes n'est plus possible. Au dégel, si l'influx d'eau est trop important par rapport à la disponibilité des vésicules d'endocytose pour fusionner avec la membrane du protoplaste, l'expansion du volume mènera à la lyse cellulaire (Dowgert & Steponkus, 1984 ; Wolfe *et al.*, 1985). Chez le riz (*Oriza sativa*) et l'avoine (*Avena sp*), les plantes non acclimatées ont un fort taux de lyse induite par l'expansion lorsqu'elles forment des vésicules d'endocytose à la contraction. Les plantes acclimatées forment des vésicules exocytique qui permettent de diminuer le volume cellulaire sans modifier l'intégrité de la membrane et ne subissent plus de lyse à l'expansion (Uemura *et al.*, 1995).

Une cellule est composée d'eau à 60 jusqu'à 85% et le cytoplasme étant une solution contenant de multiples solutés (protéines, acides nucléiques, lipides, sucres et autres), une partie de cette eau interagit par liaisons hydrogène avec ces molécules (ce qu'on appelle l'eau

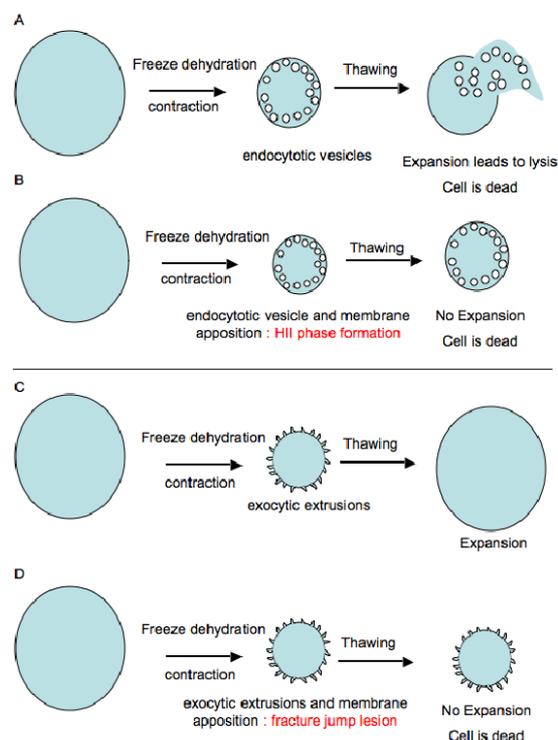


Figure 1.12. Modification de volume et comportement des membranes en situation de gel/dégel. Contraction générant des vésicules d'endocytose (A et B). Contraction générant des extrusions exocytiques et capacité pour ces extrusion à disparaître au dégel (C) ou non (D) (d'après Uemura *et al.*, 2006).

liée) et n'est donc pas capable de former de la glace. En utilisant différentes méthodes de calorimétrie et de déshydratation ou par RMN, la quantité d'eau liée a été estimée en moyenne entre 0,2 et 0,25 gramme d'eau par gramme de matière sèche (Sun, 1999). Donc, environ 10% de l'eau cellulaire n'est pas congelable (Schreuders *et al.*, 1996). Ainsi, la déshydratation des cellules n'engendre pas de dommages jusqu'à 0,4 g.g⁻¹ de MS, mais, en dessous de 0,3, les dommages augmentent fortement (Sun *et al.*, 1999).

Entre deux membranes, les forces de répulsion sont augmentées lorsque leur distance devient inférieures à 25Å (en dessous de 2Å, les interactions de van der Waals engendrent une attraction ; Leikin *et al.*, 1993). Selon les interprétations actuelles, ces forces de répulsion sont la conséquence d'une expulsion des molécules d'eau d'hydratation à la surface des membranes. Lorsque l'on approche des valeurs de déshydratation fortes, l'eau résiduelle ne suffit plus pour empêcher le rapprochement entre membrane plasmique et membranes des organites. A faible distance (<2Å), les parties hydrophiles des bicouches interagissent et peuvent former des micelles inversés intermédiaires, les parties hydrophiles des lipides membranaires tournées vers l'intérieur, les parties hydrophobes vers l'extérieur (Figure 1.13).

Ces micelles inversés peuvent être convertis en une phase hexagonale de type II (phase non lamellaire de micelles inversés incluant de l'eau à l'intérieur de chaque micelle : similaire à la structure du beurre ; Lyons & Raison, 1970 ; Quinn, 1985) ou en attachements interlamellaires (Ruelland *et al.*, 2009) selon la courbure de la couche lipidique. Si la courbure est importante on observe la formation de phase hexagonale, alors qu'une courbure importante induit la formation d'attachements interlamellaires (Siegel, 1987 ; Uemura *et al.*, 1995). Ces structures génèrent une perte dans la capacité de réponse à l'osmose lors de l'expansion au dégel. On observe dans ces conditions la formation de lésions par saut de fracture (Uemura *et al.*, 1995).

L'eau libre est effluée, le cytosol se concentre, ainsi, la dépression du point de fusion augmente progressivement (Gusta *et al.*, 1975). Le ratio eau libre / eau liée diminue ce qui a pour conséquence d'abaisser le taux d'hydratation des parois et des membranes (Yoon *et al.*, 2003). La trop grande concentration en électrolytes va perturber les arrangements tridimensionnels des protéines en agissant sur les interactions ioniques ce qui peut entraîner une dénaturation complète (Wolfe & Bryant, 2001). Une autre conséquence de la concentration en solutés du cytosol est l'oxydation des résidus thiols sur les résidus cystéines des protéines créant des ponts disulfures intra et inter protéines (Levitt, 1980).

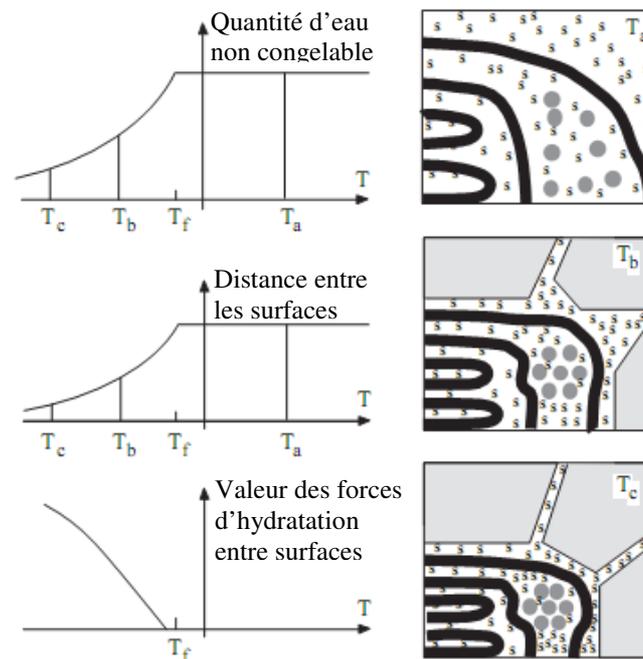


Figure 1.13. Quantités d'eau non congelable en fonction de la température (T) dus à des effets osmotiques et d'hydratation dans un système contenant des membranes (lignes épaisses), des macromolécules (cercles gris), des solutés (S), de l'eau (blanc) et de la glace (gris). La présence de solutés et de surfaces hydrophiles abaisse la température de congélation (T_f) à des températures négatives. Quand $T < T_f$, le potentiel chimique de l'eau non congelable peut être abaissé au niveau de celui de la glace par deux effets : concentration en solutés dans la phase liquide et la succion engendrée par les forces d'hydratation entre surfaces hydrophiles (d'après Wolfe *et al.*, 2002).

Comme nous l'avons vu, la glace extracellulaire génère une plasmolyse du protoplaste, et par le volume plus important occupé par la glace par rapport à l'eau liquide, une contrainte mécanique sur la paroi. Ces deux phénomènes couplés, et l'adhésion entre la membrane et la paroi aboutissent à un effondrement de la structure cellulaire sur elle-même (collapse ; Levitt, 1980). Chez certaines espèces, la paroi est plus résistante et une lacune se crée entre paroi et membrane, diminuant le déséquilibre entre la cellule et l'apoplasme. Ce phénomène diminue l'intensité de la déshydratation (Zhu & Beck, 1991).

2.2.3.2. Génération d'embolie au sein du système conducteur

En sus de contraintes s'exerçant au niveau cellulaire, la continuité hydraulique du système conducteur de sève brute, le xylème, est également affectée par les conditions gélives. La conductivité hydraulique du xylème est régie par le phénomène de cohésion-tension (Dixon & Joly, 1894, 1895). Ce phénomène s'explique car il existe une continuité hydraulique à travers toute la plante, des racines jusqu'aux stomates maintenue par les forces de capillarité. La sève en s'évaporant au niveau des feuilles induit un gradient de tension au sein de l'ensemble du système conducteur. Cette pression hydrostatique négative permet de transporter de grandes quantités d'eau des racines jusqu'au feuilles mais il s'agit d'un état

métastable car cette tension est très inférieure à la pression de vapeur de l'eau (Cruiziat *et al.*, 2001). En cas de déséquilibre, la sève passe donc en phase vapeur lors du phénomène de cavitation (Hacke & Sperry, 2001).

Ce phénomène de cavitation se produit lors d'une succession d'alternance gel/dégel et les *lumina* des vaisseaux se retrouvent emplis d'air (Sperry & Sullivan, 1992). La théorie actuelle de formation de l'embolie hivernale veut que lors de la prise en glace, l'air solubilisé dans la sève brute soit expulsé de la structure cristalline de la glace et forme des bulles qui peuvent, au dégel et si la sève est sous tension, se dilater jusqu'à emboliser le vaisseau (Cruiziat *et al.*, 2002). Le comportement de cette bulle va être prédit par la loi de Laplace (Hacke & Sperry, 2001 ; Cochard, 2006) :

$$P_b = \frac{2.T}{R} + P_x$$

où P_b : Pression interne à la bulle, R : Rayon de la bulle, T : Tension superficielle sève/air, P_x : Pression de la sève xylémienne.

En fonction de la taille des bulles et de la tension existant dans la sève, ces bulles peuvent avoir deux comportements différents (Figure 1.14) :

- une bulle d'un diamètre important au sein d'une sève sous forte tension va former un site de nucléation pour le passage de la sève de l'état liquide à vapeur, la bulle se dilate et embolise le vaisseau entier
- une bulle de faible diamètre et une sève sous faible tension, ou même sous pression, se ressolubilise dans la sève.

La bulle d'air est donc soumise à la tension superficielle à l'interface air/eau, et à la pression hydrostatique de la sève. La tension superficielle est inversement proportionnelle à la taille de la bulle, et le rayon de cette bulle est directement lié au volume (donc au diamètre) du vaisseau considéré (à cause d'une plus grande quantité de gaz dissous) (Sperry & Sullivan, 1992 ; Pitterman & Sperry, 2003) (Figure 1.15).

Ce facteur permet de définir une plus grande sensibilité des espèces à zone poreuse, à très larges vaisseaux tels que *Quercus sp*, *Fraxinus sp* chez qui un cycle gel/dégel suffit pour générer 100% de perte de conductivité (Sperry & Sullivan, 1992 ; Cochard *et al.*, 1997 ; Cruiziat *et al.*, 2002). Les espèces à pores diffus telles que *Acer sp* (Sperry *et al.*, 1988) ou *Fagus sp* (Hacke & Sauter, 1995) développent un embolisme progressif au cours de l'hiver.

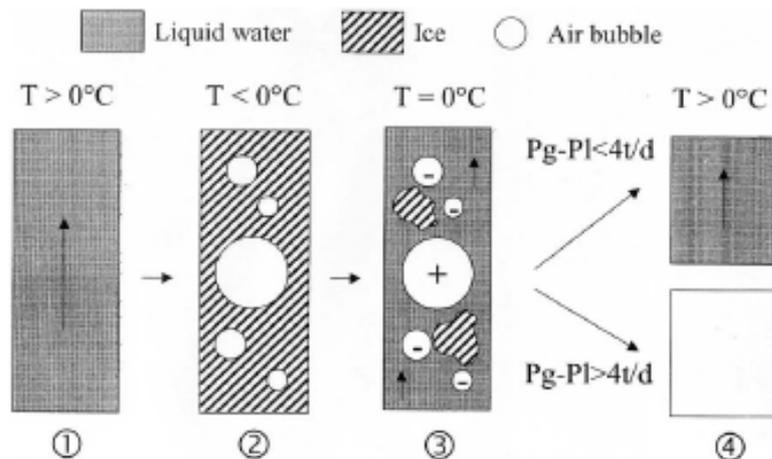


Figure 1.14. Formation d'embolie au sein d'un vaisseau par formation de bulles de gaz quand la sève gèle (2) qui peuvent emboliser ou non le vaisseau en fonction de la taille de la bulle et de la tension de la sève au dégel (3 puis 4). T : Température, P_g : Pression de la phase gazeuse, P_l : pression de la phase liquide, t : tension de surface de la sève et d : diamètre de la bulle (d'après Cruiziat *et al.*, 2002).

Les conifères dont le xylème n'est composé que de trachéïdes, de très faibles diamètres, sont, quant à eux extrêmement résistants et l'on n'observe d'embolie qu'en conditions extrêmes telles qu'en limite altitudinale (2000 m) (Mayr *et al.*, 2003, 2006). Davis *et al.* (1999) ont identifié un diamètre critique de 30 μm en deçà duquel la sensibilité à la formation d'embolie est très faible.

L'autre facteur nous indique que si la sève est sous pression, l'air va se resolubiliser dans la sève. Chez un arbre en déficit hydrique, avec une sève sous tension, la bulle va se dilater et emboliser le vaisseau (Pitterman & Sperry, 2006).

Plus récemment, de nouvelles observations viennent contredire cette théorie. En effet, Mayr *et al.* (2007) ont observé que des émissions acoustiques ultrasoniques sont générées lors d'évènements de gel, et ce seulement dans des rameaux partiellement déshydratés corroborant les observations par microscopie électronique de Cochard *et al.* (2000). Mais l'explication n'est pas encore totalement claire car il a été observé que des émissions acoustiques étaient

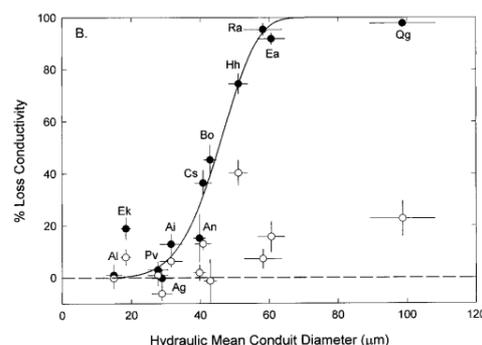


Figure 1.15. Pourcentage de perte de conductivité après un cycle gel dégel en fonction du diamètre hydraulique des éléments conducteurs du xylème (d'après Davis *et al.*, 1999).

générées lors des événements de gel, mais que la perte de conductivité ne s'observaient qu'au dégel et sous tension (Mayr & Sperry, 2010). Ces différentes observations laissent à penser que le phénomène de cavitation est découplé du phénomène d'embolie : la formation de bulles générant des émissions acoustiques, bulles qui ne se dilatent que lorsque la sève redevient liquide.

2.2.4. Lésions macroscopiques

L'effet du gel se traduit à l'échelle macroscopique par l'intermédiaire des différents effets décrits précédemment. Décoloration, blanchiment, pourrissement des tissus, gélivure, malformations ou hétérochronisme sont autant de symptômes (Sakai & Larcher, 1987).

Chez les jeunes arbres, au début de l'hiver, le niveau de résistance des jeunes branches basales peut être trop faible par rapport aux températures près du sol. Ainsi, les branches basales de *Cryptomeria japonica* se révèlent être plus sensibles et sont plus sévèrement endommagées que les parties supérieures (Horiuchi & Sakai, 1978). Des brûlures (des échaudures) sont engendrées sur les parties exposées au Sud et au Sud-ouest au niveau de l'écorce et du cambium à cause de cycles gel/dégel (Kramer & Kozlowski, 1979). Ces parties subissent l'hiver des contrastes de températures intenses entre la nuit et les jours fortement ensoleillés (20 à 30K par rapport à la face ombragée ; Sakai, 1966a). Ces parties se retrouvent dégelées et, dès que les rayons du soleil s'atténuent, elles gèlent si rapidement qu'une congélation intracellulaire a lieu dans les cellules de l'écorce (Levitt, 1980) et du cambium.

On observe également, dans le bois, des fractures radiales engendrées par le gel, notamment au niveau du bois humide (Ishida, 1963 ; Cinotti, 1991), à cause de la présence de bactéries initiant la formation de glace (Bauch *et al.*, 1979). La pression engendrée par l'augmentation de volume due à la glace formée provoque une rupture mécanique des tissus. Ce phénomène est le plus souvent désigné sous le vocable gélivure (Figure 1.16).

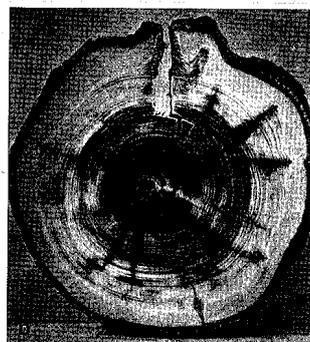


Figure 1.16. Coupe transversale d'un tronc d' *Abies sacchalinesis* ayant subi une gélivure (d'après Sakai & Larcher, 1987).

Le gel a un impact sur la survie d'un individu mais également sur sa capacité de reproduction. Ainsi, il a été démontrés que les organes reproducteurs sont les parties les plus sensibles, et lors d'hivers particulièrement rigoureux, les *primordia* floraux peuvent être endommagés, où lors de gels printaniers, les pistils lésés empêchent une reproduction de la plante pour une année. Les graines sont également particulièrement sensibles lors de leur germination (Sakai & Larcher, 1987). Dans les bourgeons, la distribution de la glace est inégale et dépend de l'état d'acclimatation (Ashworth *et al.*, 1989 ; Ashworth & Wisniewski, 1991 ; Warmund *et al.*, 1992 ; Flinn & Ashworth, 1994). Dans les bourgeons acclimatés, on ne retrouve de glace que dans les écailles et dans l'axe mais pas dans les organes floraux et les *primordia* foliaires (Quamme, 1978 ; Ashworth, 1990) ; alors que désacclimatés, les bourgeons peuvent subir une formation de cristaux de glace dans l'ensemble des tissus les composant (Kader & Proebsting, 1992).

Différentes théories ont été émises pour expliquer cette différence de comportement entre bourgeons acclimatés et non acclimatés (Flinn & Ashworth, 1994). Les bourgeons en dormance étant déconnectés du système conducteur xylémien (Ashworth, 1982 ; 1984 ; 1992), à la levée de dormance, cette connexion est rétablie permettant une migration de la glace (Rodrigo, 2000). Des différences de potentiels hydriques entre les tissus (Quamme, 1978) ou la présence/absence d'agents de nucléation intrinsèque pourraient également expliquer cette distribution hétérogène (Ishikawa & Sakai, 1985).

La formation de glace génère la séparation de l'épiderme et de l'hypoderme du cortex (Rogers, 1952, Simons & Doll, 1976), des lacunes dans les zones corticales (Simons, 1959 ; Simons & Doll, 1976) et aussi, dans les bourgeons floraux, l'abscission du style (Simons *et al.*, 1970 ; Olson & Steves, 1983) et l'avortement des ovules (Modlibowska, 1957 ; Simons, 1969 ; Williams, 1970 ; Stösser & Anvari, 1982). Ces dommages peuvent être réparables si un nombre limité de cellules est lysé (Modlibowska 1962) et, ce, d'autant plus rapidement que les méristèmes sont généralement, à cette période, en phase d'intenses divisions mitotiques (Simons, 1969). Si les blessures sont plus importantes, des zones brunes apparaissent lors de la croissance, composées de cellules nécrosées (Simons, 1969), des cals se forment dans les lacunes formées (Modlibowska, 1962).

A cause de la lyse des cellules, le cytoplasme se retrouve au contact de l'air et du cytoplasme d'autres cellules ; et les réactions chimiques provoquées génèrent des produits colorés adhérant aux protéines ou aux parois (appelés pigments nécrogéniques). Ce symptôme constitue l'indication la plus claire et la plus utilisée pour identifier des dommages dus au gel. Dans certains tissus, on n'observe pas de formation de ces pigments nécrogéniques, ils se

décolorent et deviennent vert pâles, jaunes ou blancs. A la suite d'un hiver rude, la formation de chlorophylle devient défectueuse engendrant la formation de nouvelles feuilles chlorotiques.

Le dépérissement des tissus gelés engendre la formation de lacunes dans les feuilles, d'étranglement dans les racines, rameaux et pétioles et le dépérissement des extrémités des rameaux et des racines. Ces lésions, au niveau des zones méristématiques, peuvent engendrer des malformations (chancres : Zalaski, 1975 a ; b). En effet, le développement des cellules adjacentes aux lésions est perturbé, elles deviennent anormales en forme, taille et orientation (Simons & Lott, 1963) car la lacune ne génère pas d'inhibition de la croissance par mécanoperception du contact intercellulaire (Coutand & Moulia, 2000 ; Couturier, 2009). La migration de la glace suit les voies vasculaires et les dégâts les plus importants sont trouvés au niveau des cellules adjacentes (Simons & Lott, 1963). Le gel des bourgeons peut également avoir comme conséquence de retarder le débourrement, la floraison ou engendrer la stérilité des appareils reproducteurs (Sakai & Larcher, 1987).

3. Mécanismes de résistance

Les conditions hivernales constituent un ensemble de stress abiotiques en interactions (basses températures, gel, osmotique, hydrique, mécanique,...) dont les impacts sont minimisés par une réponse adaptative impliquant de multiples mécanismes d'acclimatation (augmentation transitoire de la résistance au stress à une échelle temporelle inférieure à une génération). Ainsi, l'acquisition d'une résistance au gel, peut être définie comme une plasticité phénotypique transitoire, une acclimatation particulière aux températures gélives, que l'on appelle le plus souvent : l'endurcissement.

Si l'on reprend l'analogie mécanique effectuée par Levitt (1980), on peut considérer qu'un stress engendre deux types de contraintes sur l'organisme exposé : une contrainte élastique qui engendre une déformation réversible et une contrainte plastique ayant des effets irréversibles. En réponse à un stress, il existe deux méthodes pour résister aux contraintes engendrées par ce stress, soit l'évitement, du stress ou de la contrainte, permettant de ne pas être exposé aux effets négatifs, soit la tolérance permettant de ne pas subir ces effets négatifs. Cette analogie permet de définir quatre stratégies de résistance qui peuvent être retrouvées dans ce que l'on regroupe sous le terme générique d'acclimatation au froid :

éviter le stress (1)

tolérance au stress : éviter la contrainte élastique (2)

tolérance à la contrainte élastique :

éviter la contrainte plastique (3)

tolérance à la contrainte plastique (4)

Les plantes sont capables d'utiliser de multiples stratégies pour éviter les contraintes engendrées par le gel. On retrouve à la fois des mécanismes d'évitement et de tolérance (Sakai & Larcher, 1987). On peut regrouper les plantes au sein de trois catégories différentes selon leur réponse vis-à-vis du froid (Pearce, 1999) :

- plantes sensibles au froid endommagées par des températures inférieures à 12°C (majoritairement d'origine tropicale).
- plantes tolérantes au froid mais sensibles au gel (capables de s'acclimater aux températures inférieures à 12°C mais ne survivant pas au gel).
- plantes tolérantes au gel (capables de s'acclimater et de survivre à des températures gélives).

3.1. Evitement du stress thermique :

3.1.1. Par évitement de l'aléa (production ou conservation de chaleur)

Les plantes sont des organismes poïkilothermes, de la même température que leur environnement ; elles n'ont donc pas la possibilité d'éviter le stress dû aux basses températures. Certaines stratégies ont tout de même été développées comme dans le cas des inflorescences de *Symplocarpus foetidus* qui par un métabolisme respiratoire fortement exothermique parviennent à élever leur température jusqu'à 15 à 30°C au dessus de la température ambiante même pour une température de l'air inférieure à -10°C (Knutson, 1974) (Figure 1.17). Les métabolismes respiratoires résistant aux cyanides (Meeuse 1975 ; Lambers, 1982) et une forte activité catalytique de la PEP carboxylase (ap Rees *et al.*, 1981) sont responsables de cette production de chaleur. Ces inflorescences parviennent par ce biais à percer le manteau neigeux et à fleurir en Janvier (Levitt, 1980).



Figure 1.17. Inflorescence de *Symplocarpus foetidus* perçant la glace au printemps (d'après <http://www.lookfordiagnosis.com>).

Un autre évitement du stress dû aux basses températures consiste en une atténuation du refroidissement radiatif par isolation thermique des organes sensibles. Par exemple, les mouvements nyctinastiques des feuilles et des pétales permettent de minimiser la perte de chaleur au niveau des organes protégés. Les mouvements des feuilles de Fabacées permettent de conserver une température de 1K supérieure à celle de l'air ; ce qui peut être décisif pour limiter les blessures dues au gel chez certaines plantes sensibles (Schwintzer, 1971 ; Enright, 1982).

La litière permet de limiter le refroidissement radiatif (Hedberg & Hedberg, 1979) ou un ensemble dense de feuilles mortes restant attachées aux tiges permet de protéger bourgeons, cambium et tissus conducteurs chez les mégaphytes tropicales de haute montagne (Goldstein *et al.*, 1985). Citons également les écailles des bourgeons qui jouent le même rôle et qui le plus souvent prennent en glace en premier libérant de la chaleur pour les méristèmes (Derreudre et Gazeau, 1992) ou pour les racines tout simplement la grande inertie thermique du sol par rapport à l'air, de même que la présence d'un manteau neigeux ayant un fort effet isolant.

Certaines plantes à fort rapport volume/surface (*i.e.* succulentes) peuvent stocker la chaleur intense le jour pour se protéger du refroidissement dû aux faibles températures nocturnes, retardant de 2 à 3h la diminution de température par rapport aux températures de l'air environnant (Mooney *et al.*, 1977 ; Nobel, 1980). Ainsi, l'intérieur de la plante reste plus chaud que sa surface de quelques degrés durant la nuit (Ruthsatz, 1978).

D'autres plantes ayant une morphologie qui les maintient proches du sol profitent d'une meilleure conduction de la chaleur du sol (*i.e.* rosettes). Ainsi, des différences morphologiques peuvent avoir un impact important sur les risques de dommages. Par

exemple, chez la fabacée *Centrosema virginianum*, des écotypes de hautes latitudes avec un hypocotyle court sont moins exposés aux gels que ceux de plus basses latitudes avec un hypocotyle plus long. Leurs différences de résistance résident seulement dans leur morphologie et, non dans leur capacité de tolérance au gel (Clements & Ludlow, 1977).

Plus généralement la morphologie des plantes selon la classification de Raunkier (1904) permet d'identifier les formes plus ou moins exposées aux froids hivernaux (Figure 1.18). Cette classification est basée sur la position des méristèmes lors de la saison hivernale. Ces adaptations morphologiques sont directement liées à l'action du froid et de la dessiccation hivernale et l'on peut mettre en évidence une corrélation entre résistance au froid et protection vis-à-vis du froid (Sakai & Larcher, 1987). Les plantes recouvertes par le manteau neigeux, ou par une couche de glace en hiver ne nécessitent pas un durcissement important à la différence des phanérophytes en partie exposées qui doivent développer leur résistance (Till, 1956 ; Yoshie & Sakai, 1981).

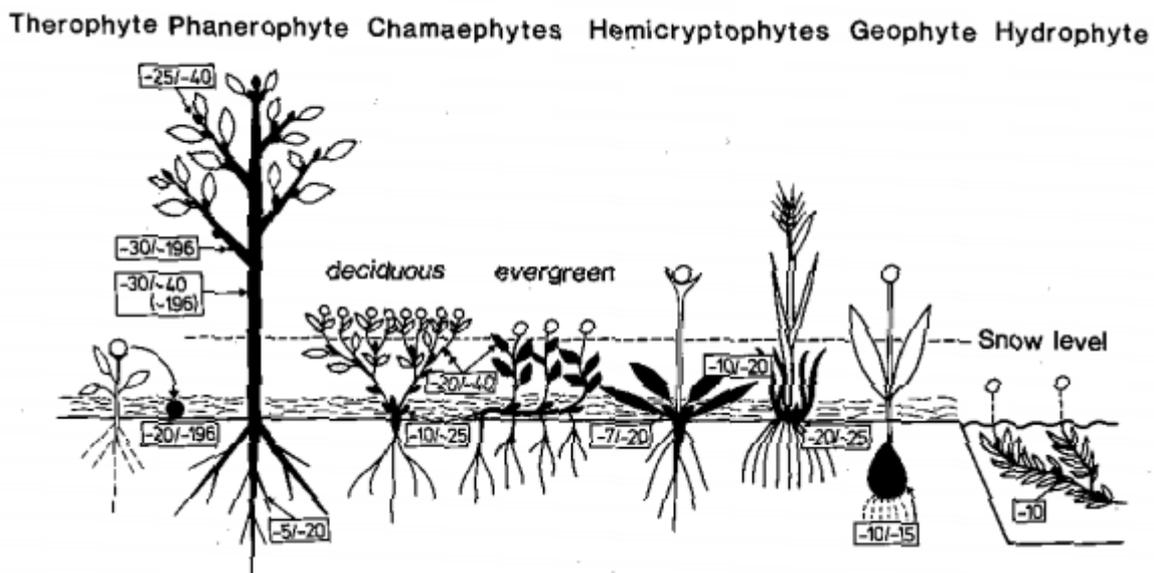


Figure 1.18. Niveaux de résistances au gel observés dans les différents types morphologiques définis selon la classification de Raunkier. Les parties persistantes en hiver sont en noir (d'après Sakai & Larcher, 1987).

3.1.2. Par évitement de l'exposition (phénologie)

La phénologie est l'étude de l'apparition d'évènements périodiques biologiques sous influence climatique, ce terme est également étendu à l'étude de ces dates d'apparition. Pour éviter l'exposition aux températures froides, la phénologie synchronisée avec les périodes critiques d'exposition au gel permet de protéger les stades ontogénétiques sensibles. La sénescence foliaire automnale et l'entrée en dormance permettent de réduire le risque de gel.

De la même manière, le synchronisme du débourrement, feuillaison, floraison et croissance des rameaux réduit le risque de gel printanier. Ainsi, le risque est diminué pour les plantes plus tardives même si elles sont moins résistantes au même stade phénologique (Till, 1956). La phénologie est donc un élément particulièrement important concernant le risque de gel printanier en marges froides : hautes latitudes (Langlet, 1937) et altitudes (Tranquillini, 1979). On considère deux périodes critiques concernant l'impact du gel sur la survie des plantes, l'automne lorsque l'organisme n'est pas encore totalement endurci et le printemps alors qu'il n'est plus acclimaté.

Durant leur période de croissance, en général, les plantes ne sont pas ou peu résistantes au gel car les conditions environnementales sont favorables (Fitter & Hay, 1987) ; des rameaux de *Salix sp*, *Picea abies*, *Alnus glutinosa* ou *Betula verrucosa* sont lésés à partir de -3°C (Christersson, 1985), voire chez certaines espèces du genre *Salix*, -1°C (von Fircks, 1985). Les aiguilles du pin sylvestre ne survivent qu'à des températures supérieures à -10°C en phase de croissance et inférieures à -80°C en plein hiver (Beck *et al.*, 2004). Ainsi, seules les plantes soumises à une forte pression adaptative sont capables de survivre au gel en saison de croissance (zones boréales, d'altitude).

3.2. Résistance aux basses températures : Evitement de la contrainte due au froid

L'un des mécanismes majeurs consiste en une conservation de la fluidité membranaire par maintien de la bicouche lipidique dans un état liquide cristallin nécessaire à son activité biologique. En effet, le maintien d'une membrane fluide permet de conserver une perméabilité et de limiter les contraintes sur les protéines membranaires, causes de diminution de leur activité (Wolfe *et al.*, 1978). Sa composition va donc être un paramètre critique (Yoshida & Uemura, 1990). La membrane mitochondriale des plantes résistantes au froid contient une proportion supérieure d'acides gras polyinsaturés (Lyons *et al.*, 1964), de phospholipides, notamment la phosphatidylcholine et la phosphatylethanolamine (Yoshida & Sakai, 1973). Une modification artificielle de la membrane plasmique permet ainsi d'augmenter la tolérance au gel d'1 à 2°C par introduction de phosphatidylcholine mono- et bi-insaturées (Steponkus *et al.*, 1988) ou de la protéine COR15a, interagissant avec les membranes (Artus *et al.*, 1996).

Pour conserver une capacité d'adaptation rapide, il est nécessaire pour les plantes de pouvoir répondre rapidement aux variations de la température. Le remplacement des enzymes instables à basses températures ou avec une activité catalytique trop faible, par des

isoenzymes plus stables permet de maintenir le métabolisme à l'état actif (Alekhina & Sokolova, 1974). Chez les plantes résistantes, l'activité enzymatique est linéaire en fonction de la température, alors qu'elle chute rapidement en deçà d'une température seuil chez les plantes sensibles (Côme *et al.*, 1992 ; Lyons *et al.*, 1979) (Figure 1.8). Certaines enzymes, particulièrement importantes dans le phénomène d'endurcissement, ont une activité supérieure à faible température. La RuBPCase (Ribulose BiPhosphate Carboxylase Oxygénase) en est un exemple chez le riz. Chez les plantes acclimatées, on observe une variation des propriétés électrophorétiques (Huner & McDonald, 1976a, b), une plus grande stabilité à basse température, notamment au niveau des ponts disulfures et une plus grande affinité pour le CO₂ (Huner & McDonald, 1979a, b). Une autre solution consiste en une augmentation des quantités d'enzymes exprimées pour compenser la diminution de son activité catalytique à basse température (Alekhina *et al.*, 1975).

Le plus souvent, lors d'une exposition aux basses températures, il y a formation de molécules à fort potentiel oxydant pouvant altérer par cascade la structure de différentes molécules. Pour pallier cela, un métabolisme détoxifiant est mis en place utilisant des enzymes dégradant ces composés toxiques (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase), réduisant les composés oxydés (glutathion réductase, dehydroascorbate réductase), et des composés antioxydants non enzymatiques (β carotène, α - tocophérol, glutathion, ascorbate). Les basses températures inhibant l'activité enzymatique, les composés non enzymatiques sont majoritairement mis à contribution lors de ce stress (Taulavuori *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 1999).

3.3. Résistance aux températures gélives

Chez les plantes ligneuses, des stratégies d'évitement et de tolérance à la formation de glace sont rencontrées (Sakai & Larcher, 1987 ; Malone & Ashworth, 1991). En limitant la présence de points de nucléation, la cristallisation est empêchée, ce qui permet au cytosol d'être dans un état de surfusion. Mais en cas de gel important et rapide, il intervient au niveau intracellulaire en provoquant des lésions irréversibles pour les organes touchés (Rodrigo, 2000). Pour se protéger davantage, le gel extracellulaire est favorisé. Il permet à la cellule de se servir du dégagement de chaleur latente provoqué par la cristallisation pour maintenir sa température . Il permet également au cytoplasme de la cellule de se déshydrater, en utilisant la force de succion de la glace pour alimenter l'apport de molécules d'eau venant cristalliser sur la glace extracellulaire formée. La formation de gel au niveau extracellulaire obéit ainsi aux lois de la stochastique, le volume de liquide extracellulaire étant bien supérieur au volume de

cytosol, la formation de glace y est plus probable. De plus, des irrégularités sur les parois forment des points de nucléation, alors que l'eau intracellulaire est liée par des forces d'adsorption (Wolfe & Bryant, 2001). Enfin, la concentration de ce milieu est, dans la majorité des cas, plus faible que la concentration du milieu cellulaire où l'abaissement de température augmente la viscosité du cytosol et diminue la vitesse de réarrangement des molécules d'eau lors de la formation des cristaux (Cavender-Barès *et al.*, 2005).

3.3.1. Evitement de la formation de glace

3.3.1.1. Par abaissement du point de fusion (accumulation de solutés et déshydratation)

Une plus forte résistance au gel s'accompagne généralement d'une diminution du contenu en eau et d'une augmentation en solutés, tels que sucres et protéines (Levitt, 1980 ; Guy, 1990). L'accumulation de solutés permet d'abaisser le point de fusion de $1,86^{\circ}\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$. Par exemple, certaines larves d'insectes peuvent accumuler jusqu'à $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en plein hiver abaissant le point de fusion jusqu'à $-17,5^{\circ}\text{C}$ (Salt, 1958). Chez les végétaux, les concentrations en solutés ne dépassent pas quelques centaines de milliOsmoles, générant une pression osmotique de l'ordre de 1 MPa (Cavender-Barès, 2005) et l'abaissement du point de fusion ne dépasse pas -2 à -4°C (Levitt, 1980 ; Wolfe *et al.*, 2002). Même si un évitement complet de la congélation par ce moyen n'est pas le mécanisme unique d'évitement de la formation de glace, l'accumulation de solutés permet en partie de protéger les plantes en combinaison avec d'autres mécanismes comme la déshydratation cellulaire au profit de la glace extracellulaire décrite précédemment.

Ainsi, si chez certaines espèces (par exemple le blé ou le colza), aucune relation n'est observée entre contenu en sucres et tolérance au froid, voire même une relation inverse dans certains cas (Green & Ratzlaff, 1975), la majorité des observations montre que la quantité de sucres solubles et de polyols est corrélée à la capacité de résistance de l'arbre à un instant t (Aronsson, 1975). Alors que le contenu total en sucres non structuraux permet de déterminer la capacité maximale de résistance de l'espèce (Morin *et al.*, 2007).

La proportion des différents sucres varie selon l'espèce en lien avec les différents métabolismes spécifiques de chaque espèce (Sakai, 1962). Chez certaines (*Gardenia jasminoides*, *Prunica granatum*, *Sorbus aucuparia*) ce sont des polyols, tels que sorbitol ou mannitol, qui composent environ 40% du contenu total en sucres et qui sont corrélés à la résistance au gel (Sakai, 1966b ; Raese *et al.*, 1977 ; Ichiki & Yamaha, 1982). Par contre, l'un

des composés cryoprotectants important chez les insectes, le glycérol, ne semble pas être retrouvé chez les arbres (Sakai, 1961).

D'autres solutés, outre les sucres solubles et les polyols, sont par contre rencontrés, tels que des acides aminés (Smith, 1968), notamment la proline (Withers & King, 1979).

L'efficacité cryoprotectante de ces différentes molécules (par infiltration de la même concentration (0.7 M) et mesure de l'évolution de la résistance au gel a été caractérisée par Sakai (1960a). Ainsi, l'éthylène-glycol, le glycérol et le saccharose ont un effet fortement cryoprotecteur, le glucose, le xylose et l'acétamide également mais dans une moindre mesure, ainsi que le raffinose, le mannitol, l'urée, l'éthanol ou le glycol. Par contre, des sels inorganiques tels que le KNO_3 n'ont quasiment aucun effet.

L'augmentation du contenu en solutés exerce donc un effet protecteur par l'intermédiaire de trois mécanismes différents :

- effet osmotique : l'augmentation du contenu en solutés diminue la température de congélation et limite la déshydratation engendrée par la glace,
- effet métabolique : ces solutés sont potentiellement une source de substrats pour différentes voies métaboliques dans des conditions où la photosynthèse est fortement réduite.
- effet cryoprotectant *stricto sensu* : protection des cellules, organites, membranes et macromolécules par maintien ou remplacement de la couche de solvation (Sakai, 1962 ; Heber & Santarius, 1973 ; Steponkus, 1977 ; Heber *et al.*, 1979 ; Krause *et al.*, 1982 ; Santarius, 1982). La présence de solutés permet de maintenir une couche de solvation autour des macromolécules en maintenant leur stabilité (Yoon *et al.*, 1998, Kasuga *et al.*, 2006 ; 2007). Ceci semble être engendré par des composés variés : sucres solubles, acides organiques, aminés, lipides ou protéines (Sauter & van Cleve, 1991 ; Sauter & Wellenkamp, 1998 ; Hoch *et al.*, 2002). Il a également été souligné l'importance des RFOs dans la protection des membranes (Pennycooke *et al.*, 2004).

3.3.1.2. Surfusion

L'état de surfusion est un état transitoire et instable permettant une protection contre le refroidissement radiatif rapide jusqu'à 3 à 8 K sous la température de congélation des tissus (Hatakeyama, 1960 ; 1961 ; Kaku, 1975 ; Marcellos & Single, 1979) (Figure 1.2). Certaines plantes peuvent rester en état de surfusion jusqu'à des températures de -15°C à presque -40°C , chez la plupart des arbres des zones tempérées, comme le pommier ou l'érable (Burke *et al.*,

1976). La limite théorique de la surfusion est en effet de $-38,1^{\circ}\text{C}$ pour de l'eau pure (Rasmussen & McKenzie, 1972 ; Gusta *et al.*, 1983). La surfusion peut être limitée à certains organes ou tissus comme dans le parenchyme xylémien du pommier tandis que l'écorce est congelée en extracellulaire (Ashworth *et al.*, 1988). Cette différence a également été observée dans les bourgeons floraux de *Forsythia sp* et de *Acer sp* par rapport aux écailles des bourgeons ou aux rameaux (Ashworth, 1990 ; Ishikawa *et al.*, 1997).

Les caractéristiques nécessaires à la surfusion ne sont pas entièrement mises en évidence mais elles incluent une petite taille des cellules, peu d'espaces intercellulaires, une humidité faible, l'absence d'agent de nucléations intrinsèques, des barrières contre les agents de nucléation externes et la présence d'agents antinucléation (Shearman *et al.*, 1973). On retrouve également une augmentation des sucres solubles pouvant faciliter la surfusion en abaissant le point de congélation (Kasuga *et al.*, 2006 ; 2007).

La surfusion ne peut s'établir que s'il y a absence de point de nucléation intracellulaire ce qui peut être favorisé par différentes molécules. Par exemple, les arabinoxylanes des parois cellulaires auraient un effet anti-nucléateur chez le riz et l'orge modifiant à la fois la vitesse de formation et la morphologie des cristaux (Kindel *et al.*, 1989 ; Olien, 1965 ; Olien & Smith, 1977 ; Williams, 1992). Leur composition est diverse : alors qu'ils ne sont ni protéiques, ni lipidiques chez le pêcher (Ashworth *et al.*, 1985 ; Gross *et al.*, 1988), ils sembleraient protéiques chez le riz (Brush *et al.*, 1994).

Certaines protéines ont également une activité anti congélation (Anti-Freeze Protein) par contrôle des sites de nucléation, diminution de la vitesse de croissance des cristaux, ou l'inhibition de la recristallisation et sont rencontrées dans l'apoplasme (Hon *et al.*, 1994 ; Pihakashi-Maunbach *et al.*, 1996 ; 2001) et dans la sève chez de nombreuses plantes vasculaires et non vasculaires et dans l'ensemble du monde vivant (Duman & Olsen, 1993 ; Urrutia *et al.*, 1992). Leurs structures sont variées autant chez les plantes que chez les insectes ou les poissons, et leur hystérèse thermique y est inférieure ($0,1$ à $0,7^{\circ}\text{C}$; Griffith & Antikainen, 1996). L'activité des AFPs ne semble s'initier qu'en présence d'un agent nucléateur, en abaissant la température de formation de la glace jusqu'à $1,2^{\circ}\text{C}$, alors qu'en absence d'agent nucléateur, elle n'ont pas d'effet sur la capacité de surfusion (Griffith *et al.*, 2005). L'extrait apoplastique de feuilles de riz contient six polypeptides différents ayant des propriétés anti-congélation (Hon *et al.*, 1994) appartenant à des classes de protéines liées aux pathogènes (endochitinases, β -1,3-endoglucanases et thaumatine like ; Griffith & Antikainen, 1996). Elles sont trouvées sous la forme oligomérique, chaque oligomère contenant plus d'une des classes précédemment citées (Yu & Griffith, 1999).

3.3.1.3. Vitrification

Une résistance extrême peut s'établir en dessous de la limite théorique de nucléation homogène de l'eau. Dans les cellules du parenchyme xylémien de l'osier, la glace peut se former entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique sans l'endommager. En effet, en cas de congélation suffisamment rapide, le cytosol ne va pas congeler mais former une phase amorphe au sein de laquelle les mouvements browniens sont extrêmement ralentis voire proche de l'immobilité : ce qu'on appelle une phase vitreuse (Wolfe & Bryant, 1999). On parle de phase vitreuse lorsque la viscosité d'un système devient supérieure à $10^{14} \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ alors que celle de l'eau est de l'ordre de $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$ à 20°C (Franks, 1982). La vitesse nécessaire pour vitrifier de l'eau pure est de l'ordre de $10^7 \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$, alors que pour une solution aqueuse contenant des solutés cryoprotectants, elle sera de l'ordre de 0,1 à $10 \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$ (Wolfe & Bryant, 1999). Ainsi, afin d'atteindre cet état vitreux, il est nécessaire pour ne pas être létal que les membranes soient stabilisées par des solutés cryoprotectants évitant les fractures potentielles. Ainsi, la formation d'une phase vitreuse dans l'espace interlamellaire, ou entourant totalement la membrane permet à celle-ci de ne plus subir de déshydratation par la glace environnante et donc de la protéger. Des solutés de faible poids moléculaire peuvent également vitrifier à l'intérieur de macromolécules leur permettant ainsi de conserver leur intégrité structurale, et donc leur activité au dégel. On observe donc parfois un état de vitrification comme chez le peuplier (Hirsh *et al.*, 1985) ce qui explique pourquoi certaines espèces pourraient survivre à la température de l'azote liquide (Sakai, 1960b).

3.3.2. Tolérance à la glace

La tolérance à la glace intracellulaire n'est pas rencontrée chez les végétaux car elle engendre généralement des contraintes importantes sur la membrane plasmique, les organites et les macromolécules. Mais, la formation de glace au niveau extracellulaire est beaucoup plus commune, et la tolérance à sa formation fait partie des mécanismes de résistance et, est même considérée comme étant une composante majeure de la résistance au gel (Levitt, 1980). Dans la majorité des cas, la congélation a lieu en extracellulaire (dans les feuilles ou l'écorce par exemple). A cause de son plus faible potentiel chimique, la glace déshydrate le contenu cellulaire.

La congélation intracellulaire est fortement dépendante de la température. Pour éviter la congélation intracellulaire, la cellule doit pouvoir se déshydrater rapidement afin d'abaisser son point de congélation et éviter la formation de glace. Un faible contenu en eau et une forte concentration en soluté sont des facteurs favorables à l'évitement de la congélation

intracellulaire lorsque la glace est préalablement formée en extra. Par ailleurs, une grande surface d'échange et une forte perméabilité membranaire permettent d'avoir une capacité d'osmose rapide (Levitt & Scarth, 1936 ; McKenzie *et al.*, 1974). Ainsi, pour maintenir une perméabilité membranaire, la température de transition de phase de la bicouche lipidique doit être inférieure au point de fusion du cytoplasme (Lee, 1975).

Cette glace extracellulaire exerce donc une forte contrainte de déshydratation sur le cytosol. Pour limiter la déshydratation du protoplasme, on observe la présence de larges vacuoles dans les cellules car l'eau y est liée sous forme hydrocolloïdale alors que l'eau vacuolaire est pure (Johansson & Krull, 1970). On observe également une synthèse de déhydrines qui sont produites en réponse à l'ensemble des stress exerçant une contrainte de déshydratation (Stress hydrique, salin, gel) (Campbell & Close, 1997). Ces déhydrines sont des protéines d'un poids moléculaire de 9 à 200kD (Close, 1996). Ces protéines sont composées d'hélices α amphiphiles leur permettant de se placer à l'interface entre membrane et cytosol dans les cellules (Segrest *et al.*, 1990 ; Campbell & Close, 1997). Ainsi, elles pourraient stabiliser les structures cellulaires en cas de déshydratation (Close, 1997 ; Egerton-Warburton *et al.*, 1997 ; Danyluk *et al.*, 1998).

Entre l'espace extracellulaire gelé et la cellule encore à l'état liquide, une forte contrainte mécanique est engendrée par l'augmentation de volume. On observe chez les plantes tolérantes à la congélation un épaissement de la paroi atténuant cette contrainte (Kuroda & Sagisaka, 2005, Wei *et al.*, 2006).

3.4. Résistance à l'embolie hivernale

L'embolie hivernale interrompt les flux de sève brute entre racines et organes en croissance. Il est donc nécessaire de résorber cette embolie pour qu'au printemps les bourgeons puissent être alimentés en eau et croître correctement (Wang *et al.*, 1992). On distingue différentes stratégies pour minimiser les contraintes engendrées par ce phénomène (Figure 1.19). Chez les arbres à feuillage persistant, un évitement de l'embolie est nécessaire pour maintenir un flux hydrique permanent jusqu'aux organes photosynthétiques. On retrouve, ainsi, chez les conifères, des trachéides, éléments conducteurs de très faible diamètre, qui permettent de diminuer fortement le risque d'embolie (selon la loi de Laplace présenté précédemment). Et, également, au niveau des ponctuations, des *torus* sont présents et permettent d'obstruer la ponctuation lorsqu'il y a une différence de pression entre deux trachéides. Malgré leur forte résistance, les conifères peuvent tout de même s'emboliser en cas de fort stress hydrique (Mayr *et al.*, 2002) et de fréquents évènements de gel/dégel (Mayr

et al., 2003a ; b). Il a été décrit, pour des tensions de la sève de l'ordre de -2 MPa, des formations d'embolie (Mayr *et al.*, 2007) en fonction du nombre de cycles de gel/dégel (plusieurs dizaines). On observe des capacités à résorber cette embolie alors que le sol est encore gelé suggérant des possibilités de circulation de l'eau à l'intérieur de l'arbre pour remplir les trachéides (Mayr & Schmid, 2006).

Chez les arbres dont l'embolie se développe au cours de l'hiver, au fur et à mesure des cycles gel/dégel, il existe trois mécanismes différents. Certains arbres à gros vaisseaux (jusqu'à $300\ \mu\text{m}$ de diamètre et $3\ \text{m}$ de long), tels que *Quercus sp* (Cruziat *et al.*, 2002) ou *Fraxinus sp* (Cochard *et al.*, 1997), sont embolisés dès le premier gel et n'ont aucun mécanisme pour générer une pression suffisante à la résorption de cette embolie. Leur stratégie est donc de former un nouveau cerne de vaisseaux conducteurs par croissance cambiale au moment du débourrement. En parallèle, les vaisseaux embolisés sont rapidement obstrués par des thylles (excroissances des cellules associées aux vaisseaux) pour éviter ou limiter toute attaque parasitaire dans le xylème (Sperry & Tyree, 1988 ; Cochard & Tyree, 1990).

D'autres espèces, *Acer sp*, *Juglans sp*, présentent un taux d'embolie qui se développe puis diminue au cours de l'hiver. Ils sont capables de générer une pression dans le xylème qui remplit d'eau les vaisseaux embolisés (Ewers *et al.*, 2001). Ce mécanisme de réparation appelé poussée de branche est généré par l'hydrolyse de l'amidon contenu dans les parenchymes en sucres solubles. Ces sucres, par l'intermédiaire de la pression osmotique qu'ils créent, vont générer un flux d'eau vers les vaisseaux et permettre leur remplissage pour maintenir un taux de vaisseaux fonctionnels pendant l'hiver. Ce mécanisme se met en place lorsque la température est faiblement négative (0 à -5°C), donc, lorsque le risque d'embolie augmente (Améglio & Cruziat, 1992 ; Améglio *et al.*, 2000 ; 2001 ; 2002 ; 2004).

Le dernier mécanisme a lieu à la fin de l'hiver, peu avant le débourrement, généralement chez des espèces dont la formation d'embolie est progressive comme *Fagus sp* (Hacke & Sauter, 1995), *Acer sp* (Sperry *et al.*, 1988), *Betula sp* (Strati *et al.*, 2003) ou *Juglans sp* (Ewers *et al.*, 2001). Une poussée racinaire se met en place sous l'effet d'une augmentation de la pression osmotique dans les racines (Priestley, 1920 ; Zhu *et al.*, 2000).

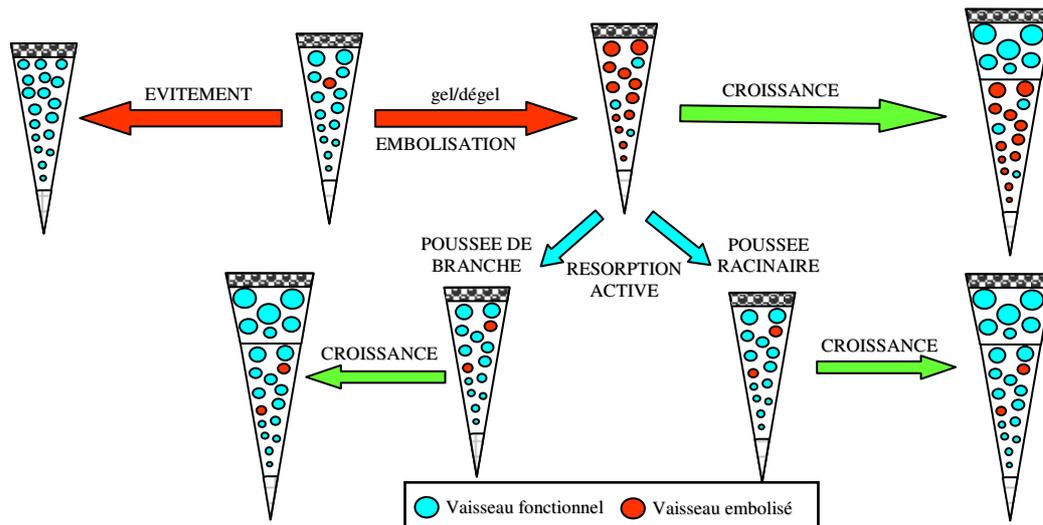


Figure 1.19. Différents mécanismes de résistance à la formation d'embolie hivernale (d'après Cruziat *et al.*, 2002).

Cette pression est générée dans ce cas par des composés minéraux azotés essentiellement (nitrates, nitrites) en relation avec une augmentation de la température du sol (Ewers *et al.*, 2001).

4. Perception des signaux environnementaux

Avant de réagir aux contraintes environnementales et de développer une réponse *ad hoc*, il est nécessaire de percevoir les changements intervenant dans l'environnement immédiat de la plante. Nous avons vu qu'en hiver la température et la photopériode diminuaient, ainsi, la prochaine partie va décrire la perception de ces signaux environnementaux par les plantes. Pour cela, une variation de paramètres physiques va devoir être transformée en variation de paramètres biochimiques afin d'initier par l'intermédiaire d'une (ou plusieurs) voies de transduction du signal une réponse physiologique (l'acclimatation).

4.1. Température

Les signaux environnementaux perçus par les plantes pour initier ou stopper le processus d'acclimatation au froid sont principalement la diminution de la photopériode et la température. Alors que différentes études ont montré l'effet de la dénaturation de certaines protéines sur la perception et l'activation d'une voie de réponse au stress thermiques chauds (Sugio *et al.*, 2009 ; Yamada *et al.*, 2007 ; vonKoskull-Döring *et al.*, 2007) ; de multiples mécanismes peuvent potentiellement permettre la perception des basses températures (Figure

1.20). Mais, jusqu'à présent, la voie employée n'est pas clairement identifiée et n'est peut être pas unique. Si l'on considère la perception comme étant l'étape convertissant un paramètre physique en paramètre biochimique, nous allons présenter les étapes initiales déclenchant des voies de réponse au froid identifiées jusqu'à présent. Comme nous l'avons vu précédemment, la température a un effet sur la fluidité membranaire et une baisse de la température est perçue à ce niveau dans les organismes unicellulaires procaryotes et eucaryotes (Vigh *et al.*, 2007). Chez les plantes, cela n'a pas été démontré directement mais, en utilisant des composés qui vont rigidifier la membrane à température ambiante, des réponses similaires à des réponses au froid ont été obtenues (Örvar *et al.*, 2000 ; Sangwan *et al.*, 2001). Une autre approche a été d'utiliser des mutants sur la désaturase (FAD) pour montrer que ces plantes répondent à des températures plus élevées sur la voie de la phospholipase C (18°C chez les mutés *vs.* 14°C chez les sauvages ; Vaultier *et al.*, 2006), ou des activités protéolytiques induite par le froid (Seo *et al.*, 2010) ce qui suggère que leur membrane plus rigide est un signal activateur de la réponse au froid.

La chute des températures provoque la dépolymérisation d'agencements multimériques de peptides : les microtubules et microfilaments, constituants du cytosquelette (Hardham & Gunning, 1978 ; Ilker *et al.*, 1979). En outre, la présence de molécules stabilisatrices des microtubules et des microfilaments (comme le taxol ou le jasplakinolide) inhibe l'activation d'un promoteur induit par le froid tandis qu'il est activé à 25°C en présence de molécules déstabilisantes : colchicine ou latrunculine B (Sangwan *et al.*, 2001).

L'activité enzymatique étant fortement dépendante de la température (par modification de l'activité catalytique et par inactivation ou dénaturation des enzymes), le métabolisme peut être différemment modulé. Au niveau d'une voie métabolique, chaque enzyme ayant une sensibilité différente, certains composés peuvent être formés tandis que d'autres voient leur quantité diminuer (Kaplan *et al.*, 2004 ; Guy *et al.*, 2008 ; Korn *et al.*, 2010). Ainsi certains composés ou un déséquilibre entre différents composés, peuvent être indicateurs de changement de température à travers son impact sur une voie métabolique donnée. Par exemple, lors de la photosynthèse, la formation de sucres à partir de trioses phosphate va être ralentie et ces composés vont s'accumuler limitant la reformation du stock de phosphate inorganique (Labate *et al.*, 1990 ; Savitch *et al.*, 1997 ; Cen & Sage, 2005). Un déficit en phosphate inorganique constitue un signal qui peut induire l'expression de gènes de réponses aux basses températures (Zhao *et al.*, 2009).

L'effet des températures froides peut s'exercer au niveau de l'expression, de la transcription et de la traduction. Le degré de surenroulement de l'ADN évolue en fonction de

la température. Certaines régions fortement surenroulées contiennent les éléments régulateur de *desB* un gène fortement induit par le froid et dont la novobiocine (inhibiteur de l'ADN gyrase) inhibe fortement l'expression (Los, 2004). La structure secondaire des ARNs est stabilisée au froid. Ceci influence différentes réactions impliquant les ARNs tels que l'épissage, l'exportation (Iida *et al.*, 2004 ; Filichkin *et al.*, 2010). Chez certains procaryotes, des séquences régulatrices à proximité du RBS (Ribosome Binding Site) permettent une liaison différentielle de protéines régulatrices selon la température (Naberhaus *et al.*, 2006).

Le froid induit une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) dans la cellule (Plieth *et al.*, 1999 ; Knight *et al.*, 1991) par ouverture de canaux spécifiques au calcium (Ding & Pickard, 1993 ; Bush, 1995). Ce Calcium peut être d'origine apoplastique ou vacuolaire (Lewis *et al.*, 1997 ; Monroy & Dhindsa, 1995 ; Monroy *et al.*, 1993). Un influx de calcium induit expérimentalement génère l'expression de gènes de réponse au froid sans exposition à des basses températures alors qu'une chélation du Calcium ou un blocage des canaux calciques inhibe leur expression (Monroy & Dhindsa, 1995). Ces cations divalents interagissent avec les groupements phosphates, comme ceux libérés par l'action des phospholipases activées par le froid (Ruelland *et al.*, 2009) et engendrent une rigidification de la membrane par formation de deux liaisons ioniques par Ca^{2+} (Faraudo & Travasset, 2007). La phospholipase D peut

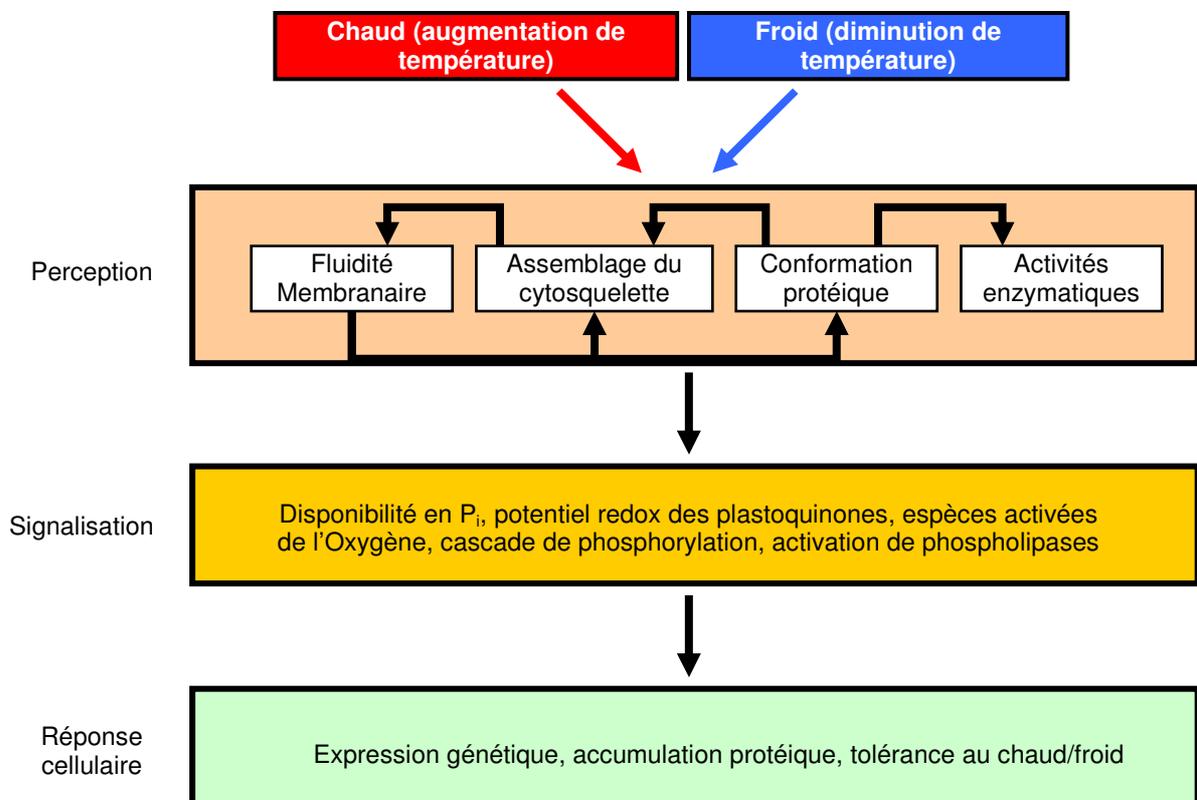


Figure 1.20. Mécanismes de perception et de réponses cellulaires à la température (d'après Ruelland & Zachowski, 2010)

induire la déstabilisation des microtubules (Dhonukshe *et al.*, 2003). Le calcium a également un impact sur la déstabilisation ou la dénaturation de protéines (Binet *et al.*, 2001 ; Hwang & Lee, 2001 ; Williams *et al.*, 2010).

Ces différents processus peuvent être concomitants et entrer en interaction à l'échelle cellulaire. Le signal froid semblerait dans un premier temps causer la rigidification de la membrane et, par conséquent, une réorganisation du cytosquelette permettant l'ouverture des canaux calciques et l'influx de Ca^{2+} . Le Calcium permettant par la suite d'engendrer une réponse au froid (Puhakainen, 2004a).

4.2. Photopériode

La perception de l'évolution de la photopériode est effectuée par différents récepteurs selon la longueur d'onde du signal lumineux. On distingue les phytochromes, absorbant dans le rouge et le rouge lointain, les cryptochromes, absorbant les UV-A et le bleu, et les phototropines (Chen *et al.*, 2004). La lumière rouge exerce un effet sur différents phytochromes (phyA, phyB, phyD et phyE), alors que la lumière bleue sur ZTL (protéine Zeitlupe), cry1 et cry2 permettant l'entraînement de l'horloge biologique (Somers *et al.*, 1998 ; Devlin & Kay, 2000 ; Kim *et al.*, 2007). En absorbant des photons, ces protéines changent de conformation et de localisation cellulaire, ce qui leur permet d'activer ou d'inhiber des voies de transduction du signal (Zhou *et al.*, 2007). A l'interface entre ces différents mécanismes d'activation/inhibition se retrouve le gène *CO* et la protéine CO dont l'expression rythmique est un marqueur de l'horloge circadienne (Jackson, 2009). Ainsi, les niveaux d'expression de CO permettent l'expression de gène impliquées dans différents processus tels que la floraison chez *Arabidopsis thaliana* (Samach *et al.*, 2000 ; Wigge *et al.*, 2005, Yamaguchi *et al.*, 2005), la tubérisation chez *Solanum tuberosum* (Martinez-Garcia *et al.*, 2002), l'arrêt de croissance chez *Populus trichocarpa* (Böhlenius *et al.*, 2006).

A des latitudes supérieures à celle du cercle polaire (66°33'38''N), l'arrêt de croissance s'effectue sans qu'il n'y ait une période nocturne *stricto sensu*, donc sans expression d'un réel photopériodisme (Taulavuori *et al.*, 2009). L'intégration de la variation de longueur d'onde du signal lumineux semblerait expliquer leur arrêt de croissance. L'intensité lumineuse dans les domaines rouge et rouge lointain augmente à l'automne et induirait l'arrêt de croissance (Puhakainen *et al.*, 2004b ; Taulavuori *et al.*, 2009).

4.3. Transduction des signaux

Seuls certains éléments ont été identifiés dans la voie de transduction du signal de basse température tels que des flux de Ca^{2+} , l'inositol phosphate, la voie des MAP kinases, kinases dépendantes du calcium, acide abscissique et un nombre important de facteurs de transcription (Guy *et al.*, 2008).

Le Calcium pour avoir une activité dans la voie de réponse au froid se lie au motif EF (hélice boucle hélice) d'une protéine spécifique liant le calcium (Snedden & Fromm, 2001). Ainsi, ICE1 (Inducer of CBFs Elements) est une protéine hélice-boucle-hélice qui induit l'expression du facteur de transcription CBF3 après exposition à des basses températures (Chinnusamy *et al.*, 2003). Les CBFs (Cold Binding Factor) sont des facteurs de transcription se liant aux régions CRT (C-repeat), séquences répétées retrouvées dans les DRE (Dehydration Responsive Element) au sein des promoteurs des gènes induits par le froid (Stockinger *et al.*, 1997 ; Baker *et al.*, 1994). Ces éléments sont impliqués dans la transduction du signal froid et l'expression des gènes *cor* (cold regulated) indépendamment de l'ABA (Lee *et al.*, 2005a). Les DRE sont impliquées à la fois dans la réponse au froid et à la sécheresse (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Il existe aussi des LTRE (Low Temperature Responsive Elements ; Hughes & Dunn, 1996). Trois gènes induits par le froid ont été identifiés chez *Arabidopsis* : *CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C*, *CBF3/DREB1A* (Thomashow *et al.*, 2001). Leur surexpression génère une résistance constitutive accrue au gel, aux sels et à la sécheresse (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998 ; Kasuga *et al.*, 1999 ; Hsieh *et al.*, 2002).

Ces CBFs sont d'autant plus exprimés que la température est basse (Shinwari *et al.*, 1998 ; Zarka *et al.*, 2003) et se lient aux régions promotrices si la température diminue, cette liaison est réversible et semble être due à un changement de conformation induit par le froid (Xue *et al.*, 2003). Au total, entre 10 et 15% des gènes induits par le froid sont régulés par l'intermédiaire des CBFs (Hannah *et al.*, 2005). Ainsi, différents écotypes naturels d'*Arabidopsis thaliana* de provenances comprises entre la Scandinavie et le Cap Vert montrent des capacités de résistance au gel contrastées. La résistance basale (non acclimaté) est en relation avec le niveau d'expression constitutive des CBFs, alors que la capacité à s'acclimater serait davantage liée à la modulation du transcriptome qu'à celle du métabolome (Hannah *et al.*, 2006).

L'exposition au gel générant également un stress hydrique, les voies de perception de ce stress peuvent être impliquées dans les processus d'acclimatation (Markhart *et al.*, 1979)

via la voie de l'acide abscissique (ABA ; Chandler & Robertson, 1994). Par exemple, la perception du signal de diminution de la photopériode pourrait induire l'expression de protéines telles que des déhydrines (Welling *et al.*, 2002). L'acclimatation au froid engendre également des changements de niveau de l'ABA, et inversement, l'ABA et un stress hydrique peuvent engendrer une acclimatation au froid (Guy, 1990 ; Veisz *et al.*, 1996). D'ailleurs, une mutation dans la voie de biosynthèse de l'ABA diminue la réponse au froid (Xiong *et al.*, 2001). Ce signal serait plus contrôlé par une sensibilité accrue à l'acide abscissique que par une variation de son niveau (Chen *et al.*, 2002).

Ainsi, il n'est pas surprenant que le niveau d'ABA augmente après exposition au froid (Chen *et al.*, 1983 ; Lång *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2002). De plus, une application exogène d'ABA génère une résistance accrue (Chen & Gusta, 1983 ; Lång *et al.*, 1989 ; Li *et al.*, 2003a). Des mutants insensibles (*abi*) ou ne pouvant synthétiser l'ABA (*aba*) ne peuvent s'acclimater (Heino *et al.*, 1990 ; Gilmour & Thomashow, 1991 ; Mäntylä *et al.*, 1995), sauf après application d'ABA exogène chez les mutants *aba* (Heino *et al.*, 1990 ; Llorente *et al.*, 2000).

Certains promoteurs de gènes activés par le froid contiennent des ABREs (ABA Responsive Elements) pouvant contribuer à l'établissement d'une réponse au froid (Hughes & Dunn, 1996). Ces ABREs sont activés par les ABRE binding proteins (AREBs ou ABFs) (Choi *et al.*, 2000 ; Uno *et al.*, 2000). Les gènes codant les ABFs sont eux-mêmes induits par l'ABA et différemment régulés : ABF1 est induit par le froid, ABF2 et ABF3 le sont par le sel et ABF4 par le froid, le sel et la sécheresse (Choi *et al.*, 2000). Plusieurs promoteurs de gènes induits par le froid ou par la sécheresse contiennent simultanément des DRE/CRT et des ABRE qui pourraient induire l'expression du gène indépendamment.

5. Dynamique de la réponse aux conditions hivernales

Au sein des zones où il existe un contraste climatique fort entre été et hiver (zones boréales, tempérées et en altitude), les plantes développent une résistance hivernale par l'intermédiaire de tout ou partie des mécanismes précédemment décrits. Plusieurs phases se succèdent, chacune permettant la mise en place de la suivante (Weiser, 1970 ; Sakai & Larcher, 1987). Par exemple, l'arrêt de croissance est une condition *sine qua non* pour permettre le début de l'acclimatation (Weiser, 1970).

La phase initiale de réponse, déclenchée par la diminution de la photopériode et des températures, après l'arrêt de la croissance, provoque une entrée en endodormance et un durcissement (Sakai & Larcher, 1987 ; Bigras & Colombo, 2001 ; Juntilla, 2007 ; Lüttge & Hertel, 2009). C'est un mécanisme se déroulant alors que le stress dû au gel n'a pas encore eu lieu. Sa mise en place implique différents niveaux de réponse, immédiate ou non. Durant la deuxième phase, induite par des basses températures (inférieures à 5°C), l'endodormance est progressivement levée et la synthèse de composés divers confère un état supérieur de résistance. Enfin lorsque les températures remontent, la croissance des bourgeons reprend progressivement au cours de la phase d'écodormance et ce, jusqu'au débourrement où de nouvelles branches et feuilles sont mises en place.

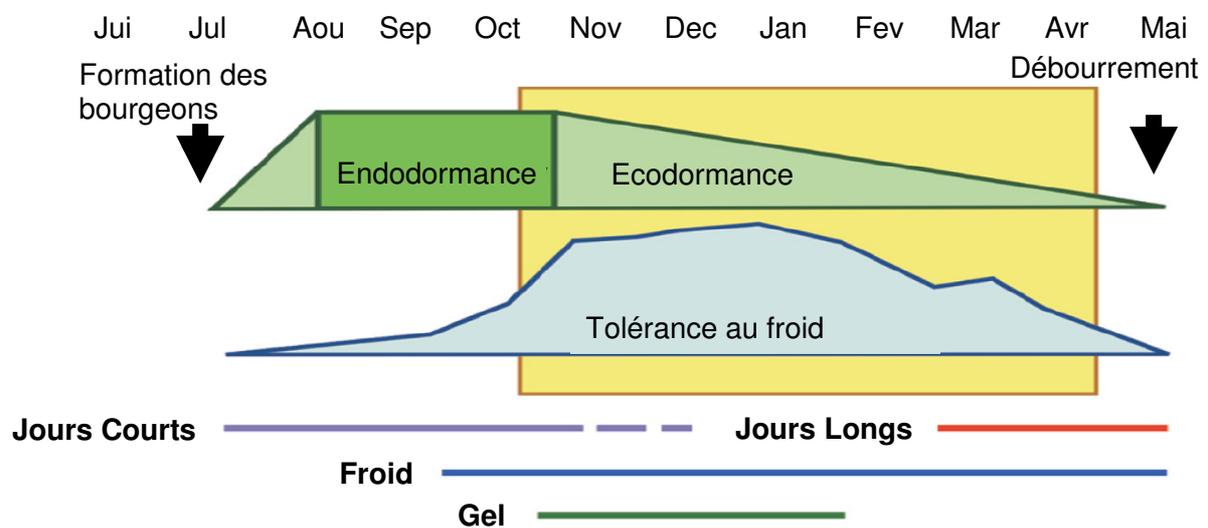


Figure 1.21. Evolution de l'état de dormance des bourgeons et de tolérance au gel lors de l'année avec les signaux environnementaux moteurs lors de chaque étape (d'après Welling & Palva, 2006).

L'ensemble de ces phénomènes sont relativement synchrones (Figure 1.21) mais certaines études ont montré une dyschronie. En effet, *Acer negundo* ou *Viburnum plicatum tomentosum* en conditions de jours longs et de températures nocturnes froides montrent un arrêt de croissance et un développement de l'acclimatation au froid, mais placés à nouveau en conditions de températures douces, le débourrement a lieu sans période de dormance (Mac Irving & Lanphear, 1967). Une étude plus récente a montré la distinction entre les voies d'acclimatation au froid et d'induction de la dormance ; la première serait dépendante de plusieurs facteurs : exposition à une faible photopériode, à de basses températures nocturnes et à une diminution en acide gibbérélique, alors que la seconde ne nécessiterait qu'une diminution de la photopériode (Welling *et al.*, 2002 ; Mølmann *et al.*, 2005).

Dans la plupart des études, la résistance au gel et la dormance sont étudiées indépendamment ; mais ces deux processus interviennent tous deux dans la résistance au gel ;

l'un constituant un mécanisme de résistance aux contraintes engendrées par le gel, l'autre étant un mécanisme d'évitement de ce stress au niveau d'organes particuliers permettant un développement végétatif lors de la saison de croissance suivante. La mise en place de ces différents mécanismes va être donc détaillée chronologiquement, en fonction des signaux déclencheurs, et de la modification engendrée au niveau physiologique.

5.1. Phénologie

La phénologie est l'étude de l'apparition d'évènements biologiques cycliques en relation avec les variations saisonnières du climat (Schwartz, 2003). Chez les végétaux pérennes, on distingue une phase active durant l'été, d'une phase inactive (du point de vue macroscopique) en hiver. Ainsi, à la fin de l'été, la croissance s'arrête, les feuilles tombent (chez les arbres à feuilles caduques) et les bourgeons deviennent incapables de croissance. Puis au printemps, les bourgeons redeviennent capables de croître et déploient un nouvel appareil végétatif (rameaux, feuilles) et/ reproducteur (fleurs). L'évolution de ce cycle annuel de développement est dépendant des conditions environnementales.

5.1.1. Arrêt de croissance et sénescence foliaire

A l'approche de la saison défavorable, les arbres vont progressivement diminuer leurs capacités de croissance et mettre en place les mécanismes leur conférant une plus grande résistance, *i.e.* évitement de l'exposition des organes sensibles au gel. Un arrêt de la croissance, une sénescence foliaire et une entrée en dormance des bourgeons sont donc observés à l'approche de l'hiver. L'arrêt de croissance et d'élongation des rameaux est un pré-requis à l'entrée en dormance et à l'endurcissement chez la majorité des espèces ligneuses (Ruttink *et al.*, 2007).

Après l'arrêt de croissance, les feuilles vont entrer en sénescence. Le démarrage du processus de sénescence foliaire est sous le contrôle de facteurs environnementaux qui ne sont à l'heure actuelle pas encore totalement éclaircis, et probablement différents entre espèces. Quatre hypothèses ressortent :

- retard et ralentissement par des températures chaudes automnales (Heide, 2003 ; Matsumoto *et al.*, 2003 ; Shutova *et al.*, 2006) ;
- (ii) accélération, au contraire, par des températures chaudes automnales (Kramer, 1995) ;

- (iii) déclenchement par une photopériode seuil (Lee *et al.*, 2003 ; Keskitalo *et al.*, 2005) ;
- (iv) déclenchement par des températures froides, une baisse du rayonnement avec ou sans effet seuil (Koike, 1990 ; White *et al.*, 1997 ; Jolly *et al.*, 2005 ; Migliavacca *et al.*, 2008 ; Delpierre *et al.*, 2009).

De plus, la vitesse de déroulement de la sénescence serait essentiellement sous l'influence de la température mais aussi de stress abiotiques tels que sécheresse, déficience en lumière ou nutriments (Lim *et al.*, 2007).

Ce mécanisme permet d'éviter à ces organes l'impact des premiers gels et de remobiliser l'ensemble des nutriments foliaires (Lüttge & Hertel, 2009). Au cours de la sénescence foliaire, un processus séquentiel se met en place au cours duquel les nutriments contenus dans la feuille vont être transportés au sein des structures pérennes. Le métabolisme emprunte la voie catabolique par l'expression d'hydrolases (protéases, lipases, nucléases ; Bhalerao *et al.*, 2003 ; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003 ; Andersson *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2004) et dégrade les macromolécules : protéines, lipides, ARN et amidon en molécules plus facilement transportables vers l'appareil racinaire via le cambium puis les branches et le tronc. (Lim *et al.*, 2007). Par l'intermédiaire du phloème, 80% de l'azote et du phosphore foliaire sont exportés ainsi que 90% du contenu en sucres sous forme de glucose, fructose et saccharose (Keskitalo *et al.*, 2005). Tous les organites sont dégradés en commençant par les chloroplastes qui contiennent 70% du contenu protéique foliaire (Noodèn, 1988 ; Thomson & Plat-Aloia, 1987). Les chlorophylles dégradées, le couvert végétal prend ses couleurs d'automne jaune, orange ou rouge selon l'espèce. Puis, le noyau et les mitochondries sont parmi les dernières structures dégradées, lorsque les cellules entrent en phase finale de l'apoptose (mort cellulaire programmée). A l'échelle macroscopique, la sénescence démarre de la pointe de la feuille pour remonter jusqu'au pétiole (Lim *et al.*, 2007). Sur ce dernier, au niveau de la zone d'abscission, des cellulases et des pectinases hydrolysent la paroi cellulaire permettant à la feuille de tomber, éventuellement selon l'espèce, et d'intégrer la litière (Perry, 1971 ; Roberts *et al.*, 2002).

5.1.2. Entrée en dormance des bourgeons

La dormance est, d'après Lang et al (1987), une suspension temporaire de la croissance visible de toute structure végétale comportant un méristème (cambium et bourgeons). Cette suspension est effective même lorsque les bourgeons sont en situation

environnementale favorable, leur croissance ne reprendra que si cette dormance est levée. En effet, les cellules méristématiques (bourgeons et zone cambiale) ont leur cycle cellulaire bloqué en phase G1 (Larcher, 1995 ; Shimizu & Mori, 1998 ; Gutierrez *et al.*, 2002).

On distingue, selon le facteur à l'origine de cette suspension de croissance : la paradormance (induite par d'autres organes situés sur le même individu, inhibition de la croissance des bourgeons tant que des feuilles sont en place), l'endodormance (origine intrinsèque au bourgeon, levée par une exposition à des températures froides, ou divers agents chimiques exogènes) et l'écodormance (phase de croissance limitée par les conditions environnementales, essentiellement la température).

Le signal d'entrée en dormance, et également d'initiation de l'endurcissement, semble davantage régi par la photopériode que par la température (Moshkov, 1935 ; Bogdanov, 1935). Par exemple, un délai d'exposition en dessous d'une photopériode critique a été identifié chez *Betulus pubescens* : trois semaines à une photopériode de 12h par jour (Welling *et al.*, 1997). Mais ce signal photopériode peut être shunté en conditions particulières, telles que des températures nocturnes élevées (Wareing, 1954), une humidité du sol et une quantité de nutriments importantes (Rudolph, 1964 ; Büsgen & Münsch, 1931). Par ailleurs, *Spirodela polyrhiza*, en condition de carence azotée, peut entrer en dormance si la photopériode passe en dessous de 20h (Perry, 1968) ; alors que des arbres fertilisés en azote peuvent continuer leur croissance et, ceci, même jusqu'à être tués par le gel (Levitt 1956 ; Vasil-yev, 1961). Ainsi, l'initiation de la dormance pourrait être la résultante de ces différents facteurs (photopériode courte, sécheresse relative, carence en nutriments, températures nocturnes élevées) à la fin de l'été (Perry, 1971).

5.1.3. Levée de dormance

L'endodormance peut être considérée comme un mécanisme de sécurité inhibant la reprise de croissance des bourgeons avant que la saison défavorable ne soit terminée. C'est pourquoi, elle n'est levée qu'après exposition à des températures froide (Weinberger, 1950) : 3 à 4 semaines à 5°C (Vegis 1973). Ces températures peuvent même être négatives (-5 à -10°C) (Hasegawa & Tsuboi, 1960). Il a également été montré qu'une application de phytohormones permet également de la lever, méthode couramment utilisée dans les régions à hiver doux (Wareing & Phillips, 1978).

De nombreuses hypothèses sur les mécanismes d'établissement et de levée de l'endodormance ont été émises. Certains auteurs ont évoqué l'interaction entre effets inhibiteurs et promoteurs de croissance (Saure, 1985), expliquant le fait qu'une application de

phytohormones stimulatrices de croissance (cytokinines, gibbérellines, auxines) permet de lever cette endodormance (Crabbé, 1994). D'autres études ont évoqué une compétition trophique entre le bourgeon et les tissus sous-jacents (Champagnat, 1989). Un effet hydrique a également été évoqué, les bourgeons dormants ne contenant que très peu d'eau libre (Faust *et al.*, 1991) et la continuité hydraulique entre tissus sous-jacents et bourgeons étant interrompue. Mais cette relation semble plus en rapport avec la résistance au gel qu'avec la suspension de capacité de croissance (Erez *et al.*, 1998 ; Parmentier *et al.*, 1998).

Les cellules méristématiques sont organisées en réseau complexe au sein duquel la communication s'effectue via les plasmodesmes comprenant notamment un *reticulum* endoplasmique partagé (van der Schoot, 1996). Lors de la phase d'endodormance, ces plasmodesmes sont obturés par des dépôts de callose (polymères de 1,3 β D glucane ; Rinne *et al.*, 2001). Suite à une exposition au froid, il y a une migration d'oléosines sur lesquels sont adsorbées des β -glucanases qui, en hydrolysant les dépôts de callose, permettent de restaurer la connexion symplasmique (Rinne & van der Schoot, 2003).

La dormance étant caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire des cellules méristématiques, l'étude des protéines régulatrices de ce cycle cellulaire a montré que les niveaux de transcrits des histones (H2A, H4), des MAP et cdc2 kinases, de la cycline B étaient très faibles dans les bourgeons dormants et augmentaient lors de la levée de dormance (Devitt & Stafstrom, 1995). Les variations des profils d'expression entre phase dormante et active pourraient être dues à des modifications dans le degré de méthylation de la chromatine des cellules du méristème, mécanisme clé dans l'expression des gènes chez les eucaryotes (Law & Suttle, 2003).

Dans une étude sur *Euphorbia esula* (Anderson et al, 2005), l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique selon l'état de dormance montre une expression supérieure des enzymes impliquées dans la synthèse d'amidon en phase de paradormance (ADP Glucose Pyrophosphorylase, Hexose Kinase et Sucrose Synthase). Par ailleurs, on retrouve, en phase d'endodormance et d'écodormance, une expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de saccharose (Sucrose Phosphate Synthase et UDP Glucose Pyrophosphorylase). On observe également une expression des enzymes impliquées dans la glycolyse (Wang *et al.*, 1991) ou le métabolisme antioxydant (Wang & Faust, 1994).

Lors de l'exposition au froid, la concentration en acide linoléique (C 18:2) dans la membrane plasmique augmente (Wang & Faust, 1990 ; Erez *et al.*, 1997). Cet acide gras est formé à partir d'acide oléique (C18:1) par une désaturase membranaire probablement activée

par le froid (Lyons, 1973). Le niveau d'acide linoléique passe de 20% des acides gras composant les phospholipides totaux à plus de 40% ; puis, en phase d'écodormance la quantité d'acide linoléique (C18:3) représente de 40 à 55% du contenu en acides gras formé par une autre désaturase membranaire active à températures plus élevées (Wang & Faust, 1990). Ces changements dans la composition membranaire des cellules des bourgeons pourraient être impliqués dans l'intégration du signal environnemental de levée d'endodormance (Erez *et al.*, 1997).

Certaines de ces hypothèses semblent reliées aux mécanismes d'acclimatation au froid, alors que certaines conditions artificielles ont montré un découplage entre les deux phénomènes. Néanmoins, la part explicative et la part strictement corrélative de chacune de ces observations reste encore obscure, notamment en terme de relation avec l'acclimatation au gel.

Une fois l'endodormance levée, le seul facteur limitant la croissance des bourgeons est l'occurrence de basses températures. Il s'agit de la phase d'écodormance : contrôlée par les conditions environnementales (Lang *et al.*, 1987). Durant cette période, les cellules méristématiques au sein des bourgeons sont en phase de croissance cellulaire intense. Puis, une fois les nouveaux tissus formés, leur état d'hydratation augmente fortement, les nouvelles feuilles se gonflent jusqu'à écarter les écailles protectrices autour du bourgeon. C'est le débourrement, marquant le début de la saison de croissance. La photopériode pourrait, chez certaines espèces, exercer un effet sur la sortie de dormance et le développement ontogénique (Heide, 1993a, b ; Vitasse *et al.*, 2009).

5.2. Résistance au gel

L'acclimatation au froid est un processus impliquant de nombreux mécanismes dont la mise en place est progressive et, en règle générale, préalable aux contraintes (Pearce *et al.*, 1996). Il s'agit d'initier des mécanismes physiologiques de réponse au stress thermique en lui-même, ainsi qu'aux contraintes élastiques et plastiques, directes et indirectes générées par la congélation (Pearce, 2004). Pour leur mise en place, ces mécanismes nécessitent de l'énergie à une période où l'acquisition d'énergie par la photosynthèse devient faible (espèces à feuillage persistant) ou quasi nulle (espèces à feuillage caduque). Il est donc nécessaire que les arbres utilisent les réserves assimilées durant la période estivale.

L'ensemble des mécanismes détaillés précédemment permet aux cellules de résister aux contraintes engendrées par le gel. Il est généralement considéré que l'endurcissement se déroule en deux phases, une précoce et une plus tardive. La phase précoce peut être très

rapide, 1 à 2 jours (Larcher, 1981) et est induite par la diminution de la photopériode permettant l'expression des enzymes nécessaires au métabolisme se déroulant lors de la phase tardive (Sakai & Larcher, 1987). La phase tardive de l'endurcissement est induite par des températures gélives dont l'efficacité est dépendante de l'espèce, du tissu et du stade de développement et aboutit à un état de résistance maximale (Sakai & Larcher, 1987).

5.2.1. Initiation de l'endurcissement

5.2.1.1. Stimuli déclencheurs

L'initiation de l'endurcissement est un processus faisant intervenir à la fois la diminution de la photopériode et la baisse des températures (Aronsson, 1975, Christersson, 1978). Il a été maintes fois démontré que la diminution de la photopériode initie le processus d'acclimatation au froid (Tumanov *et al.*, 1965 ; 1972 ; 1973 ; Mac Irving & Lanphear, 1967 ; Weiser, 1970 ; Williams *et al.*, 1972 ; Bervaes *et al.*, 1978 ; Kandler *et al.*, 1979 ; Smits-Spinks *et al.*, 1985 ; Tremblay & Lalonde, 1987). Ce signal induit par des jours courts permet un endurcissement même en conditions de températures douces (15°C) chez *Rhododendron ferrugineum* et *Pinus cembra* (Schwarz, 1970), *Prunus persica* (Buchanan, 1974), *Populus sp* (Sakai & Yoshida, 1968). Par contre, les racines ne déclenchent leur endurcissement que lorsque la température du sol diminue, et ce, indépendamment de la photopériode chez *Pinus sylvestris* (Ryypö *et al.*, 1998), *Potentilla fruticosa* (Johnson & Havis, 1977) ou de *Rubus chamaemorus* (Kaurin *et al.*, 1982) car, très probablement, ces organes ne perçoivent pas le signal de diminution de la photopériode. Chez *Pinus radiata*, une photopériode inférieure à 11h est nécessaire pour déclencher un endurcissement qui s'effectue (dans des proportions plus faibles) malgré des températures restant élevées (Greer & Warrington, 1982). Mais, en conditions de jours longs, l'endurcissement peut être retardé (Kramer, 1937) parvenant tout de même à atteindre le même niveau de résistance en plein hiver (Sakai & Larcher, 1987).

Un effet activateur du rouge lointain et inhibiteur du rouge sur l'initiation de l'endurcissement suggèrent une implication des phytochromes (McKenzie *et al.*, 1974, Beck *et al.*, 2004). Par exemple, une surexpression du gène *phyA* chez le peuplier hybride réduit fortement la photopériode critique nécessaire à l'initiation de l'endurcissement (6h vs 15h chez le génotype sauvage ; Olsen *et al.*, 1997). De plus, des plantes annuelles soumises à des températures froides sont incapables de s'endurcir en absence de lumière (Tumanov, 1931 ; Dexter, 1933 ; Pfeiffer, 1933 ; Constantinescu, 1933 ; Anderson, 1944) et une intensité lumineuse minimale de 10000 Lux semble nécessaire pour les graines et les jeunes conifères (McGuire & Flint, 1962 ; Scheumann & Börtitz, 1965). Mais, les plantes ayant de forts

niveaux de réserves semblent pouvoir s'endurcir dans le noir, l'effet principal de la lumière s'exercerait, donc, à travers le maintien de l'activité photosynthétique, du moins chez les plantes actives en période hivernale (Dexter, 1933).

L'effet de températures basses sur l'augmentation de la résistance au gel a été démontré depuis longtemps (Haberlandt, 1875 ; Schaffnit, 1910 ; Irmischer, 1912 ; Chandler, 1913 ; Gassner & Grimme, 1913). Le seuil de température efficace pour déclencher l'endurcissement est variable selon les espèces mais généralement inférieur à 5-10°C (Harvey, 1922 ; Greer *et al.*, 2000). Sakai (1966c) le montre chez *Salix sp* et *Populus sp* et met en relation l'acquisition d'une résistance au froid avec la dégradation des réserves en amidon et la formation de sucres solubles. Il est communément admis que plus la température est basse, plus la vitesse d'endurcissement est rapide (Dantuma & Andrews, 1960 ; Pogosyan & Sakai, 1969). Par ailleurs, une exposition au gel permet d'augmenter le niveau de résistance (Pearce *et al.*, 1996). L'effet des basses températures est d'autant plus important que l'état de résistance est faible (Luoranen *et al.*, 2004), et ce, par l'intermédiaire d'une relation non linéaire (Greer *et al.*, 2000) et dépendante du stade phénologique (Tumanov, 1969).

Durant l'hiver, le degré auquel l'endurcissement peut être influencé par la température est fortement dépendant de l'état de dormance (Pisek & Schiessl, 1947 ; Scheumann & Schönbach, 1968 ; Howell & Weiser, 1970 ; Tumanov *et al.*, 1973 ; Fuchigami *et al.*, 1982). Il peut même être établi des corrélations entre niveau de résistance des bourgeons de pêcher ou de cerisier et températures des 2 jours précédents (Proebsting, 1963 ; Andrews & Proebsting, 1985) ou branches de noyer et moyenne des températures minimales des 15 jours précédents (Poirier *et al.*, 2010). Néanmoins, à l'échelle intraspécifique, l'état maximal de résistance n'est pas dépendant de la température d'exposition parmi trois espèces du genre *Quercus* (Morin *et al.*, 2007) et chez *Pseudotsuga menziesii* (Aitken *et al.*, 1996).

Lumière et température peuvent agir indépendamment (Welling *et al.*, 2002), mais en conditions naturelles, température et photopériode ont des dynamiques parallèles car le rayonnement lumineux exerce un effet sur la dynamique des températures. Ainsi, leurs effets semblent synergiques, la température jouant un effet sur l'endurcissement préférentiellement en conditions de jours courts (Aronsson, 1975, Christersson, 1978, Jonsson *et al.*, 1981, Ericsson, 1984). La détermination de l'influence intrinsèque de chacun de ces paramètres est complexe car leurs effets interagissent au niveau de la croissance, de la dormance et de l'endurcissement (Heide, 1974 ; Johnsen *et al.*, 2005a, b).

5.2.1.2. Modifications induites

De forts niveaux de synthèse d'ARN et de protéines sont observés en automne, après la sénescence, chez le robinier (Siminovitch *et al.*, 1968), l'osier (Li & Weiser, 1969), le cyprès (Harms & Sauter, 1992) ou le saule (Sauter & Wellekamp, 1998). Le processus d'acclimatation engendre des modifications énormes dans les profils d'expression ; 25% du transcriptome est régulée par les basses températures (Kreps *et al.*, 2002) impliquant la surexpression de nombreuses familles de gènes et de nombreux gènes au sein de ces familles (Pearce, 1999). Guy *et al.* (1985) en ont dénombrées 51 familles dont de nombreux facteurs de transcription. Leur expression est séquentielle au cours du cycle phénologique (Druart *et al.* 2007). Les expressions différentielles observées permettent d'expliquer la réponse physiologique des arbres en leur permettant de s'endurcir préalablement à la baisse des températures. Welling *et al.*, (2002) montrent que l'expression précoce est une réponse à la photopériode induisant l'arrêt de croissance, entrée en endodormance, ainsi qu'une déshydratation et une accumulation des réserves en amidon.

Lors de l'acclimatation, on observe soit un ajustement dans l'expression de gènes constitutivement exprimés (notamment pour adapter le niveau du métabolisme primaire aux contraintes environnementales), ou l'induction de gènes spécifiques à la résistance au gel (par exemple pour l'accumulation de solutés ou le maintien de la fluidité membranaire ; Pearce, 2004). Des études sur l'évolution du métabolome au cours de la phase d'acclimatation montrent quatre types de régulation entre les niveaux d'abondance des transcrits et des métabolites induits par des interactions différentes (Kaplan *et al.*, 2004, 2007 ; Guy *et al.*, 2008) :

- Augmentation des transcrits impliqués dans certaines voies (biosynthèse du raffinose, de l'acide gamma amino butyrique GABA) précédant une augmentation du niveau de métabolites.
- Augmentation des métabolites précédant l'augmentation des transcrits (glycine, alanine, thréonine, leucine, saccharose, et acide citrique).
- Diminution du niveau des transcrits alors que les métabolites augmentent (lysine, méthionine, tryptophane, tyrosine, arginine, cystéine, polyamine, phénylpropanoïde)
- Niveau d'expression constant mais augmentation considérable en métabolites.

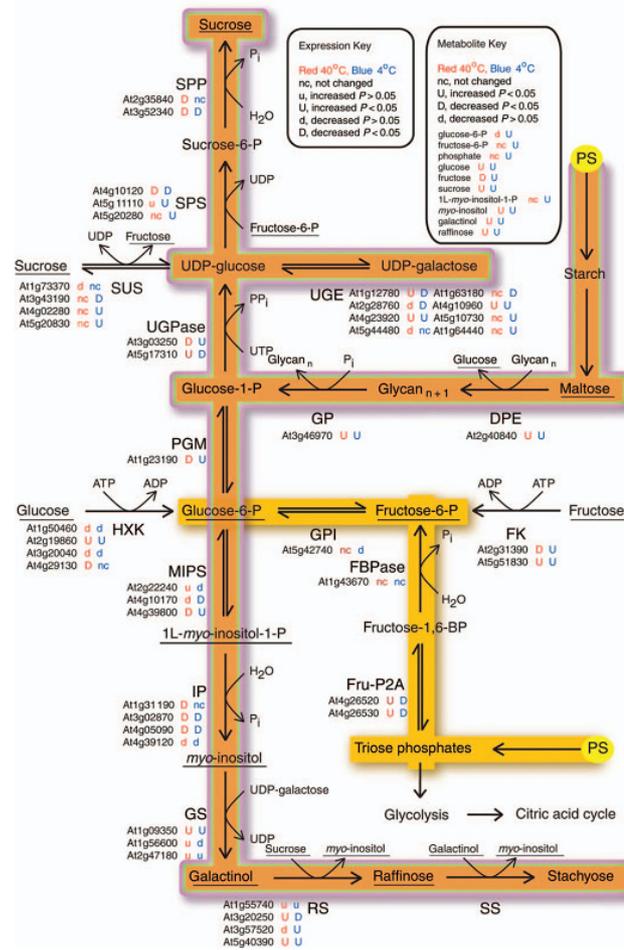


Figure 1.22. Voie Métabolique de dégradation de l’amidon en saccharose et polyols avec l’effet des températures chaudes (en rouge) ou froides (en bleu) sur l’expression de chacune des enzymes impliquée (U Activation, D inhibition) (d’après Guy et al., 2008).

Au cours de la phase tardive de l’endurcissement, on observe une réponse aux températures basses au cours de laquelle les réserves en amidon sont dégradées en sucres solubles, la résistance au gel s’amplifie et une synthèse de déhydrine a également lieu (Rinne *et al.*, 1999 ; Welling *et al.*, 2002). L’expression des gènes tardifs est sous le contrôle soit de l’acide abscissique, soit de la température (ou les deux en interaction). Ces protéines exprimées sont impliquées dans l’hydrolyse des réserves amylacées en sucres solubles, composés cryoprotectants et/ou substrat pour la synthèse d’autres composés nécessaires au processus d’acclimatation.

Diverses voies métaboliques sont identifiées par l’analyse des EST chez *Rhododendron sp.*, lors de l’endurcissement, et notamment, une augmentation de l’expression d’enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des acides gras (acylCoA synthétase, choline phosphatase cytidyltransférèse), ou de désaturation des acides gras (delta 12 fatty acid desaturase) à partir du malate (NADP malic enzyme) (Wei *et al.*, 2006). Ceci permet le

maintien d'une fluidité membranaire (Côme *et al.*, 1992). Ces auteurs retrouvent également une inhibition de la synthèse de l'aquaporine PIP 2-1 et l'activation d'un canal potassique permettraient de limiter la déshydratation cellulaire ainsi que l'activation de la coumarate 3 hydroxylase qui pourrait être associée avec l'épaississement de la paroi (Wei *et al.*, 2006). La tolérance à la déshydratation semble également nécessaire. Ainsi, la synthèse de déhydrines et chaperonines permet de diminuer les contraintes osmotiques engendrées par les potentiels osmotiques extra et intracellulaires (Welling & Palva, 2006, Griffith *et al.*, 1997).

Le métabolisme des sucres fait l'objet de profonds remaniements lors de l'endurcissement. L'augmentation de la concentration en enzymes impliquées dans l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire via le métabolisme glucidique a fait l'objet de nombreux articles (α -amylase, β -amylase, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase) (Witt & Sauter, 1994a, Schrader & Sauter, 2002) (Figure 1.22). L'activité α -amylase et amidon phosphorylase (2 enzymes impliquées dans l'interconversion amidon-sucres) montrent une forte corrélation avec la diminution de la température (Elle & Sauter, 2000). Cette augmentation de l'activité est due, au moins en partie, à la synthèse de nouvelles protéines sous le contrôle de l'acide abscissique. La diminution des températures permet également à certaines amylases d'être liées aux granules d'amidon et ainsi d'optimiser leur rencontre avec leur substrat (Witt *et al.*, 1995, Witt & Sauter, 1995, Sauter *et al.*, 1998). La β amylase est également induite par des basses et des fortes températures (Kaplan & Guy, 2004). On la retrouve dans les chloroplastes mais également dans le cytosol et la vacuole où

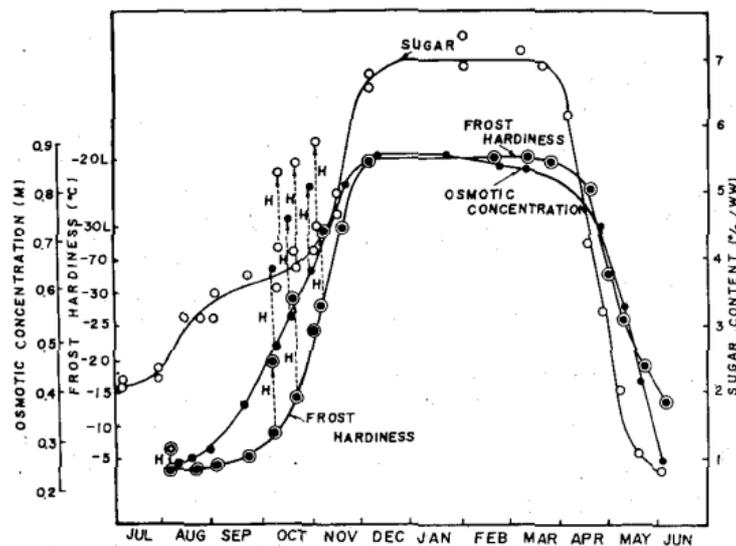


Figure 1.23. Résistance au gel et contenu en sucres chez *Robinia pseudoacacia*, les sucres sont représentés en teneur (cercles blancs) ou en équivalent osmotique (cercles noirs) d'après Yoshida & Sakai, 1968.

elle pourrait hydrolyser les glycanes (Kaplan *et al.*, 2006). La starch related alpha glucan water dikinase (EC 2.7.9.4) induit une plus grande tolérance au gel, en permettant une accessibilité plus grande de l'amidon par les amylases (Yano *et al.*, 2005).

Ainsi, les réserves en amidon sont presque intégralement hydrolysées en sucres solubles au cours de l'endurcissement (Siminovitch *et al.*, 1953, Witt & Sauter, 1994b ; Sauter, 1988 ; Sakai, 1966c ; Wong *et al.*, 2003 ; Kasuga *et al.*, 2007). Généralement, saccharose, raffinose et stachyose augmentent fortement lors de l'endurcissement alors que les quantités de glucose et de fructose évoluent peu (Parker, 1959 ; Sauter & van Cleve, 1991 ; Imanishi *et al.*, 1998) (Figure 1.23). Toutefois, selon l'espèce considérée, différents sucres augmentent en relation avec les métabolismes spécifiques (Sakai, 1962) : Sorbitol chez le sorbier ou le pommier (Raese *et al.*, 1978), Glucose, fructose et saccharose chez le noyer (Poirier, 2010), Raffinose chez *Arabidopsis* (Guy *et al.*, 2008 ; Kaplan *et al.*, 2004). L'augmentation du contenu en sucres observée à l'automne est parallèle avec l'hydrolyse de l'amidon précédemment accumulé (Sakai, 1962 ; 1966c ; Reuther, 1971, Harms & Sauter, 1992 ; Sauter & Wellekamp, 1998). La quantité de maltose évolue en relation avec la température et constitue un intermédiaire dans la synthèse et la dégradation de l'amidon en automne (Sauter & van Cleve, 1994), il semble exercer un rôle d'inhibiteur de l'endoamylase (Witt *et al.*, 1995). Le maltose semble également exercer un effet protecteur des membranes, des protéines ainsi que de la chaîne de transport d'électrons dans la membrane des thylakoides (Kaplan & Guy, 2004).

L'hydrolyse de l'amidon et l'augmentation concomitante du saccharose, du stachyose et du raffinose, mais pas du glucose et du fructose, s'exerce à des températures <10°C chez le peuplier (Sauter, 1988). L'augmentation du raffinose semble fortement liée à la température durant l'acclimatation chez le peuplier (Cox & Stushnoff, 2001). Toutefois, des observations faites par Sakai (1966c), sur *Salix sp.*, montrent une diminution des quantités d'amidon à température basses (<10°C) mais également à des températures supérieures (>15°C), alors qu'entre ces températures il y a re-synthèse d'amidon.

Une plus faible température du sol exerce un effet positif sur l'accumulation d'amidon pendant la phase de croissance en limitant l'activité puits (consommation de métabolites, d'énergie) des racines et des rameaux et permettant une plus grande résistance au froid durant l'hiver (Repo *et al.*, 2004). Cette diminution de l'activité racinaire permet également une déshydratation par diminution de la fluidité membranaire et par l'intermédiaire d'aquaporines (Lee *et al.*, 2005b). Ainsi, on observe une diminution du diamètre des rameaux (Turcotte *et al.*, 2009), une déshydratation poussée des parties aériennes (Pavel & Fereres, 1998 ; Ewers *et*

al., 2001) pouvant être reliée à la résistance au gel (Améglio *et al.*, 2001). Le contenu en eau diminue fortement lors du début de la phase d'acclimatation puis se stabilise au cours de l'hiver (Luoranen *et al.*, 2004). Cette diminution du contenu en eau augmente la concentration du cytoplasme, et diminue l'état d'hydratation du protoplasme et de la paroi (Chen & Li, 1977, Anisko & Lindstrom, 1996). Un plus faible état d'hydratation diminue également la consommation par respiration des sucres solubles cryoprotecteurs (Ögren, 1996). Ainsi, une sécheresse peut augmenter la résistance au gel de quelques degrés (Chen *et al.*, 1977 ; Yelenosky, 1979 ; Anisko & Lindstrom, 1996).

5.2.2. Désendurcissement

La phase de désendurcissement est déclenchée par la remontée des températures, alors que la photopériode ne semble y exercer quasi aucune influence (Leinonen *et al.*, 1997). L'exposition à des températures chaudes permet une augmentation de la sensibilité au gel en deux semaines (Göppert, 1830) voir même en quelques heures (Pisek, 1950). Généralement, le désendurcissement se déroule plus rapidement (en jours ou semaines) que l'endurcissement (en semaines ou mois ; Kalberer *et al.*, 2006). Puis, une fois la croissance initiée une photopériode plus longue permet tout de même une désacclimatation plus rapide chez le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) et l'épicéa (*Picea abies*). Lors de la remontée des températures du sol au printemps, on observe chez *Picea mariana* une reprise de la réhydratation environ quarante jours avant la reprise de croissance permettant un désendurcissement complet (Turcotte *et al.*, 2009).

Les changements métaboliques expliquent facilement ce phénomène car l'endurcissement est un processus coûteux en énergie pour la plante nécessitant la synthèse de nombreux composés (Browse & Lange, 2004), alors que lors du désendurcissement, on observe essentiellement des diminutions des niveaux d'expressions génétiques et de biosynthèse, alimentées par le catabolisme des composés cryoprotectants (notamment les sucres, ou protéines).

Deux formes de désendurcissement ont été caractérisées chez les arbres (Kalberer *et al.*, 2006) :

- Un désendurcissement « actif », en réponse à une remontée des températures importante, se traduit par des changements structuraux et fonctionnels. Par exemple, lors d'évènements de réchauffement rapides, en hiver ou au printemps, un brusque désendurcissement peut être observé à cause d'une augmentation de l'état d'hydratation (Pogosyan & Sakai, 1969).

- Un désendurcissement « passif », lors de réchauffements modérés de la température ambiante ($\leq 5^{\circ}\text{C}$), est la conséquence de la consommation de composés carbonés cryoprotectants par une respiration accrue (Ögren, 1996). Lors d'une remontée modérée des températures, la perte en carbone devient supérieure aux gains, car la photosynthèse est plus sensible à la baisse de températures que l'activité mitochondriale (Ögren, 1996 ; Ögren, 1997). La respiration est aussi moins sensible à la déshydratation et aux cycles gel/dégel (Steffen *et al.*, 1989). La diminution des quantités de raffinose est fortement corrélée à l'état de résistance au gel et à la température lors de l'acclimatation, mais moins durant la désacclimatation (Cox & Stushnoff, 2001). Mais d'une manière générale, la quantité de sucres solubles intracellulaires diminue significativement, tout comme l'état de résistance au gel. Les plantes sont donc capables de se ré-endurcir très rapidement par rapport à la vitesse d'endurcissement initiale (2 jours vs 15 jours ; Chen & Li, 1980a ; 1980b).

Alors que les niveaux d'amidon sont très faibles durant l'hiver et les niveaux de sucres solubles très importants, une re-synthèse de l'amidon à partir des sucres solubles est observée au printemps juste avant le débourrement (Sauter & van Cleve, 1994). Les quantités de l'ensemble des enzymes impliquées dans les voies d'hydrolyse de l'amidon diminuent fortement avant ou juste après le débourrement (Witt & Sauter, 1994a, Schrader & Sauter, 2002 ; Wong *et al.*, 2003). Chez les arbres à feuilles caduques, ces réserves carbonées sont transformées en sucres solubles et transportées via le xylème pour assurer l'alimentation des bourgeons, puis des nouvelles branches au moment du débourrement (Sauter & Ambrosius, 1986). Environ un tiers des réserves est utilisé pour le déploiement des nouvelles feuilles qui vont par la suite contribuer à la reformation de réserves (Larcher 1995).

La diminution de la résistance au gel est également fortement liée à une augmentation brutale du contenu en eau dans les bourgeons (Graham & Mullin, 1976 ; Junttila *et al.*, 1983) et dans les branches (Pogosyan & Sakai, 1969). Les températures douces influencent le contenu en eau par l'intermédiaire de différents mécanismes : augmentation de l'évaporation mais aussi de l'absorption. Par exemple, au printemps, une réhydratation n'a lieu, pour le noyer, que lorsque la température du sol dépasse les 8°C (Améglio *et al.*, 2002) permettant aux racines de réhydrater les parties aériennes (Turcotte *et al.*, 2009). En revanche, si l'appareil racinaire a été fortement endommagé par le gel par un désendurcissement trop précoce, la capacité des racines à engendrer de la pression dans la sève brute xylémienne sera limitée (Zhu *et al.*, 2002).

5.2.3. Variabilité génétique

Différentes études ont montré la capacité de réponse différentes à l'échelle inter spécifique (*Hydrangea macrophylla* et *H. paniculata*) au niveau de la résistance au gel mais également du contenu en ABA ou en sucres (Pagter *et al.*, 2008). Différents écotypes de *Populus trichocarpa* provenant de latitudes ou d'altitudes élevées sont plus précoces en termes de débourrement ou d'arrêt de croissance que d'autres écotypes en plantations comparatives (Pauley & Perry, 1954). L'endurcissement débute également à partir d'une photopériode critique, et ce, d'autant plus rapidement et précocement que l'espèce est nordique chez le bouleau et le pin (Jonsson *et al.*, 1981 ; Li *et al.*, 2005). En effet, un arbre d'un écotype nordique sera plus sensible aux changements saisonniers, et, ainsi, montrera un arrêt de croissance, une acclimatation au froid et une entrée en dormance plus précoce, un endurcissement plus intense, un sortie de dormance plus rapide, en adaptation à une saison de croissance plus courte sous des latitudes élevées (Li *et al.*, 2003b). Et l'on observe en général une bonne corrélation entre résistance au gel et températures minimales observées durant l'hiver chez différents écotypes d'*A.thaliana* (Klotke *et al.*, 2004 ; Hannah *et al.*, 2006), de blé (Vágújfalvi *et al.*, 1999), mais pas chez les espèces pérennes lignifiées telles que *Pinus sylvestris* (Nilsson & Walfridsson, 1995), *Pinus albicaulis* (Bower & Aitken, 2006), *Fraxinus ornus* (Larcher & Mair, 1968) ou différentes espèces du genre *Quercus* (Morin *et al.*, 2007)

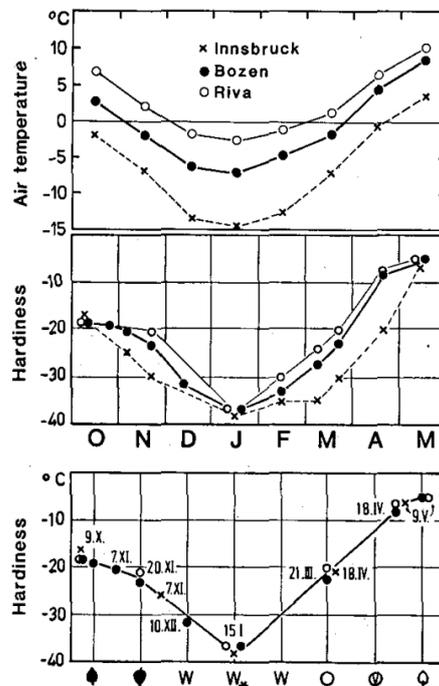


Figure 1.24. Températures observées et résistances au gel en fonction de la date calendaire ou du stade phénologique pour trois provenances extrêmes dans l'aire de répartition de *Fraxinus ornus* (d'après Larcher & Mair, 1968).

Il ressort de ces différentes études, que seules les phases intermédiaires entre état de résistance maximal et état d'extrême sensibilité semblent sujettes à des adaptations locales de populations (Figure 1.24).

6. Implications écologiques de la résistance au gel

L'aire de répartition d'une espèce végétale s'inscrit dans une niche climatique potentielle limitée par une marge chaude et une marge froide. Concernant la marge chaude, le stress hydrique est le facteur critique et donc des espèces ayant une consommation réduite en eau sont plus adaptées. Parmi les variables physiques exerçant une influence sur la marge froide, les basses températures en sont un des facteurs les plus importants (Parker, 1963 ; Sakai & Larcher, 1987). Elles contrôlent ainsi la composition et la production de milieux forestiers et horticulturaux (Ashworth, 1992). Environ deux tiers de la biomasse terrestre est soumis à des températures gélives au cours de l'année et la moitié à des températures inférieures à -20°C (Sakai & Larcher, 1987).

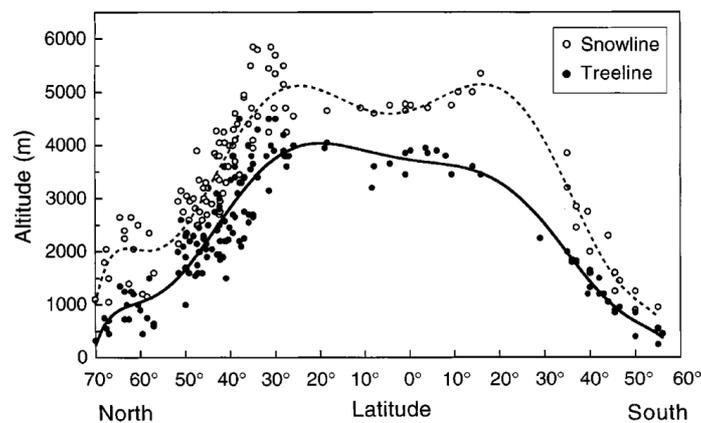


Figure 1.25. Evolution de la limite des neiges éternelles (« Snowline ») et la limite des arbres (« Treeline ») en fonction de la latitude (d'après Körner, 2003).

La résistance au gel est un trait physiologique qui s'exprime en présence d'une contrainte environnementale (Sakai & Larcher, 1987). On retrouve donc des variations très importantes entre espèces, entre populations ou le long de gradient de cette même contrainte (altitude, latitude). Le parallélisme observé entre limite des neiges éternelles et limite altitudinale des arbres selon la latitude en est un exemple convaincant (Körner, 2003) (Figure 1.25).

La survie d'une espèce dans des conditions climatiques données dépend à la fois de la capacité de résistance maximale, mais aussi de la synchronisation et de la vitesse de

l'acclimatation et de la désacclimatation en fonction des variations saisonnières de températures (Larcher, 1968 ; Fuchigami *et al.*, 1982).

Une espèce est considérée comme bien adaptée si, durant sa saison de croissance, elle minimise le risque de subir des dégâts du gel (Langlet, 1937 ; Larcher, 1995). En effet, on observe un « trade off » entre la minimisation des dégâts dus au gel et la maximisation de la fixation de carbone (Saxe *et al.*, 2001). Au sein des biomes, la pression de sélection par les températures basses a conduit à la formation de « races climatiques » ou écotypes dont les différences s'expriment essentiellement au niveau du seuil de réponse à la température pouvant se traduire sur la chronologie du cycle annuel de développement (Münch, 1923). Généralement les processus d'acclimatation au gel et la phénologie constituant différents aspects de la résistance au gel sont couplés (Larcher & Mair, 1968 ; Larcher 1968).

En milieu à contraste saisonnier marqué, les dommages du gel à l'automne peuvent avoir un impact sérieux sur la survie des arbres (Palonen & Buszard, 1997) ; alors qu'au printemps, l'impact porte majoritairement sur la capacité reproductive des bourgeons après débourrement (Rodrigo, 2000). En climat tempéré, les dégâts engendrés à la période printanière sont plus importants que ceux engendrés par les températures minimales en plein hiver (Byrne, 1986), et ceci essentiellement sur les bourgeons, fleurs et fruits bien que les rameaux puissent être parfois endommagés (Smeeton, 1964). Dans les conditions climatiques actuelles, la valeur adaptative des arbres est donc altérée davantage à travers leur capacité reproductive qu'au niveau de leur survie (Westwood, 1993).

Dans des conditions climatiques extrêmes, milieu boréal ou montagnard, la période critique s'avère paradoxalement être l'été. En effet, en hiver, les capacités de résistance sont, en général et au sein de la niche climatique potentielle, supérieures à l'intensité des gels subis, alors qu'en été, les plantes sont très sensibles, et le moindre évènement de gel peut engendrer des lésions importantes. De plus, en raison de faibles températures tout au long de l'année, la saison de croissance est fortement restreinte. Ainsi, il n'apparaît donc pas étonnant qu'à la limite altitudinale des arbres, une période de 100 jours avec des températures moyennes supérieures à 5°C soit observée (Brockmann-Jerosch, 1919 ; Ellenberg, 1963). La croissance et le développement des plantes sont maximaux au sein d'une plage de températures, sélectionnée par des processus adaptatifs (Levitt, 1980 ; Fitter & Hay, 1987) mais en deçà de 5°C, l'activité métabolique est quasi nulle.

Les plantes vivant dans des habitats où des évènements de gel peuvent survenir durant la période de croissance et d'activité métabolique importante peuvent éviter les lésions uniquement par évitement du gel. La dépression du point de fusion peut suffire à prévenir la

majorité des risques et permet le maintien d'un potentiel hydrique foliaire important (Goldstein & Meinzer, 1983 ; Beck, 1986) et la diffusion du CO₂ à températures négatives (Larcher, 1961 ; 1981 ; 1995) ce qui permet, par exemple, une assimilation du carbone dès le matin après un gel nocturne (Moser *et al.*, 1977).

La corrélation entre résistance au gel et aire de distribution a fait l'objet de nombreuses études. La capacité à la surfusion, par exemple, est un facteur déterminant pour les arbres à feuilles caduques natifs d'Amérique du nord qui sont limités aux zones où la température ne descend pas en dessous de -40°C en hiver (Burke *et al.*, 1976), de même que le poirier et le pommier (Quamme, 1976). Le maintien de la fluidité membranaire semble également important ; ainsi, les plantes des climats chauds possèdent au niveau membranaire une proportion plus importante d'acides gras saturés que celle des climats froids (Lyons, 1973). Par exemple, Raison *et al.* (1979) ont montré une forte corrélation entre la température à laquelle la membrane plasmique passe de l'état liquide-cristallin à celui de gel et la distribution géographique de plusieurs espèces. La température de formation d'un exotherme et l'altitude limite potentielle semblent étroitement liées (Kaku & Iwaya, 1979) (Figure 1.26).

Les basses températures peuvent également exercer une influence sur la niche d'une espèce par leur effet sur la conductivité du tissu xylémien. L'embolie hivernale peut limiter la croissance et la survie d'une espèce en marge froide (Sperry & Sullivan, 1992 ; Tyree & Cochard, 1996 ; Langan *et al.*, 1997 ; Pockman & Sperry, 1997). On observe le long d'un gradient altitudinal une diminution de la taille des vaisseaux et donc une diminution de la sensibilité à l'embolie.

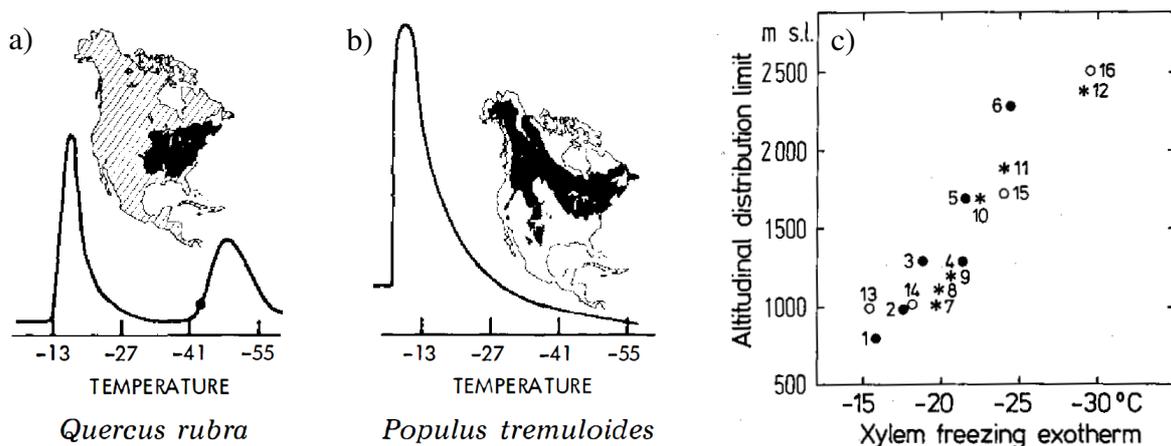


Figure 1.26. Relation entre température de formation d'un exotherme avec la distribution latitudinale chez *Quercus rubra* (a), *Populus tremuloides* (b) ou avec la limite altitudinale potentielle (d'après Burke *et al.*, 1976 et Kaku & Iwaya, 1979).

Les formes de vie rencontrées dans les milieux boréaux et alpins sont essentiellement des espèces buissonnantes à feuillage persistant, des herbacées pérennes, des mousses et des lichens. Ces espèces pérennes ont comme avantage de ne pas avoir à reformer un appareil photosynthétique complet chaque année (Billings & Mooney, 1968) car la productivité de ces biotopes est insuffisante pour permettre à la fois la production de bois et de feuilles tous les ans (Boysen-Jensen, 1932). Les buissons persistants ont une efficacité photosynthétique plus faible que les buissons à feuilles caduques (comme *Vaccinium uliginosum*), mais la vie plus longue de leur feuille permet de minimiser les coûts métaboliques (Hadley & Bliss, 1964). Également, les anciennes feuilles servent de réserves hivernales de composés lipidiques ou protéiques qui serviront de substrat à la mise en place de nouvelles feuilles. Le débourrement des espèces persistantes semble plus tardif que les caducifoliées, limitant les risques d'exposition aux gels printaniers (Billings & Mooney, 1968). La plupart de ces espèces ont une production de graine erratique mais compensent cela par une reproduction végétative (Billings & Mooney, 1968).

Globalement, les espèces stress tolérantes, ont des caractéristiques similaires quelque soit le type de stress : croissance lente, organes photosynthétiques sempervirents, longue durée de vie, séquestration du carbone, des nutriments, de l'eau, floraison erratique, et un métabolisme permettant une assimilation des ressources pendant les courtes périodes favorables (Grime, 1979). Les plantes stress tolérantes sont par contre particulièrement sensibles à la perturbation (attaque de phytophages) car leur croissance lente ne leur offre que peu de possibilité de résilience (Wittaker, 1975). Ces organismes n'ont en général que peu de plasticité morphogénétique ; leur période de croissance étant courte, la quantité de tissus capables de différenciation, donc d'une réponse morphogénétique, est réduite. La réponse environnementale est avant tout physiologique.

7. Modélisation de la biologie hivernale

Afin de prédire les risques de dommages dus au gel tant en milieu forestier qu'en verger ou parcs, modéliser l'évolution de la résistance des plantes pérennes et de leurs dates de débourrement a fait l'objet de différentes approches :

- des relations empiriques entre température d'exposition et, dans certains cas, photopériode et évolution de la résistance,
- des relations avec les modifications physiologiques inhérentes au processus d'acclimatation,

- l'influence du cycle de développement annuel.

Seuls certains modèles sont présentés ici essentiellement sur végétaux pérennes.

7.1. Cycle annuel de développement

En agronomie et production fruitière, la prédiction de différents évènements marquant le cycle annuel telles que dates de débourrement, floraison, véraison, maturation et sénescence fait partie des préoccupations importantes. Ainsi, la construction de modèle de prédiction de l'état de développement physiologique de l'arbre est un aspect sur lequel beaucoup de recherches ont été développées récemment, en lien avec les changements climatiques observés et les évolutions de la phénologie associée (ex. avancement des dates de débourrement en conditions agronomiques (Domergue *et al.*, 2004 ; Seguin *et al.*, 2004) et en milieux naturels (Walther *et al.*, 2002 ; Parmesan & Yohe, 2003).

Même si récemment l'équipe de Körner (Körner & Basler, 2010a) remet cette opinion, en cause, la température est le facteur majeur qui contrôle le développement des végétaux. Ainsi, depuis Réaumur (1735) et l'observation que la durée de la phase de maturation du blé est d'autant plus rapide que les températures sont chaudes, les sommes de températures accumulées (Ziegler, 1879) au-dessus d'un seuil d'action efficace (généralement aux alentours de 5 ou 7°C (Hoffman, 1887)) sont largement utilisées, même si à l'heure actuelle, l'établissement de lois d'action non linéaires en relation avec la physiologie se développent.

L'intensité de la dormance peut, par exemple, être quantifiée expérimentalement, par le temps nécessaire au débourrement complet de bourgeons placés à une température favorable pour la croissance (20-25°C) : le délai moyen de débourrement (DMD : Balandier *et al.*, 1993), ou à la quantité d'acide gibbérellique nécessaire à la croissance des bourgeons (Champagnat, 1992).

D'une manière générale, on considère que les températures froides ont une action positive sur la levée de l'endodormance, permettant d'intégrer « le signal » au niveau du bourgeon, que la période rigoureuse de l'hiver s'est déroulée, tandis que la levée d'écodormance, correspondant à des mécanismes d'allongement et d'hydratation cellulaire, s'effectue d'autant plus rapidement que les températures sont chaudes.

Différents concepts d'impact des températures ont ainsi émergés, avec de nombreuses propositions de lois d'action. En effet, on peut considérer que l'action des températures peut s'établir soit de manière séquentielle (accumulation de températures froides jusqu'à la levée d'endodormance puis de températures chaudes jusqu'à la levée d'écodormance) ou parallèle (accumulation simultanée des températures nécessaires pour les deux types d'action, froide et

chaude). Dans le cas d'une accumulation séquentielle, elle peut être réversible (des températures chaudes permettant d'annuler tout ou partie de l'action froide préalable) ou irréversible (Kramer, 1994).

7.1.1. Modélisation de l'Endodormance

Suite à l'implantation d'espèces fruitières hors de leurs zones naturelles de répartition (dans des zones à hivers doux : Maghreb, Israël, Brésil), les bourgeons de ces arbres se sont montrés incapables de débourrer par manque de froid hivernal inhibant ainsi la sortie de l'état dormant. A l'opposé, la date de débourrement est d'autant plus précoce que le froid auquel ont été exposés les bourgeons est important durant l'automne et l'hiver (Landsberg, 1974 ; Cannell & Smith, 1983). Or, le phénomène d'endodormance est un phénomène non visible à l'échelle macroscopique par des méthodes non destructives. Il faut, donc, observer le débourrement qui constitue la somme des phases d'endo et d'écodormance.

Différentes lois d'action du froid sur la levée d'endodormance ont été élaborées (Figure 1.27). Pour Weinberger (1967), il s'agit d'une action en tout ou rien : 1 CU (« Chilling Units » ou Unité de froid) pour les températures inférieures à 7,22°C et 0 CU au dessus de cette température. La relation entre température et accumulation peut également être définie comme non-linéaire, Bidabé (1967) utilise une loi exponentielle chez *Malus sp*, alors que Landsberg (1974), chez la même espèce utilise une loi inversement proportionnelle à la température pour des températures supérieures à 5°C. En dessous de certaines températures, le froid semble ne plus exercer d'effet sur la levée d'endodormance. On retrouve ainsi, des lois d'actions de forme gaussienne avec un maximum aux alentours de 3,5°C (Sarvas, 1974 chez *Betula pendula* et de multiples arbres forestiers) ou une juxtaposition de fonctions affines autour de la même valeur optimale (Hänninen, 1990 chez *Pinus sylvestris* essentiellement et quelques autres espèces).

D'autres expérimentations ont mis en évidence que l'exposition à des températures chaudes (de l'ordre de 21°C) après une exposition au froid (6°C) annulait totalement l'action froide précédente. Ainsi pour Richardson *et al.* (1974) dans le modèle « Utah » pour *Prunus sp*, l'accumulation de froid est réversible et fait intervenir des actions négatives des températures chaudes (supérieures à 15°C). A partir de ces mêmes données, Erez et Couvillon (1987) ont formulé des hypothèses, conceptuellement très différentes dans leur modèle dynamique, modèle prenant en compte deux réactions dans l'assimilation de l'action froide. La première réaction, réversible, aboutit à la formation d'un composé intermédiaire qui peut si les températures restent relativement basses former un composé final (du type hormonal) qui

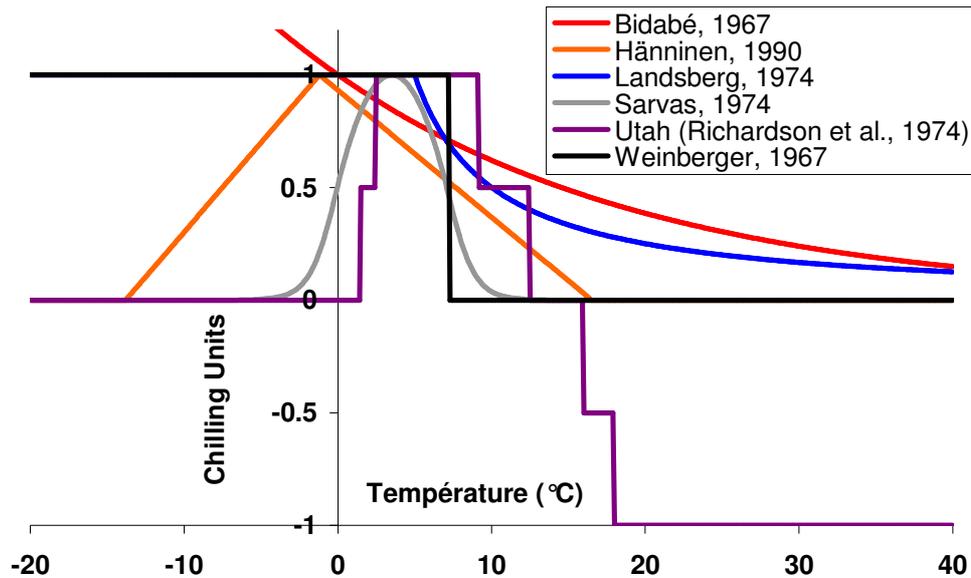


Figure 1.27. Unités de Froid (« Chilling Units ») en fonction de la température selon différents modèles usuels de levée d'endormance.

s'accumule dans le bourgeon, alors que pour des températures plus fortes, la réaction antagoniste se déroule annulant par conséquent l'effet initial du froid (Fishman *et al.*, 1987).

Tous ces modèles ne peuvent prédire la date de sortie de dormance, en dehors de leurs gammes de calibration, par exemple, en conditions de températures douces. Pourtant expérimentalement l'endormance peut tout de même être levée comme cela fût observé en Tunisie (Bidabé, 1967) ou à La Réunion (Balandier *et al.* 1993).

7.1.2. Modélisation du débourrement :

Pour modéliser le débourrement, une partie des modèles se focalise sur la phase d'écodormance qui est levée par exposition des bourgeons à des températures chaudes permettant d'accélérer le développement des bourgeons par réhydratation et allongement cellulaire. Cette phase se produit soit postérieurement à la sortie d'endormance (modèle séquentiel : Sarvas, 1974 ; Richardson, 1974 ; Fuchigami, 1982) ou se déroule en parallèle à la sortie d'endormance avec une efficacité des températures chaudes dépendant de la dose de froid accumulée (Landsberg, 1974, Cannell & Smith, 1983). Enfin, d'autres modélisations, ne tiennent pas compte de la phase d'endormance en initiant les calculs au 1^{er} janvier. Entre ces différentes approches, on n'observe pas, à l'heure actuelle, de différences significatives en termes de dates de débourrement. Le cumul de température chaude (exprimées en Forcing Unit) est généralement formulé en termes de sommes de températures ou en relation avec une fonction non linéaire, exponentielle (Bidabé, 1967 ; Sarvas, 1974 ; Riou et Pouget, 1992) ou sigmoïde (Hänninen, 1990) différemment paramétrée selon l'espèce et l'auteur. Quelques

autres modèles décrivent l'action des températures chaudes en fonction de la durée d'exposition aux températures froides. Elle peut être linéaire (Cannell & Smith, 1983) ou sigmoïde (Landsberg, 1974).

7.2. Résistance au gel

Les modèles de prédiction de la résistance au gel, à la différence des modèles de cycle annuel, ont essentiellement été produits pour des arbres forestiers, et notamment des conifères. On distingue les modèles paramétrés à l'aide de relations empiriques entre évolution de la résistance au gel et température, d'autres faisant intervenir des variables physiologiques corrélées à l'état de résistance.

7.2.1. Relations empiriques entre température / évolution de la résistance

Chez *Pinus radiata*, l'initiation du processus est déclenchée par une exposition de 42 jours à une photopériode inférieure à 11h. Puis à partir d'une température inférieure à 5°C, la vitesse d'endurcissement est calculée en fonction de la température maximale et minimale (Greer & Warrington, 1982). Elle varie linéairement de -0,4°C à 0°C par jour pour une température de -4°C à 5°C. Cette relation permet donc d'utiliser une somme de température négative (base = 5°C) pour calculer le niveau d'endurcissement de l'arbre, avec un départ en automne à -5,2°C. Mais cette approche ne permet que de prévoir les risques potentiels de gels automnaux. Elle ne permet pas de définir un niveau maximal d'endurcissement, ni la capacité au désendurcissement/réendurcissement. L'état de résistance évolue au sein d'une gamme comprise entre un état de résistance minimal et un état de résistance potentiel (Larcher, 1985a).

Cannell *et al.* (1985) développent un modèle s'initiant au 15 août (à partir d'une $LT_{50} = -5^{\circ}\text{C}$), et la résistance s'incrémente en fonction de la différence entre la température de résistance et la température minimale journalière.

Le modèle développé par Repo *et al.* (1990) prédit la vitesse d'endurcissement/désendurcissement comme étant une tendance à évoluer vers une résistance au froid proportionnelle à la température minimale.

Leinonen *et al.* (1995), à partir du modèle de Repo *et al.* (1990), modifient la vitesse d'acclimatation et la place sous le contrôle de deux variables la température et la photopériode agissant de manière additive et linéaire. Timmis *et al.* (1994) utilisent un modèle d'endurcissement/désendurcissement basé sur la survie de jeunes plants de Douglas et

définissent une résistance au gel *via* une fonction sigmoïde utilisant une somme d'action froide à partir du 28 août comme variable d'entrée durant la période d'endurcissement, puis à partir du 1er janvier en fonction de la somme des températures chaudes durant la phase de désendurcissement. Ces modèles, par leur conception, ne peuvent prédire l'état de résistance au gel que pour des arbres en conditions optimales de croissances, ou du moins non stressés.

7.2.2. Relation résistance au gel / physiologie de l'acclimatation

L'ensemble des modèles précédents ont été construits sur la base de corrélations entre résistance au froid mesurée ou estimée et température. D'autres modèles ont intégré des paramètres physiologiques. Par exemple, la modélisation de la résistance au froid en relation avec la quantité de sucres solubles a été entreprise. Mais, Lennartson & Ogren (2003) montrent une difficulté pour l'obtention des LT_{50} prédites homogènes avec les LT_{50} observées en utilisant la quantité totale des sucres solubles ou chacun des sucres pris individuellement. Leur meilleur résultat est obtenu en intégrant l'humidité pondérale.

Un autre modèle, sur pin sylvestre, a été développé par Taulavuori et al (1997a) et fait intervenir photopériode, température minimale et pH de la solution de lyse cellulaire (représentant l'intensité des dégâts subis à cause du gel) par un modèle linéaire additif. Ce modèle prédit assez efficacement l'état de résistance mais nécessite un suivi en temps réel des arbres et des prélèvements réguliers.

Dans la même approche, un modèle utilisant variable physiologique et climatique a été conçu par Poirier *et al.* (2010) également selon un modèle linéaire additif en fonction de la teneur en sucres solubles (GFS : Glucose + fructose + saccharose), de la moyenne des températures minimales calculées sur 15 jours et de l'humidité pondérale. Ce modèle développé sur noyer permet de prédire l'état de résistance à chaque instant, mais nécessite également un suivi des variables physiologiques (contenu en sucres solubles et en eau), ainsi que des températures des 15 derniers jours. Il a l'avantage par contre de tenir compte des états physiologiques de l'arbre lié aux traitements estivaux (ex. défoliation, girdling).

Par contre, ces différents modèles s'ils prédisent la dynamique d'endurcissement et parfois de désendurcissement, ne prennent pas en compte le cycle de développement de l'arbre. Il convient ainsi d'intégrer notamment, les aspects d'entrée et de sortie d'endodormance et de sortie d'écodormance, afin de calculer au mieux les risques de dommages dus au gel au cours des périodes critiques que forment l'automne et le printemps et en particulier pour les bourgeons.

7.3. Résistance au gel en fonction du cycle de développement

Néanmoins, quelques modèles sont apparus combinant acclimatation au gel et évolution du cycle annuel de développement. C'est le cas du modèle de Lecomte (2003), pour différentes variétés de blés. L'état de résistance actuel évolue entre une résistance minimale et une résistance potentielle. En fonction de la température, l'état de résistance évolue vers un état de résistance maximal (température entre 15 et 0°C), ou vers l'état minimal (température supérieure à 15°C). Si la température est négative, l'état de résistance est égal à l'état de résistance maximale potentielle.

Le modèle de Fuchigami *et al.* (1982), définit le stade de développement en degré de croissance (répartis entre 0 et 360°) et simule la résistance au froid en parallèle. Selon ce modèle :

- 0° correspond à la date de débourrement (déterminé visuellement),
- 90° à l'initiation de la maturité, arrêt de croissance et acquisition d'une sensibilité à la photopériode,
- 180° à la maturité végétative et entrée en endodormance,
- 270° maximum de dormance hivernale,
- 315° levée d'endodormance, initiation de l'écodormance,
- 360° débourrement de l'année suivante.

La levée de dormance est prédite en utilisant le modèle de Sarvas (1974). En accord avec ce modèle, Kobayashi *et al.* (1983) montre dans son modèle, une évolution des vitesses d'endurcissement en fonction de l'état d'avancement dans le cycle de croissance de l'arbre (*Cornus sericea*) et prédit avec une bonne précision la température minimale jusqu'à laquelle l'arbre survit. L'endurcissement se réalise entre 90° (arrêt de la croissance) et 315° (levée d'endodormance). Le désendurcissement est terminé lors du débourrement (360°). En fonction du stade de développement, différentes relations polynomiales sont définies et prédisent la vitesse d'évolution de la résistance. Les variables d'entrée sont donc : la température, le degré d'avancement dans le cycle et leurs interactions.

Dans son article de 1996, Leinonen intègre le cycle de développement de l'arbre pour synchroniser les dynamiques d'endurcissement et de désendurcissement tels que modélisées par Repo *et al.* (1990), en fonction de la température et de la durée de la photopériode. Ces variations lui permettent d'intégrer l'état de développement de l'arbre tout au long de l'année.

En effet, la capacité d'endurcissement (CR) est dynamique, et la liaison entre température et endurcissement suit une relation affine par morceaux avec pour paramètres :

- les niveaux maximaux d'endurcissement (selon la température et selon la photopériode),
- la température moyenne journalière,
- la photopériode journalière,
- les limites de température et de photopériode au sein desquelles l'accroissement de la résistance au froid est régulier, montré par Greer *et al.* (1998) chez *Pinus radiata* (entre -5 et 10°C).

La phase du cycle annuel évolue entre : croissance active, lignification, dormance (endodormance) et quiescence (écodormance). En croissance active, la capacité d'endurcissement est nulle ; en dormance elle est maximale ; en quiescence elle dépend de la quantité de chaleur accumulée depuis la sortie de dormance et pendant la phase de lignification, elle varie en fonction de l'avancement dans la phase de lignification.

Le modèle de Leinonen a été intégré pour l'élaboration de sous-modèles de dommages dus au gel et date de débourrement dans le modèle de simulation des aires de répartition des espèces, Phenofit (Chuine et Beaubien, 2001) où les variables d'entrée sont la température moyenne journalière et la photopériode journalière. Ainsi, deux sous-modèles impliquent une résistance aux températures gélives à travers les deux composantes de la valeur adaptative d'une espèce :

- le sous-modèle déterminant le succès reproducteur de l'arbre en estimant les dégâts causés par le gel sur les organes sensibles de l'arbre, i.e. les feuilles et les fleurs (ou leurs bourgeons respectifs).
- le sous-modèle de survie de l'espèce, qui ne fait intervenir qu'une température létale en deçà de laquelle l'espèce ne peut survivre et comparée aux températures minimales journalières. Ces températures létales ont été tirées de Sakai et Weisser (1973).

Mais ce sous-modèle de survie ne modélise pas l'effet d'un gel précoce ou tardif lorsque l'arbre n'est pas dans un état de résistance maximale. Il ne modélise pas non plus les effets de fortes contraintes sur le développement des espèces, liées aux changements climatiques prévisibles (sécheresse estivale, ennoyage hivernale, stress de défoliation, interactions entre stress) qui peuvent fortement atténuer ses capacités de survie.

8. Relation biologie hivernale, changement climatique et aire de répartition

Une augmentation des températures telles que prédites par le GIEC (IPCC, 2007) peut potentiellement avoir un impact sur la sensibilité au gel des parties lignifiées et des bourgeons. En effet des températures supérieures vont ralentir le processus d'acclimatation et accélérer le processus de désacclimatation. Et, même si *a priori*, le risque semble négligeable quand la sensibilité augmente et les températures aussi ; il y a tout lieu de s'interroger car les prédictions du GIEC prédisent également une augmentation de la fréquence des évènements climatiques extrêmes et donc des gels peut-être moins fréquents à une date donnée mais tout aussi intenses.

De multiples études ont été publiées ces dernières années sur l'impact du changement climatique sur les écosystèmes. La migration vers le nord et en altitude de multiples espèces est observée au rythme de 6,1 km par décennie vers le nord et de 6,1 m par décennie en altitude (Parmesan & Yohe, 2003). Même si à première vue, la survie des espèces forestières n'est pas menacée, leur distribution, abondance et productivité peuvent être affectées (Chuine & Beaubien, 2001). Et, concernant l'ensemble du règne végétal, des taux d'extinction de l'ordre de 6 à 8% (18 à 32% d'extinction locale) sont prédits en fonction du *scenario* climatique et une migration des aires de répartition vers le Nord et l'Est en Europe (Bakkenes *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2004). Néanmoins d'autres études prédisent un élargissement de l'aire de répartition des arbres (Shafer *et al.*, 2001) et, donc, une richesse spécifique plus importante dans les forêts nord américaines à l'horizon 2100 (Iverson & Prasad, 2001) même si leurs vitesses de migrations semblent faibles (Schwartz *et al.*, 2001). Une diminution des jours de gel permet à un certain nombre d'espèces exotiques de s'implanter dans des habitats qui jusque-là étaient hors de leur niche potentielle (Walther *et al.*, 2002). Beaucoup de ces études ont été effectuées en utilisant des modèles d'enveloppe climatique pour prédire les niches potentielles de chaque espèce. Mais cette approche néglige tous les effets d'interactions entre facteurs biotiques (compétition, parasitisme, pathogénie, phytophagie, dispersion, adaptation) et abiotiques (stress hydrique, thermique, mécanique) qui peuvent potentiellement limiter l'implantation locale d'une espèce.

Des stress osmotiques, comme la déshydratation (Siminovitch & Cloutier, 1982 ; Lee & Chen, 1993 ; Mäntylä *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 2002) ou un milieu hypersalin (Ryu *et al.*, 1995) peuvent engendrer une plus grande résistance au gel. En effet, l'état d'hydratation

Synthèse Bibliographique. 8. Relation biologie hivernale, changement climatique et aire de répartition

influence la résistance en concentrant le cytosol. Une déshydratation graduelle permet d'augmenter les capacités de résistance (Levitt, 1969). Par exemple en deux jours des rameaux déshydratés atteignent le même niveau de résistance à 15°C que des rameaux exposés à 3°C pendant 2 semaines car la déshydratation influence la conversion de l'amidon en saccharose (Sakai, 1962). La déshydratation est spécialement efficace combinée à une exposition aux basses températures (Kacperska-Palacz, 1978 ; Paquin & Mehuys, 1980). En effet, en hiver, le couvert neigeux, et l'ensemble des stress engendrés par le gel ont un fort impact sur la capacité végétative des plantes (Haag, 1974).

Mais une sécheresse intense limite les capacités d'endurcissement en jouant sur les capacités à former des réserves (Fraser & Farrar, 1957). Par exemple, de faibles niveaux de résistance sont atteints par des plantes malades, ou carencées en nutriments minéraux (Chandler, 1954 ; Biebl, 1962 ; Alden & Hermann, 1971 ; Larcher, 1985b). Les plantes qui n'ont pas pu accumuler un niveau suffisant de réserves à cause de défoliation ou de raccourcissement de période de croissance sont également moins résistantes (Kramer & Wetmore, 1943 ; Tumanov *et al.*, 1972 ; Stergios & Howell, 1977 ; Nissila & Fuchigami, 1978 ; Poirier, 2010).

La phénologie est sensiblement influencée également. On observe, à l'heure actuelle un décalage essentiellement provoqué par de plus fortes températures printanières (Cleland *et al.*, 2007). Ainsi, le débourrement de *Populus tremuloides* a été avancé de 26 jours au cours du XXème siècle (Beaubien & Freeland, 2000). La sénescence foliaire est également retardée chez certaines espèces. Menzel & Fabian (1999) ont observé une saison de végétation augmentée de 10,8 jours depuis les années 1960. D'une manière générale, la date de débourrement est avancée de 5 jours environ pour 1°C de réchauffement moyen (Menzel & Fabian, 1999 ; White *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2004) et 2 à 4 jours par décennie (Menzel & Fabian, 1999 ; Menzel *et al.*, 2006a ; Peñuelas *et al.*, 2009). Cet effet accélérateur sur la phénologie printanière ne restera vrai que tant que les besoins de froid pour lever l'endormance sont satisfaits (Cannel & Smith, 1986 ; Guédon & Legave, 2008). De plus, la variabilité des évènements phénologiques semble augmentée en ce qui concerne les évènements printaniers, et ce d'autant plus en années chaudes (Menzel *et al.*, 2006b).

Néanmoins, la plasticité à la température semble différente selon les espèces. Par exemple, le hêtre ne montre qu'un très faible décalage phénologique le long d'un gradient altitudinal suggérant un effet prioritaire de la photopériode (Vitasse *et al.*, 2009). Mais en quelle mesure ce phénomène est généralisable chez les arbres, à l'heure actuelle ce sujet reste en débat au sein de la communauté scientifique (Körner & Basler, 2010a, b ; Chuine *et al.*,

2010). De plus, l'ensemble des hypothèses ayant servi à la conception de ces modèles sont empiriques. La réponse des processus de dormance face à une élévation de température reste à l'heure actuelle très incertaine.

L'augmentation de la durée de la saison de végétation et des températures plus élevées vont probablement retarder et ralentir le processus d'acclimatation, ainsi qu'avancer et accélérer la désacclimatation. (Taulavuori *et al.*, 1997b, Ögren, 1996 ; Repo *et al.*, 1996 ; Ögren, 1997, 2001). Ceci est également observé en présence d'une concentration plus importante en CO₂ (Woldendorp *et al.*, 2008).

Certains auteurs ont testé différents modèles pour prédire les risques printaniers de dommages dus au gel mais leurs résultats sont contradictoires : (Murray *et al.* 1989 ; Hänninen, 1991 ; Kramer, 1994 ; Kramer *et al.*, 2000 ; Linkosalo *et al.*, 2000). En effet, selon le modèle utilisé, le scénario climatique et son incertitude liée, la probabilité d'un évènement de gel aux alentours de la date de débourrement reste fortement putative. Néanmoins, Hänninen (2006) estime que la réponse à la température des bourgeons en phase d'écodormance constitue le trait écophysologique critique permettant d'évaluer le risque de dommages.

Quoiqu'il en soit, l'effet de ces changements sur le fonctionnement de l'écosystème est encore mal évalué. Par exemple, chez le Pin sylvestre, l'impact de l'augmentation des températures permettrait d'augmenter la quantité de carbone fixé par allongement de la période de photosynthèse efficace (Leinonen & Kramer, 2002) et par un effet positif sur le rapport photosynthèse / respiration (Saxe *et al.*, 2001). Par contre, le pin lodgepole montre une diminution de la quantité de sucres solubles et une augmentation de la LT₅₀ (Ögren, 2001). Ainsi, les effets potentiels des changements climatiques sur la biologie hivernale des arbres sont incertains.

Objectifs de la thèse

L'adaptation de l'agriculture et de la forêt aux changements climatiques constitue un enjeu majeur dans les contextes social, économique et environnemental (bois, énergie, rôle écosystémique des forêts,...) des prochaines années. Les impacts directs de ces changements climatiques concernent entre autres la capacité de survie des arbres dans leurs biotopes actuels et des lacunes de connaissances ont été identifiées. Ainsi, pour la température, s'il est généralement admis que la moyenne et la variance des températures seront très probablement augmentées au cours du siècle à venir, avec une fréquence des événements de gel plus faible, l'intensité de ces événements resterait similaire. Dans ces conditions, l'augmentation des dommages liés au gel a une forte probabilité d'augmenter, car paradoxalement, la possibilité de résister à un événement intense de gel s'acquiert progressivement à l'automne, sous l'influence de températures basses : on parle d'endurcissement au gel. De plus, au printemps, des températures plus douces en moyenne plus douces peuvent accélérer la désacclimatation et le débourrement des bourgeons et ainsi provoquer une exposition potentielle d'organes sensibles à des gels probablement plus fréquents.

Plusieurs modèles existent pour décrire cette acclimatation, mais aucun ne tient compte jusqu'à maintenant d'événements climatiques et/ou physiologiques extrêmes. Les travaux de Magalie Poirier (2008) ont commencé à combler ce manque en proposant un modèle semi-mécaniste permettant de tenir compte des conditions actuelles (températures de l'air) et passées (état physiologique de l'arbre lié à ses conditions de croissance antérieures) ainsi que de leurs interactions pour prédire à chaque instant la résistance au gel de l'arbre au cours d'un hiver. Ainsi, un stress subi au cours de la période estivale peut, sans être létal, avoir des conséquences différées quant à la résistance vis-à-vis du gel, l'hiver suivant, en limitant les capacités d'endurcissement.

Dans ce contexte-là, il apparaît donc important de pouvoir prédire l'évolution de la résistance au gel, à partir de variables d'entrée uniquement climatiques, afin d'utiliser les sorties des modèles d'évolution climatique, tout en utilisant une approche intégrant les mécanismes physiologiques de l'acclimatation au gel, en tant que variables intermédiaires. C'est l'objectif de ce travail pour lequel nous avons acquis et rassemblé des connaissances sur les mécanismes physiologiques de la résistance au gel afin de concevoir un nouveau

Objectifs de la thèse

modèle qui puisse caractériser l'évolution du contenu en eau et du contenu en sucres solubles en fonctions de variables uniquement climatiques.

Afin d'approcher ce but nous avons voulu dans un premier temps valider l'utilisation de ce critère écophysologique de résistance des cellules vivantes au gel dans une comparaison inter spécifique de ce paramètre parmi d'autres en relation avec la limite altitudinale (fortement corrélée à l'occurrence des températures gélives).

Puis, une étude de la variabilité spatiotemporelle de la résistance au gel chez une espèce modèle sélectionnée nous permet d'identifier et quantifier les risques actuels. Enfin, les relations entre acclimatation, dormance, physiologie et climat dans différentes conditions environnementales et pour différents géotypes nous a permis d'acquérir les données suffisantes pour la calibration et la validation de ce modèle.

Résultats et discussion

Résistance au gel et limite de distribution

Les basses températures constituent l'un des principaux facteurs contrôlant la distribution des espèces végétales (Sakai & Larcher, 1987). Par exemple, la limite altitudinale des arbres, la « treeline », est fortement corrélée avec la limite de présence des neiges éternelles (Körner, 2003) et la transition entre forêt de feuillus et de conifères avec un thermocline de -40°C (Woodward, 1987). Cette influence s'exerce différemment, selon la période de l'année ou l'organe considéré. On peut ainsi mettre en évidence que la vulnérabilité au gel des plantes sera dépendante de différents facteurs tels que la probabilité d'exposition des organes les plus sensibles (principalement les organes non lignifiés), l'acquisition d'une résistance suffisante des organes pérennes (lignifiés) vis à vis de la dynamique saisonnière d'évolution des températures ou la capacité à limiter ou à résorber l'embolie gazeuse au sein des tissus conducteurs de sève brute.

De forts contrastes peuvent être observés entre espèces pour ces facteurs mais, à l'heure actuelle, il est difficile d'identifier le (ou les) facteurs prépondérants dans la définition de la marge froide de la niche climatique potentielle. En effet, différentes hypothèses sont émises quant à l'explication physiologique de ces limites de distribution : certaines suggèrent l'implication d'une résistance cellulaire, et notamment un effet sur la fluidité membranaire (Lyons & Raison, 1974). Une limitation par le carbone est également évoquée par déséquilibre dans la balance photosynthèse/respiration ou par une saison de croissance (et donc de photosynthèse active) fortement raccourcie (Körner, 1999). D'autres hypothèses suggèrent une limitation hydrique dépendante de la résistance du système vasculaire à l'embolie (Mayr *et al.*, 2006). Enfin, l'évitement des gels tardifs à sa période la plus sensible, le débourrement, pourrait également intervenir dans la capacité de survie en milieux où la contrainte due au gel est importante (Cannell *et al.*, 1985a ; Cannell & Smith, 1986).

Dans cette étude, nous avons donc, dans un premier temps, cherché à identifier quel type de risque lié aux basses températures constitue le facteur prépondérant ou s'il s'agit d'une interaction permanente de différents stress qui additionnés empêchent toute forme végétale de s'établir de manière pérenne en-deçà d'une température propre à chaque espèce. Pour cela, la résistance au gel vis-à-vis de l'embolie hivernale et de la lyse des cellules vivantes ainsi que les risques d'exposition aux gels printaniers lors du débourrement ont été

mesurés chez différentes espèces contrastées pour leur limite altitudinale potentielle (entre 800 et 2000m) : cf. Annexe 1.

La résistance des tissus non vivants transporteurs de sève brute à la formation d'embolie hivernale est corrélée avec la limite altitudinale potentielle de répartition des espèces étudiées (Figure 2.1). La sensibilité à la formation d'embolie hivernale dépend du diamètre hydraulique des vaisseaux, ce qui n'avait été observée qu'en conditions de laboratoire jusqu'à présent (Davis *et al.*, 1999). Ces vaisseaux montrent une forte variabilité à l'échelle inter spécifiques entre les trachéïdes des conifères de diamètre de l'ordre de dix à quinze microns et les vaisseaux du bois de printemps des espèces à zone poreuse (supérieurs à 200µm). A l'échelle intra spécifique également, des variations ont été observées le long de gradients altitudinaux (Lens *et al.*, 2004 ; Fisher *et al.*, 2007). Ainsi, en conditions de fortes contraintes, seules des espèces à petits vaisseaux sont observées : forêts de conifères en limite altitudinale et en zone boréale.

Mais la susceptibilité à la formation d'embolie, et donc la taille des vaisseaux, n'est pas le seul paramètre à considérer. En effet, la fonctionnalité du système conducteur n'est nécessaire, pour les arbres à feuilles caduques, que lors de la saison de végétation. La génération d'embolie peut même être regardée comme un mécanisme de protection vis-à-vis des contraintes mécaniques, engendrées par l'expansion de la sève lorsqu'elle passe de l'état liquide (inorganisé) à l'état solide (cristallin). Ces contraintes mécaniques imposées par la formation de la glace peuvent être suffisamment importantes pour provoquer des dégâts irréversibles par rupture du bois, comme dans le cas des gélivures (Ishida, 1963). Pour des dommages plus superficiels (on parle parfois d'échaudure ou de nécrose corticale), circonscrit dans la zone écorce-cambium, ces nécroses peuvent s'avérer devenir des facteurs favorisant l'infection par des insectes ou champignons, et favoriser un dépérissement à plus long terme.

Différents mécanismes ont été identifiés pour rétablir la continuité hydraulique entre le système racinaire fournisseur de la sève brute et les organes aériens pour lesquels une alimentation en eau suffisante est nécessaire pour maintenir la turgescence cellulaire et les fonctions physiologiques. Des mécanismes de mise sous pression de la sève xylémienne en plein hiver, par une exportation d'*osmoticum* vers le *lumen* des vaisseaux qui en créant une différence de potentiel osmotique génèrent un flux d'eau des parenchymes xylémiens vers les éléments conducteurs (Améglio *et al.*, 1995, 2001 ; 2002, 2004). Au printemps également, l'appareil racinaire permet de générer une mise sous pression de la sève et donc de résorber l'embolie créée durant l'hiver (Ewers *et al.*, 2001). Ces mécanismes identifiés jusqu'à présent

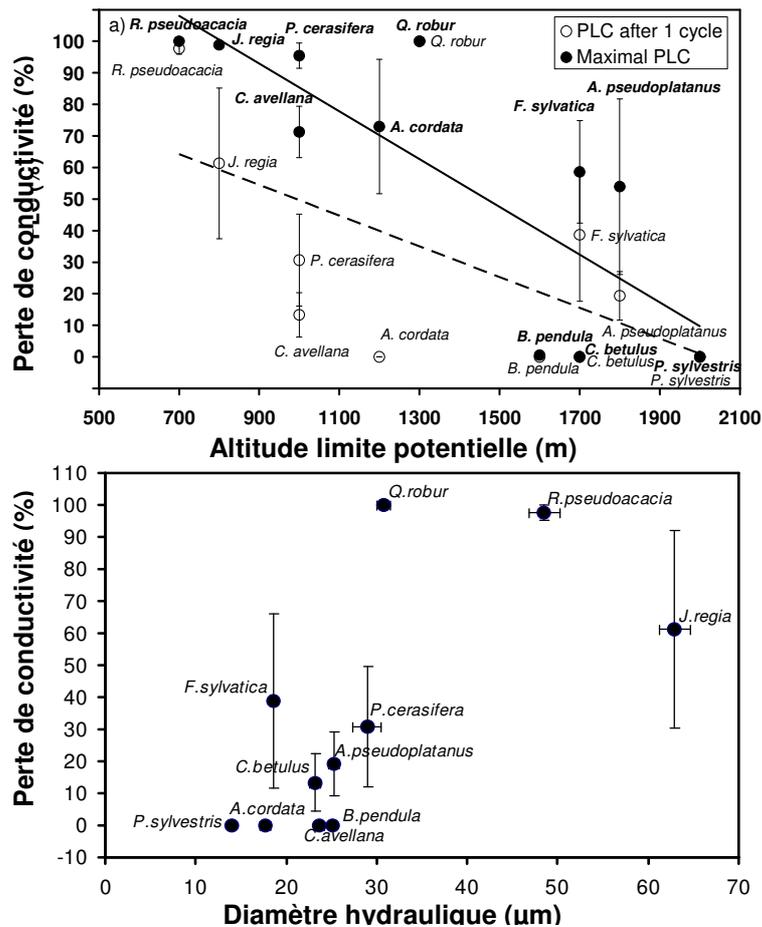


Figure 2.1. a) Relation entre limite altitudinale potentielle et pourcentage de perte de conductivité hydraulique après soit 1 seul cycle gel/dégel (à l'automne) ou la valeur maximale observée durant l'hiver chez 11 espèces communes d'arbres européens, b) Relation entre le pourcentage de perte de conductivité après 1 cycle gel/dégel et le diamètre hydraulique des vaisseaux chez les mêmes espèces (Charrier *et al.*, en révision).

chez quelques espèces, s'avèrent être beaucoup plus largement distribués chez les arbres (sept des onze espèces étudiées dans le chapitre 1) avec une poussée de branche (« stem pressure ») chez *B. pendula*, *F. sylvatica* et *J. regia x nigra*, et probablement *A. cordata*, *C. betulus*, *C. avellana* et une poussée racinaire (« root pressure ») chez *A. pseudoplatanus*, *A. cordata*, *C. betulus*, *F. sylvatica* et *J. regia x nigra*. Parmi les onze espèces étudiées et pour celles pour lesquelles une extraction de la sève a été possible, on peut expliquer l'augmentation de la pression osmotique de la sève pour deux tiers par une augmentation de concentration en sucres dans la sève.

Une relation entre limite altitudinale potentielle et résistance maximale des cellules vivantes au gel a été observée (Figure 2.2). Cette résistance au gel, pour les cellules vivantes, s'acquiert à travers l'hydrolyse des réserves carbonées accumulées pendant la période de croissance en osmolytes. Ils peuvent être des sucres solubles (chez les angiospermes : Sakai 1966b ; Sauter *et al.* 1998; Palonen *et al.* 2000; Améglio *et al.* 2004; Morin *et al.* 2007; Poirier *et al.* 2010) ou d'autres composés (pour les Conifères) non identifiés dans notre étude,

mais pouvant être des acides aminés, lipides ou des macromolécules dans différentes études (Lasheen & Chaplin 1971; Zwiazek *et al.* 2001; Wolfe *et al.* 2002).

De plus, cette résistance maximale des cellules vivantes est fortement corrélée avec le contenu en glucides non structuraux observés à l'automne. Ce dernier révèle ainsi la potentialité pour l'arbre de former des osmoticum (pour abaisser le point de congélation intracellulaire) et d'alimenter son métabolisme hivernal.

Le mécanisme de protection fait intervenir trois effets différents : (i) abaissement du point de congélation du cytosol, (ii) maintien d'une couche de solvation autour des macromolécules et membranes (iii) un substrat pour l'activité métabolique. L'effet généré sur le potentiel chimique par ces solutés, au vu des concentrations observées *in natura*, ne permet d'abaisser le point de congélation du cytosol qu'au maximum de quelques degrés (Cavender-Barès, 2005).

Mais en intervenant en synergie avec un autre mécanisme, la formation de glace extracellulaire, cette augmentation de la concentration intracellulaire favorise la résistance au

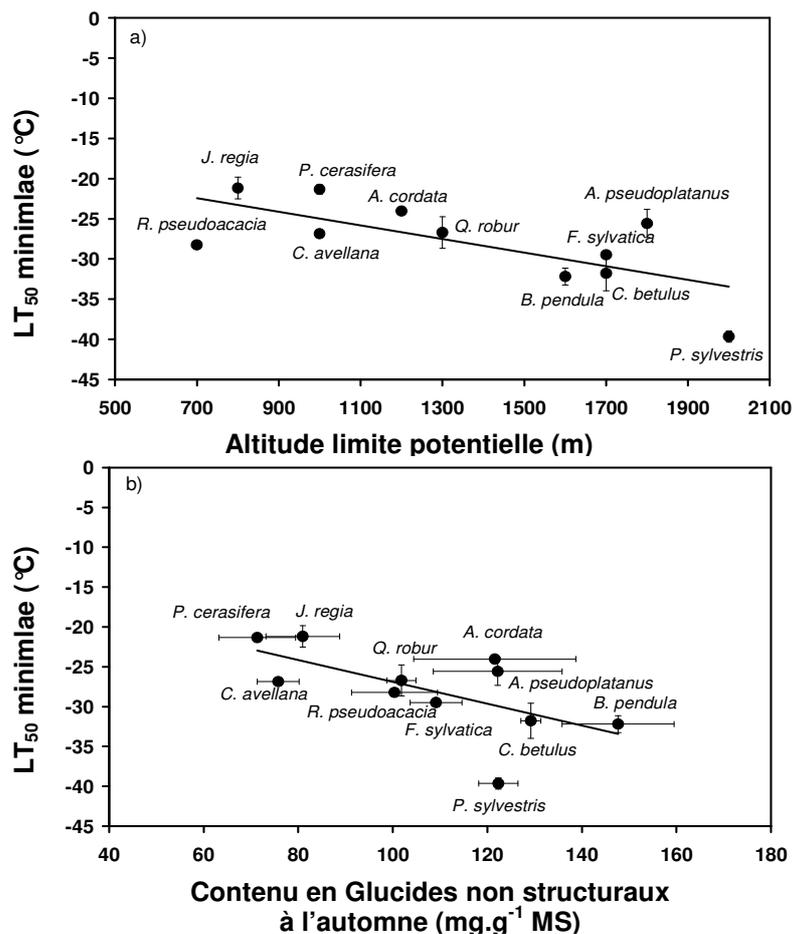


Figure 2.2. a) Relation entre limite altitudinale potentielle et LT₅₀ (température létale pour 50% des cellules) minimales durant l'hiver chez 11 espèces communes d'arbres européens, b) Relation entre la LT₅₀ minimales et la quantité de glucides non structuraux à l'automne chez les mêmes espèces (Charrier *et al.*, en révision).

gel. En effet, le point de congélation étant inférieur dans cet espace la formation de glace y est produite à des températures plus basses. De plus, le plus grand volume d'eau extracellulaire est également un facteur intervenant dans la favorisation d'une formation de glace dans ce compartiment en premier, car, d'un point de vue strictement stochastique, un évènement de nucléation de la glace y est plus probable (Asahina, 1956 ; Kitaura, 1967). Ainsi la glace ayant un potentiel chimique inférieur à celui de l'eau liquide quelque soit la température, un flux d'eau est généré du symplasme vers l'apoplasme abaissant encore plus le point de congélation (Gusta *et al.*, 1975 ; Pearce, 1988).

La quantité d'eau effluée des cellules pouvant être importante, le deuxième mécanisme d'action de ces solutés, *i.e.* maintien d'une couche de solvation autour des macromolécules et membranes, s'avère ainsi protecteur de l'intégrité structurale du contenu cellulaire (Heber & Santarius, 1973 ; Steponkus, 1977 ; Santarius, 1982). On peut ainsi observer un tel efflux d'eau que la viscosité du cytosol devient supérieure à 10^{14} .Pa.s⁻¹ aboutissant à un état quasi stable, un état vitrifié (Franks, 1982 ; Wolfe & Bryant, 1999).

Nos résultats montrent également, que le temps thermique accumulé avant d'observer le débourement de chaque espèce ne semble pas corrélé avec la limite altitudinale potentielle de chaque espèce.

Malgré les capacités de résilience observées vis a vis de l'embolie hivernale chez les caducifoliés, la capacité de résistance semble être le caractère principal dans la définition de la niche climatique d'une espèce. Ainsi, nous avons pu utiliser les deux résistances maximales significativement corrélées avec la limite altitudinale potentielle (résistance maximale des cellules et perte de conductivité hydraulique maximale) pour chaque espèce permet de prédire la limite potentielle de distribution altitudinale selon le modèle suivant :

$$\text{altitude limite potentielle} = 1804 - 5,3 \cdot LT_{50\text{min}} - 9,6 \cdot PLC_{\text{max}}$$

Ce modèle simple prédisant un effet additif de chacune des deux résistances, avec un effet significatif de chaque variable suggère que malgré une corrélation entre variable, ces deux résistances pourraient avoir été sélectionnées indépendamment au cours de l'évolution, sous la même pression évolutive. Par calcul simple, ce modèle peut également permettre de mesurer l'importance relative de chacune de ces deux résistances. Ainsi, si l'on considère la résistance des cellules vivantes généralement comprise entre -5°C (plantes extrêmement sensibles) et -60°C (plantes extrêmement résistantes), la résistance cellulaire permet d'expliquer une variation de distribution de l'ordre de $5,3 \times ([-5 ; -60]) \approx 300\text{m}$. En considérant la résistance à l'embolie hivernal, l'amplitude potentielle est beaucoup plus importante (entre 0 et 100% de perte de conductivité) : de l'ordre de $9,6 \times ([0 ; 100]) \approx 1000\text{m}$.

Résistance au gel des cellules vivantes : variabilité spatio temporelle

Par conséquent, la sensibilité du système vasculaire, bien que majeure dans la répartition altitudinale des espèces, ne dépend finalement que de facteurs acquis (dimension des vaisseaux) et climatiques (nombres de cycles de gel, sécheresses). De plus, cette sensibilité ne montre que peu de variabilité intraspécifique (néanmoins quelques études montrent une évolution du diamètre des vaisseaux le long de gradients altitudinaux, Gansert *et al.*, 2006) et interannuelle (par une modulation des dimensions des vaisseaux pendant leur formation : par exemple, bois de printemps *vs* bois d'été). Néanmoins cette variabilité identifiée pour ce caractère est essentiellement formée à l'échelle inter générationnel (adaptation) et très peu à l'échelle infra générationnelle (acclimatation).

L'acclimatation est donc réalisée à travers l'acquisition transitoire d'une résistance plus importante aux périodes où les risques de dégâts du gel augmentent. Cette résistance des cellules vivantes évolue très fortement au cours de l'année et particulièrement à l'automne et au printemps. L'acclimatation au froid des cellules vivantes est le plus souvent appelée endurcissement dans la littérature et nous allons, par la suite focaliser sur l'endurcissement au gel en étudiant le cas du noyer (*J.regia* L.), arbre pour lequel l'UMR PIAF dispose à la fois d'une base de résultats physiologiques particulièrement importantes depuis de nombreuses années, mais également de conditions expérimentales intéressantes en terme de collection variétale (4 variétés fruitières (*J.regia* *cv* Chandler, Franquette, Lara et Serr) et des hybrides à bois (*J.regia* *x nigra* NG38 regroupés en arbres à débourrement « précoces » et « tardifs »)) ou de variabilité environnementale (plantations comparées en plaine (altitude : 350m) et moyenne montagne (altitude : 850m)).

La capacité de résistance ainsi que l'exposition aux gels sont variables selon la période de l'année ainsi que la position spatiale. Par exemple, entre organes, des différences significatives sont observées ; les parties racinaires ne montrent aucune évolution significative de leur résistance alors que, dans les parties aériennes, on observe un processus d'acclimatation avec une dynamique parallèle et des niveaux similaires entre tronc et rameaux de l'année (Figure 2.3), *cf.* Annexe 2. Dans les conditions environnementales de notre étude, la température du sol est toujours supérieure aux niveaux de résistance observés pour les racines (-5°C). Ainsi, nous avons donc choisi de nous focaliser par la suite sur les parties aériennes. De plus, les températures les plus basses sont toujours observées à l'interface entre végétation et air car les parties inférieures sont réchauffées par l'énergie radiative émise par le

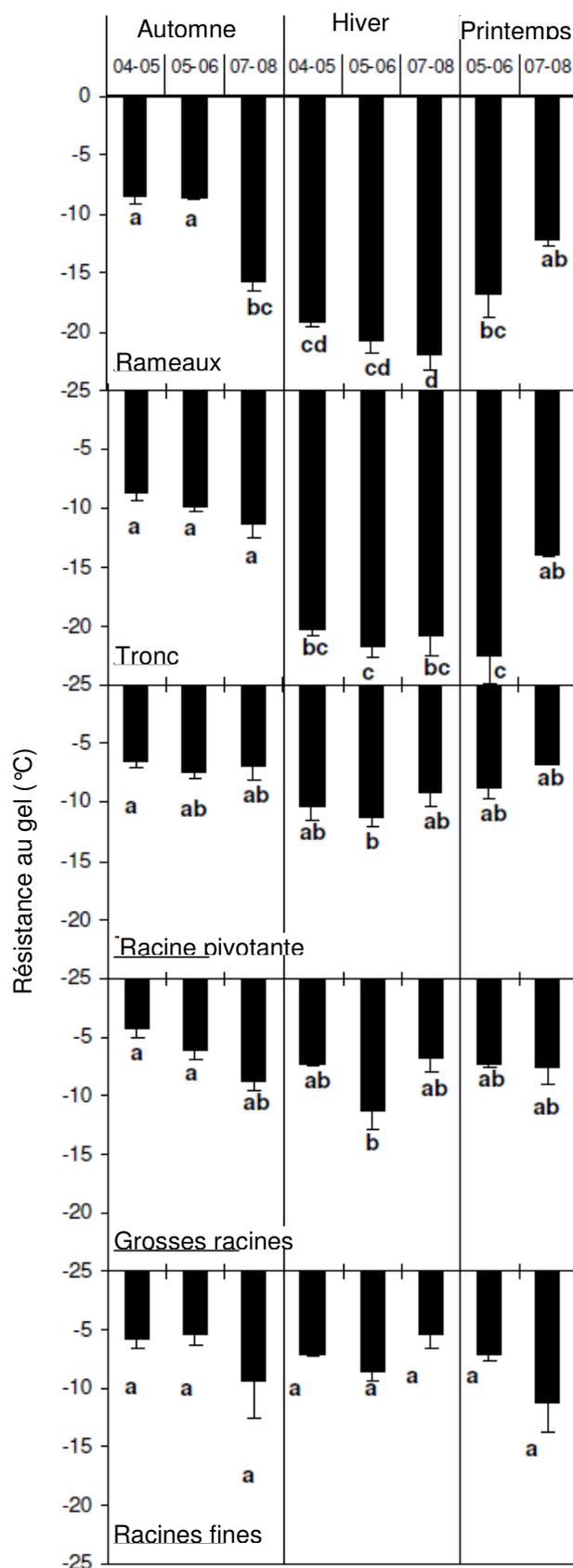


Figure 2.3. Résistance au gel dans différents organes de jeunes noyers (*J.regia* L.) : racines fines, grosses racines, pivot, tronc et rameaux, prélevés à l'automne, en hiver et au printemps lors de 3 années différentes. Les barres indiquent l'erreur standard, et des lettres différentes des différences significatives entre années pour un organe donné.

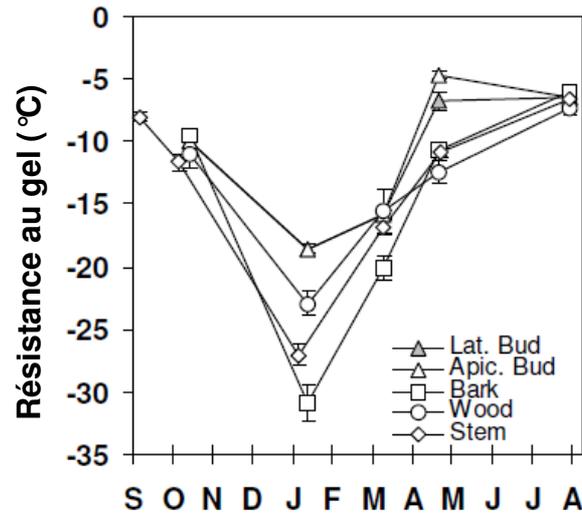


Figure 2.4. Evolution de la résistance au gel dans différents tissus de rameaux de l'année de noyers adultes : bois, écorce, rameau entier, bourgeons (distinction entre apicaux et latéraux au débourrement). Les symboles représentent la moyenne et les barres l'erreur standard de 5 répétitions.

sol. Par conséquent, les rameaux de l'année sont les organes les plus exposés au gel et ont donc été étudiés plus finement.

La dynamique saisonnière entre l'écorce, le bois et les bourgeons montre peu de différences à l'automne. En plein hiver, on observe donc une dynamique d'acclimatation /désacclimatation, mais des variations dans les niveaux de résistance maximale selon les tissus (Figure 2.4). Ainsi, l'écorce est la partie la plus résistante (Andergassen & Bauer, 2002) et les bourgeons sont les organes les plus sensibles. Cette sensibilité des bourgeons est observé à la fois en plein cœur de l'hiver, mais également au débourrement où ils sont particulièrement susceptibles d'être endommagés (Cannell, 1984 ; Cannell & Smith, 1984 ; 1986 ; Neuner & Beikircher, 2010). Leur sensibilité ($LT_{50} > -5^{\circ}\text{C}$) est telle qu'un gel de faible intensité peut suffire à endommager fortement les organes végétatifs de la nouvelle saison de croissance. Malgré cela, une différence importante est observée entre différents génotype du genre *Juglans* (*J.regia* et *J.regia x nigra*), chez le génotype le plus précoce, aucune évolution significative n'est observée en fonction du stade phénologique alors que les deux autres génotypes plus tardifs montrent un niveau de résistance qui diminue progressivement en fonction de l'avancement phénologique (Figure 2.5). En période estivale et en fin de saison de croissance, la résistance au gel est similaire quelque soit le tissu ou organe considéré.

Nous pouvons donc considérer que la résistance au gel évolue chez le noyer entre des valeurs de -5 à -35°C environ. De plus, une forte variabilité spatiotemporelle existe et l'on peut imaginer qu'il peut exister une relative vulnérabilité, notamment pour les racines, très sensibles tout l'hiver ou les bourgeons extrêmement sensibles également, mais seulement à la

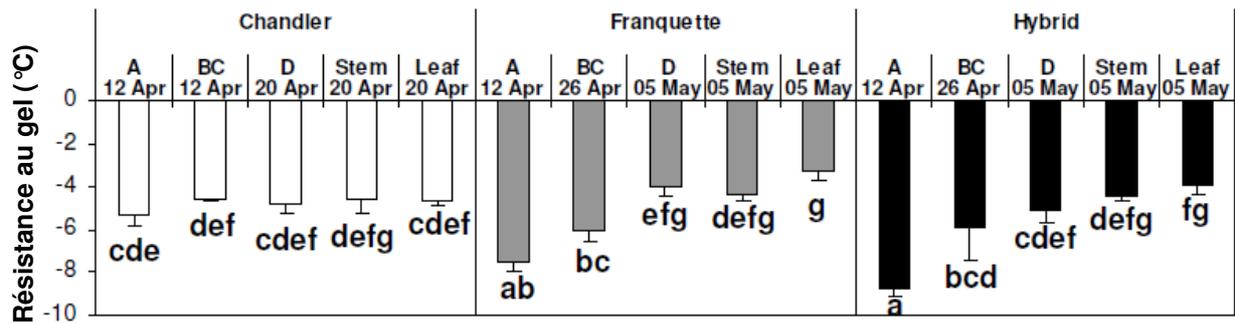


Figure 2.5. Résistance au gel des bourgeons terminaux en fonction de leur stade phénologique prélevés au cours de l'avancée de leurs cycles de développement chez 3 variétés de noyer européens Chandler et Franquette et des hybrides *J.regia x nigra*.

période du débourrement. Mais cette sensibilité implique-t-elle un risque réel pour l'arbre ou existe-t-il une marge de sécurité vis-à-vis des événements climatiques moyens et extrêmes ?

En d'autre terme existe-t-il un croisement entre l'aléa (ou la sensibilité à une réperiode donnée) et l'exposition (ou la probabilité d'occurrence d'un gel suffisant pour induire des dégâts) ? Afin de mieux caractériser ce(s) risque(s), nous avons observé les relations entre résistance au gel des rameaux et bourgeons et fréquence et/ou intensité des gels chez différentes variétés de noyers identifiées comme montrant un fort décalage phénologique au débourrement. Nous avons également utilisé différentes conditions climatiques, sur un gradient altitudinal (plaine, site de Crouelle vs. moyenne montagne, site de Theix) pour confronter les évolutions de résistance au froid mesurées à la variabilité des climats sur ces deux sites sur les 25 dernières années.

L'évaluation de la différence de sensibilité entre saisons, et des niveaux de risques existant à l'heure actuelle pour les différents génotypes de noyer dans nos conditions climatiques nous a permis d'identifier, quoique sommairement, les périodes de risques (Figure 2.6, cf Annexe 3).

A l'automne, les risques apparaissent équivalents entre variétés pour les rameaux et bourgeons. En effet, nous avons observé une résistance au gel similaire et, lors de cette période, la dynamique d'acclimatation est déclenchée par la diminution de la photopériode (Aronsson, 1975), donc synchrone entre plaine et moyenne montagne. Les niveaux de résistance atteints semblent suffisant au regard de l'intensité des premiers gels (Weiser, 1970), même au regard des températures minimales observées depuis 25 ans. Néanmoins, le risque d'aléa climatique se situe en aval, car la suite de la dynamique est sous le contrôle des basses températures, et ce, d'autant plus rapidement que les températures sont basses : moyenne montagne vs plaine (Larcher & Mair, 1968 ; Greer, 1983). Par ailleurs, différentes études ont montré que *in natura*, en cas de températures particulièrement douces, on observe une

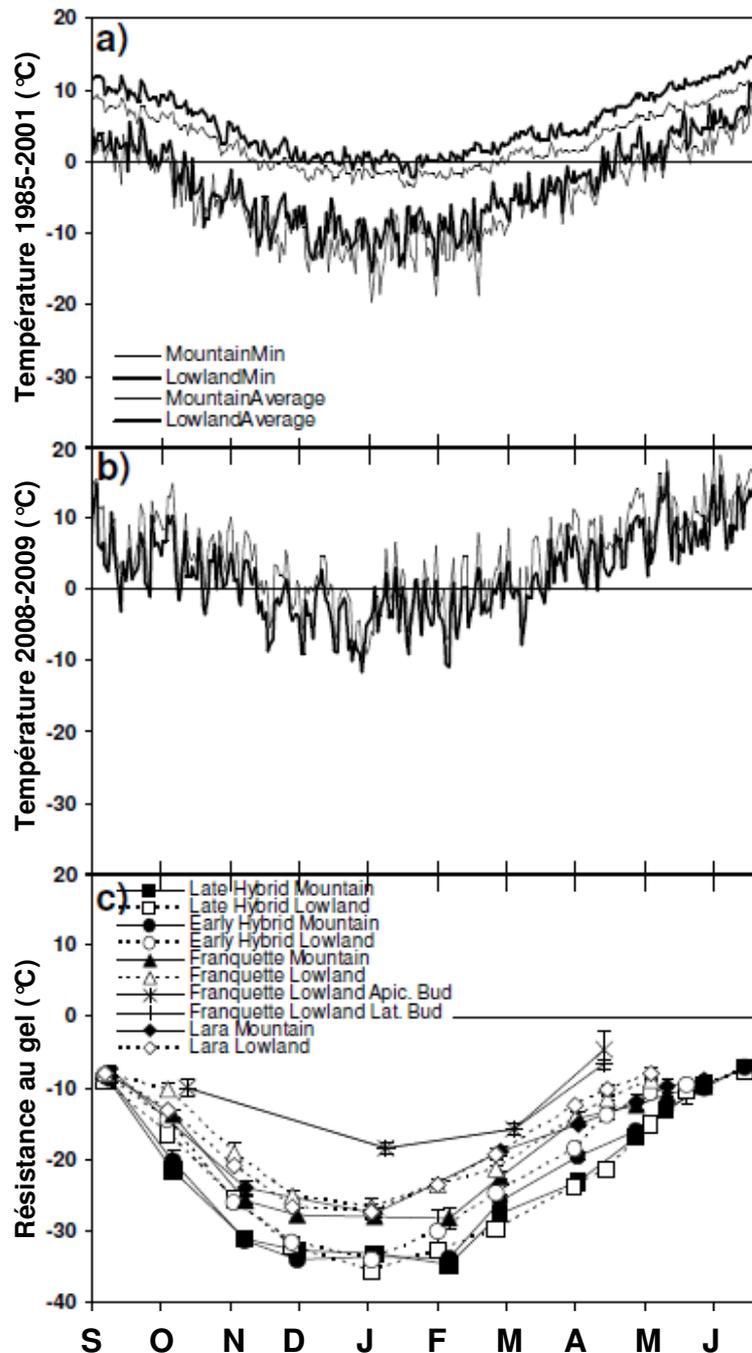


Figure 2.6. a) Températures minimales observées durant la période 1985-2010 en plaine (ligne fine) et moyenne montagne (ligne épaisse) b) Températures minimales observées lors de l'hiver 2008-2009 dans les mêmes sites c) Résistance au gel observées chez différentes variétés de noyer (Hybrides tardifs : carrés, Hybrides précoces : cercle, Franquette : triangle, et Lara : Losange) en plaine (ligne pointillée, symboles blancs) et en moyenne montagne (ligne pleine, symboles pleins) et dans les bourgeons de Franquette en plaine (Bourgeons apicaux : croix à 8 branches, bourgeons latéraux : croix à 4 branches). Au débourrement, les bourgeons apicaux et latéraux sont distingués. Chaque point représente la moyenne et les barres l'erreur-standard de 5 échantillons.

stagnation de ce niveau de résistance (Repo *et al.*, 1996) ou, même, un désendurcissement (Cannell *et al.*, 1985). En revanche, nous n'avons observé aucun effet génotypique significatif sur la vitesse d'endurcissement à la différence des études de Nilsson & Walfridsson (1994) et de Bower & Aitken (2006) chez des conifères.

De plus, les faibles niveaux de résistance sont plus fortement influencés par la dynamique d'humidité pondérale. Ainsi, la résistance peut stagner ou même diminuer (en situation de températures douces et/ou faible demande climatique en eau). Dans ces conditions, les risques seraient particulièrement important à l'automne et un gel à cette période en deçà du niveau de résistance pourrait endommager sérieusement les bourgeons, mais aussi les parties lignifiées (car leur résistance est proche à cette période). C'est d'ailleurs à cette période que les plus fort taux de mortalité ont été enregistrés pour le noyer (source Station de la Noix de Creysse).

En plein hiver, le niveau de résistance maximal est peu variable que ce soit entre géotypes (Nilsson & Walfridsson, 1994 ; Bower & Aitken, 2006) ou conditions environnementales (Larcher & Mair, 1968 ; Morin *et al.*, 2007). La seule différence de résistance s observe entre l'hybride à bois (*J. regia x nigra*) et les variétés fruitières (*J. regia*). La capacité de résistance maximale semble donc indépendante des conditions environnementale, mais un trait spécifique permettant de définir une limite d'intensité maximale de gel (altitudinale ou latitudinale) à partir de laquelle la survie est en jeu et semble donc un paramètre crucial quant à la définition de la marge froide d'une niche climatique potentielle. Ainsi dans nos conditions expérimentales les risques en période hivernale sont extrêmement faible et porte uniquement, pour la partie aérienne, sur le bourgeon.

Au printemps, les rameaux, ou les différents tissus les composants, sont, malgré un désendurcissement significatif, également plus résistant que l'intensité des gels observés dans nos sites expérimentaux. Ce désendurcissement est d'autant plus rapide que les températures sont chaudes (Taulavuori *et al.*, 2004b), mais on observe également un effet génotypique non négligeable et une interaction entre ces deux facteurs sur la vitesse de désendurcissement, également observés par Larcher & Mair (1968), Nilsson & Walfridsson (1995) et Bower & Aitken (2006). Cette variabilité est également observée en termes de dates de débourrement (Cannell *et al.*, 1985 ; Howe *et al.*, 2000) et la précocité de débourrement semble être un facteur augmentant les risques vis-à-vis des gels tardifs. A proximité de la date de débourrement, les bourgeons deviennent extrêmement sensibles. Cette sensibilité évolue selon le stade phénologique que ce soit le long d'un rameau, ou en fonction du temps (Taschler *et al.*, 2004 ; Neuner & Beikircher, 2010). Ceci n'est par contre pas observé chez la variété la plus précoce Chandler chez qui aucune évolution significative en fonction du stade, n'a été observée. Ainsi, la vitesse de croissance des bourgeons au printemps a été identifié comme comme étant le trait écophysiological critique dans la prédiction des risques de dommages dûs au gel en situation de changement climatique (Hänninen, 2006). Ainsi les principaux

risques portent sur les variétés les plus précoces, mais comme l'ensemble des bourgeons ne débourre pas de manière synchrone le long d'un rameau, il semble exister une marge de sécurité à ce niveau (comme nous avons pu l'expérimenter chez certaines variétés au printemps 2008). Seul un gel récurrent pour une variété sensible (débourrement trop précoce vis-à-vis des risques de gel au printemps) représente un coût énergétique non négligeable pour l'arbre et peut l'empêcher de ce développer dans cette période où il vit sur ces réserves.

Ainsi, dans un contexte d'évolution climatique, les phases de transition à l'automne entre arrêt de croissance et résistance maximale, nous semblent les plus risquées, car fortement dépendantes des conditions environnementales. Une compréhension plus fine de leur mise en place est donc nécessaire pour la prédiction des risques futurs.

Après avoir caractérisé la dynamique d'acclimatation désacclimatation tout au long de l'hiver, pour différents organes, tissus et différents génotypes de noyer, il apparaît dans l'ensemble de ces résultats qu'il existe une variabilité sous contrôle environnementale lors des phases d'acclimatation (à l'automne) et de désacclimatation (au printemps), une faible variabilité génotypique à l'automne (seulement entre noyers hybrides à bois et noyers à fruit) et plus importante au printemps (avec un désendurcissement d'autant plus rapide que le génotype est précoce). En plein hiver, la seule variabilité observée est entre noyers à fruits et noyers à bois. L'ensemble de ces résultats sont en cohérence avec différentes études effectuées sur la variabilité génétique et environnementale de l'acclimatation au gel (Larcher & Mair 1968 ; Nilson & Walfridsson, 1995 ; Bower & Aitken, 2006 ; Morin *et al.*, 2007).

Relation avec le cycle annuel de développement

Nous avons également essayé de comprendre comment prévoir les risques de gel au printemps, notamment quels sont les facteurs qui peuvent expliquer les différences de précocité de débourrement que nous avons observées entre variétés, *cf.* Annexe 5. Parmi ces facteurs, l'état de dormance des bourgeons, différents selon les variétés est souvent évoqué dans la littérature. La dormance est un état de suspension temporaire de croissance des cellules méristématiques (Lang *et al.*, 1987). Cet état dormant peut se décomposer en différentes phase, une dormance due à des facteurs intrinsèques (endodormance autrefois après dormance vraie) et une dormance limitée par des facteurs environnementaux (écodormance autrefois quiescence). Ces deux phases se suivent dans le temps et sont dépendantes de températures basses pour la levée d'endodormance (Weinberger, 1950) et de températures plus douces pour provoquer ensuite le débourrement.

Or, les mécanismes de dormance hivernale et d'acclimatation au gel sont initiés par les mêmes signaux environnementaux, à savoir une diminution de la photopériode dans un premier temps (Aronsson, 1975), puis l'endodormance est levée et l'endurcissement favorisé par les basses températures puis les températures chaudes sont les plus efficaces lors de la levée de la phase d'écodormance et de désendurcissement.

Ainsi, les déterminants environnementaux sont les mêmes pour ces deux processus. Il est décrit par de nombreux auteurs comme une interdépendance entre la dynamique du cycle annuel de développement et la capacité à s'acclimater au gel (Weiser, 1970 ; Druart *et al.*, 2007, Ruttink *et al.*, 2007). Par exemple, un arrêt de croissance est nécessaire à l'entrée en dormance et à l'initiation de l'endurcissement (Sakai & Weiser, 1970). De plus, on observe dans les bourgeons dormant des mécanismes physiologiques proches de ceux impliqués dans l'endurcissement (diminution de l'humidité pondérale (Faust *et al.*, 1991), augmentation de l'insaturation des acides gras (Wang & Faust, 1990)).

Certains auteurs recommandent même la synchronisation entre cycle annuel de développement et résistance au gel pour la modélisation de son évolution (Fuchigami *et al.*, 1982 ; Leinonen *et al.*, 1996). Or, parmi les différents génotypes étudiés, on observe des variations phénotypiques en ce qui concerne la précocité de débourrement. Ainsi, dans un même verger, des différences de date de débourrement entre variétés de noyer fruitiers ou au sein d'une descendance de noyer hybride à bois montre des décalages de plus d'un mois. Dans ces conditions comment peut-on expliquer les différences de dates de débourrement que l'on observe pour différentes variétés ? Sont-elles dues à une sensibilité différente aux basses températures selon les génotypes dans la phase d'endurcissement ? Sont-elles dues au contraire à une sensibilité différente aux températures douces dans la période de désendurcissement ? Où est-ce que les deux phases interviennent pour expliquer cette différence finale de date de débourrement selon les variétés ? Quels traits communs peut-on trouver dans l'évolution de ces deux dynamiques (dormance et résistance au gel) ?

Pour cela, nous avons mesuré les durées d'exposition au froid nécessaires pour lever l'endodormance ainsi qu'au chaud pour lever l'écodormance. En parallèle, un suivi de la résistance au gel en conditions environnementales contrastées (plaine vs. moyenne montagne) a également été effectué. Nos résultats montrent que malgré de fortes différences en termes de dates de débourrement entre génotypes (les plus précoces débouurant 2 mois avant les plus tardifs) et entre localisations (environ un mois de décalage), les besoins de froid sont similaires entre variétés (aux alentours de 900h de froid à 4°C, à partir du 15 Octobre, Tableau 2.1). Des résultats similaires ont été obtenus par une approche de modélisation chez

Génotypes	Date de débourrement (moyenne ± Ecart-type)			Heure de froid nécessaires pour la levée d'endodormance	DMD une fois l'endodormance levée (heures à 25°C)
	Plaine		Montagne		
	2008	2009	2009		
Serr	117 ± 1.43 ^c	102 ± 0.58 ^d		924	470 ^c
Chandler	115 ± 0.70 ^c	111 ± 0.39 ^{cd}		924	477 ^c
Lara	116 ± 0.16 ^c	117 ± 1.72 ^{bc}	139 ± 3.97 ^b	905	559 ^c
Franquette	126 ± 1.40 ^b	125 ± 1.31 ^b	142 ± 0.44 ^b	905	543 ^c
Hybride P	129 ± 2.41 ^b	128 ± 4.36 ^b	141 ± 2.26 ^b	941	662 ^b
Hybride T	163 ± 4.54 ^a	155 ± 3.80 ^a	154 ± 3.64 ^a	940	791 ^a

Tableau 2.1. Dates de débourrement chez différents génotypes de noyers européens (Chandler, Franquette, Lara et Serr) et hybrides entre noyer européen et américain (précoces (P) et tardifs (T)) exprimés en jours juliens ± écart-type; des lettres différentes indiquent des différences significatives au sein de la même année et site par le teste de Tukey. Dans les deux dernières colonnes sont indiquées les heures de froid nécessaire pour lever l'endodormance et le délai moyen de débourrement (DMD) à 25°C une fois l'endodormance levée.

différentes variétés de noyer (Luedeling *et al.*, 2009). En revanche, de fortes différences ont été caractérisées en terme de besoin de chaleur en période d'écodormance. On observe également une loi d'action de la température, durant cette phase, non linéaire et fortement variable entre génotypes. Les noyers à fruits ont une croissance plus rapide aux températures douces $\geq 15^{\circ}\text{C}$ par rapport aux noyers à bois, ainsi, la différence observée est générée lors de la phase d'écodormance uniquement. Par ailleurs, la divergence entre les hybrides précoces et tardifs semble s'effectuer aux basses températures, en fin d'hiver, et non pas au printemps où la vitesse de croissance est similaire.

Ces deux processus ayant lieu lors de la phase non feuillée (levée de dormance et acclimatation au gel) sont sous les mêmes déterminismes que ce soit durant l'automne, strictement environnemental, ou au printemps où un effet génotypique s'exerce en plus de l'effet environnemental. Ces résultats doivent maintenant nous aider dans la modélisation de l'un ou de l'autre de ces processus.

Pour cela, nous avons considéré que la phase d'endodormance était initiée après une exposition à une photopériode inférieure à 12h pendant 21 jours (Welling *et al.*, 1997), soit, à la latitude des sites expérimentaux, le 15 Octobre. Suite à cela, nous avons sélectionné parmi les nombreux modèles existant dans la littérature (Bidabé, 1967 ; Weinberger, 1967 ; Landsberg, 1974 ; Sarvas, 1974 ; Richardson *et al.*, 1974 ; Fishman *et al.*, 1987 ; Hänninen,

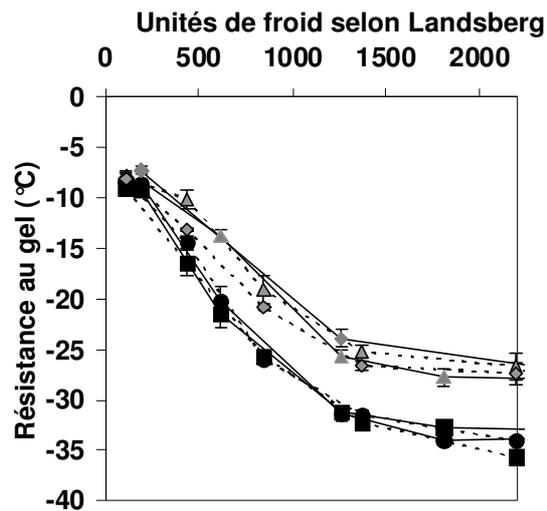


Figure 2.7. Evolution de la résistance au gel de différentes variétés de noyer (Franquette, Lara, Hybride précoce et Hybride Tardif) en plaine (alt: 340m, pointillé) et moyenne montagne (alt: 870m, trait plein) en fonction des unités de froid calculées selon le modèle de Landsberg accumulées à partir du 15 Septembre. Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

1990) celui qui rendait le mieux compte de l'effet environnemental lors de l'automne. Or, lors de la phase d'acclimatation, seules des différences entre génotypes de noyers à bois *vs* noyers à fruit sont observées. De plus, la dynamique d'acclimatation exprimée en fonction de l'accumulation d'unités de froid permet de comparer les deux sites expérimentaux en utilisant le modèle de Landsberg (1974), (Figure 2.7). Ainsi, une fois initiés, endurcissement et levée d'endodormance ne sont contrôlés que par un facteur environnemental, la température dont la loi d'action selon le modèle de Landsberg (1974) permet de rendre compte des différences thermiques entre vergers. Ainsi, la date de sortie d'endodormance est prédite aux alentours du 20 Décembre, ce qui est cohérent avec les observations effectuées par Maugé (1976, 1980), en général entre le 15 Décembre et le 15 Janvier.

En revanche, durant la phase de désacclimatation, des différences significatives sont observées entre génotypes, avec des effets génotypiques, environnementaux qui interagissent. Pour modéliser cette phase, nous avons utilisé les lois de réponse des bourgeons de différentes variétés à la température selon une relation du type $DMD = a + b^{\theta}$ en considérant une articulation séquentielle entre endo- et écodormance. Les dates de débourrement ainsi prédites rendent compte de la variabilité observée entre génotypes (Figure 2.8). Néanmoins, la variabilité inter annuelle ou inter sites semble quant à elle fortement minimisée suggérant que l'action de la température n'est pas exactement celle utilisée, ou qu'un autre facteur reste à prendre en compte. On peut penser par exemple à la photopériode.

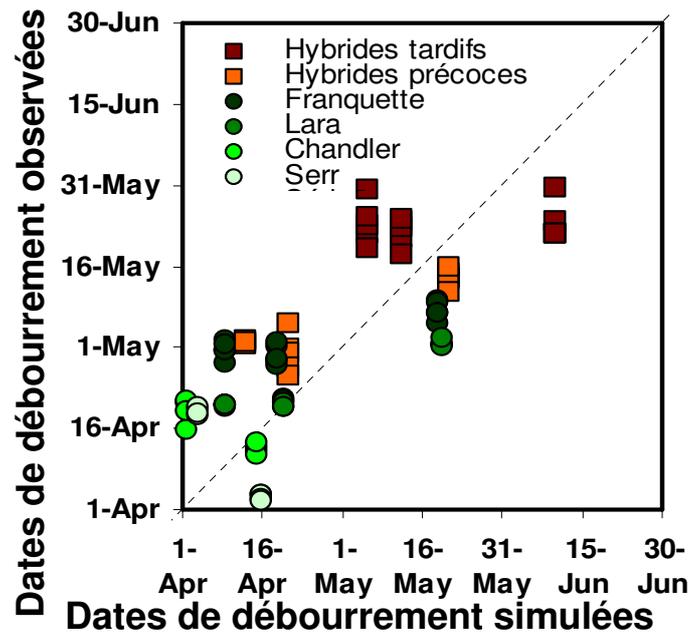


Figure 2.8. Relation entre dates de débourrement simulées et dates observées pour différentes variétés de noyer en plaine et moyenne montagne aux alentours de Clermont-Ferrand.

Variations physiologiques lors de l'acclimatation / désacclimatation

Afin d'augmenter transitoirement leur résistance, les arbres doivent éviter la formation de glace intracellulaire. On observe donc, à l'automne, une déshydratation lors de la phase d'endurcissement (Luoranen *et al.*, 2004), diminuant la quantité totale d'eau et augmentant la concentration en solutés. Ces deux mécanismes permettent d'abaisser le point de congélation et ont été démontrés comme étant les facteurs explicatifs majeurs concernant l'évolution de la résistance au gel chez le noyer (Poirier *et al.*, 2010). Après avoir caractérisé les périodes et organes sensibles, et pour pouvoir modéliser l'évolution de la résistance au gel, il convient donc de caractériser les évolutions de ces deux paramètres physiologiques (eau et solutés) et leurs influences en terme de résistance au gel.

Des parties racinaires jusqu'aux extrémités des rameaux, un gradient d'humidité est observé tout au long de l'hiver. De plus, l'humidité pondérale diminue à l'automne et une réhydratation est observée au printemps. L'humidité pondérale évolue donc rapidement à l'automne et au printemps, lorsque la résistance au gel est encore ou à nouveau faible, mais peu pendant l'hiver, lorsque l'on observe les niveaux d'endurcissement maximum. On observe donc une forte évolution des valeurs de résistance pour une humidité pondérale faible (inférieure à 0,9) et une forte évolution lorsque l'humidité pondérale est supérieure à cette valeur. Ainsi, elle est inversement corrélée à la résistance au gel et bornée entre deux

asymptotes (Figure 2.9). La première correspond à $LT_{50} = -1^{\circ}\text{C}$ ce qui est la température à laquelle une solution extrêmement diluée congèle. La seconde, humidité pondérale = 0,5 correspond à la fraction d'eau liée observée dans le bois, valeur minimale observable chez un arbre vivant. Cette relation semble vraie pour l'ensemble des tissus et organes étudiés, mais est d'autant plus significative dans les organes aériens. Ainsi, la relation est égale à :

$$LT_{50} = \frac{-5,62}{HP - 0,49} - 1,10; R^2 = 0,377$$

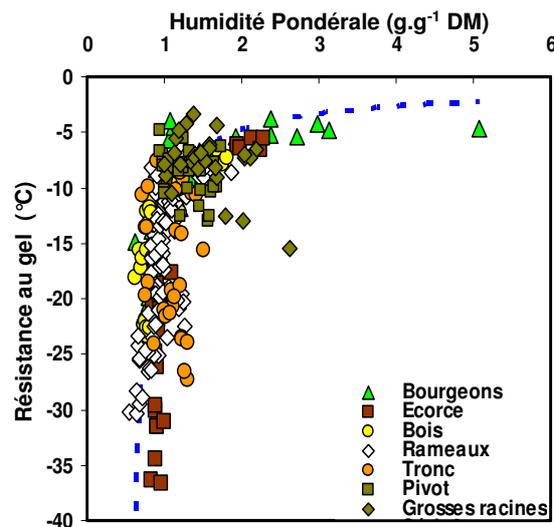


Figure 2.9. Relation entre humidité pondérale et résistance au gel dans différents organes et tissus de Noyer. Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Le contenu en sucres solubles est lui différemment corrélé avec la résistance au gel en fonction de l'organe (Figure 2.10a). Ainsi, dans les parties racinaires, où une augmentation des sucres observée durant l'hiver, aucune variation significative de la résistance au gel n'est observée. Dans les parties aériennes, par contre, une corrélation significative est observée entre contenu en sucres et résistance au gel, comme observé dans de nombreuses études (Siminovitch *et al.* 1953, Kramer & Kozlowski, 1979, Sauter & Ambrosius 1986, Sauter & van Cleve 1994, Améglio *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2004, Morin *et al.* 2007). Or, comme nous venons de le voir, il existe un gradient d'humidité pondérale des racines fines vers les bourgeons. Ainsi, si l'on regroupe les différentes données observées en différentes classes d'humidité pondérale ($<0,75$; $0,75 < <1,00$; $1,00 < <1,25$; $>1,25$), différentes corrélations se dessinent. L'ordonnée à l'origine est similaire (-10°C), mais la pente évolue en fonction des différentes classes. Plus la déshydratation est poussée, plus la pente est négative (Figure 2.10b). Ainsi, plus l'humidité pondérale est faible, plus les sucres solubles exercent un effet cryoprotecteur. Autrement dit, moins il y a d'eau, moins grande sera la quantité de solutés nécessaire afin d'abaisser le point de congélation de manière équivalente.

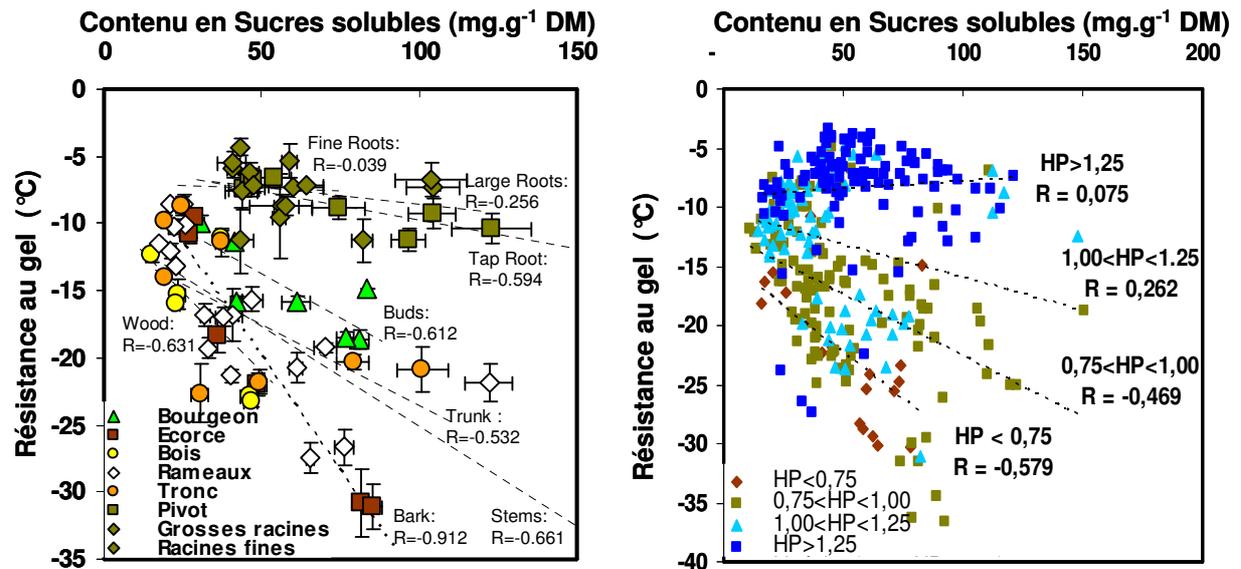


Figure 2.10. Relation entre contenu en sucres solubles et résistance au gel dans différents organes et tissus de noyer en excluant les échantillons prélevés en été (a) ou exprimés selon différentes classes d'humidité pondérale incluant les échantillons prélevés en été (b). Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

Chez de jeunes arbres, on observe une forte hydrolyse des réserves en amidon dans les racines qui est exporté vers les parties aériennes et permet ainsi d'augmenter leur résistance au gel, *cf.* Annexe 2. En revanche, lorsque l'arbre est adulte, les parties aériennes semblent relativement indépendantes des parties racinaires. Ainsi, dans un même arbre, l'effet de différents stress sur des charpentières différentes génère des contenus en sucres et amidon significativement différents et *in fine* une résistance différente (Poirier *et al.*, 2010).

L'ensemble de ces observations effectuées entre différents organes, tissus est corroboré par des observations effectuées sur un rameau unique. Dans le sens longitudinal, des gradients significatifs positifs d'humidité et de sucres solubles sont observés. Mais, malgré ces gradients significatifs, aucune différence significative n'est observée en termes de résistances au gel, le long de ce gradient. Il résulte donc de l'ensemble de ces données que la résistance au gel peut être prédite à partir de ces deux variables physiologiques telle que :

$$LT_{50} = \frac{a}{(b \cdot WC + c)} \cdot \ln(d \cdot GFS + e) + f$$

Cette relation permet également d'intégrer des points prélevés en été (fort contenu en sucres solubles d'origine photosynthétique, mais forte humidité pondérale donc résistance faible au gel) comme le montrent les points apparaissant en rouge sur la figure 2.11.

Ces résultats suggèrent une forte interaction entre sucres solubles et humidité pondérale. Et, afin de comprendre comment cette relation se mettait en place sous l'influence des conditions environnementales, nous avons étudié ces différents aspects sur des arbres en

conditions contrôlées à l'automne, période potentiellement critique pour la survie des arbres comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi à cette période, le processus d'acclimatation se met en place et les parties aériennes se déshydratent progressivement. Selon la littérature et nos observations, deux facteurs semblent être responsables des risques de dommages vis-à-vis du gel : les températures douces et/ou une forte hydratation. Nous avons donc cherché à découpler autant que possible ces deux facteurs en testant différentes combinaisons de températures d'acclimatation et de niveau d'hydratation en fin d'été. De plus ces conditions sont susceptibles de se reproduire dans les climats futurs et il nous est apparu intéressant d'avoir une idée de l'évolution de la résistance au gel dans ces conditions.

Nous avons donc suivi les paramètres physiologiques identifiés préalablement chez de jeunes noyers dans différentes conditions: (i) de températures ($>15^{\circ}\text{C}$, hors-gel et conditions naturelles), (ii) de date et méthode de défoliation (naturelle fin octobre ou artificielle début octobre), cf. Annexe 4.

Le contenu en eau évolue positivement lorsque les températures sont plus élevées (absorption racinaire non inhibée), ou lorsque l'on effectue une défoliation anticipée (déséquilibre introduit dans la balance absorption/évapotranspiration Figure 2.12). Le contenu en sucres solubles évolue indépendamment de la température et, comme l'a décrit Sakai (1966c), sa synthèse peut être déclenchée par des températures basses ($<5^{\circ}\text{C}$) ou douces ($>15^{\circ}\text{C}$). Mais dans des conditions de défoliation précoce, on observe peu (avec des températures basses) ou pas (en conditions de températures douces) de synthèse de sucres solubles (Figure 2.12).

La résistance au gel évolue de manière similaire lors de la défoliation naturelle, et ce, quelque soit la température. Alors qu'en condition de défoliation précoce, on observe dans un

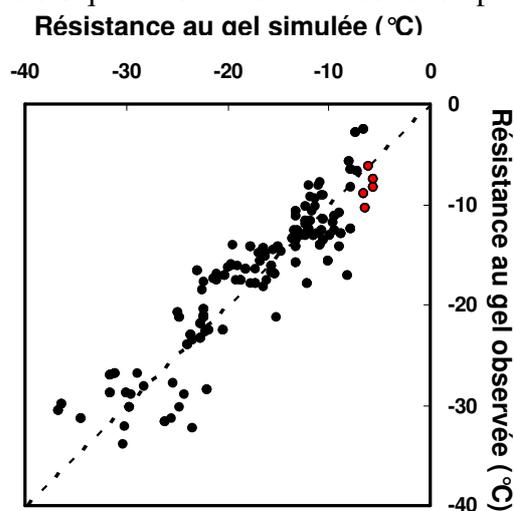


Figure 2.11. Relation entre résistance au gel observée et simulée pour différents tissus des organes aériens de noyer lors de la calibration du modèle de prédiction en fonction de l'humidité pondérale et du contenu en sucres solubles.

cas (basses température) une évolution de cette résistance au gel et dans l'autre (températures >15°C) une très faible évolution de cette résistance (Figure 2.12).

La relation entre température et résistance au gel, une fois sortie du cadre « normal » des dynamiques saisonnière ne montre plus de corrélation. Par contre une forte relation est observée entre contenu en eau minimum et contenu maximal en sucres durant l'hiver (Figure 2.13). Ces résultats suggèrent donc une modulation de la balance carbonée *via* une activation du métabolisme glucidique par l'état d'hydratation -ou plutôt de déshydratation- en automne.

Cette étude a permis de montrer que l'action de la température sur l'acclimatation n'était pas directe, mais s'exerçait par l'intermédiaire de son action sur la physiologie des arbres. Ainsi, la dynamique d'humidité pondérale (même si les conditions ont été, lors de cette expérience, extrêmes) est un facteur particulièrement critique dans l'acquisition d'une résistance au gel en automne. Seule une faible humidité pondérale permet une hydrolyse consécutive de l'amidon et une accumulation de sucres solubles. Cette accumulation de

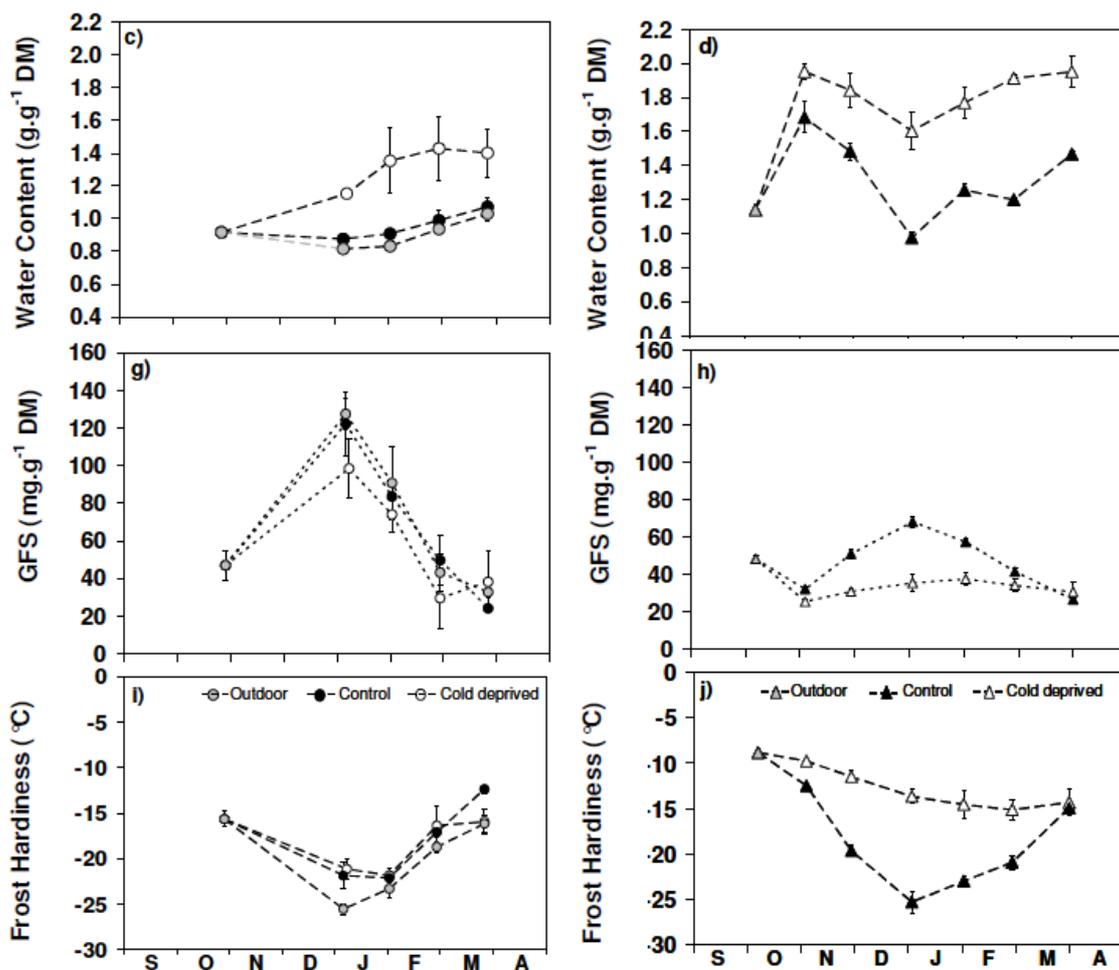


Figure 2.12. Evolution hivernale chez de jeunes noyers en conditions de sénescence naturelle (gauche, cercles) et anticipée (droite, triangles) de l'humidité pondérale (c et d), du contenu en sucres solubles (g et h) et de la résistance au gel (i et j) pour le témoin (noir), en conditions extérieures (gris) et privés de froid (blanc). Les symboles et barres représentent les moyennes et erreurs standard, respectivement, calculés pour 5 échantillons.

sucres solubles ne semble pouvoir s'exercer qu'après une déshydratation. Une hypothèse probable quant à la régulation de cette interaction fait intervenir une phytohormone : l'acide abscissique (ABA). L'ABA intervient dans la régulation de l'expression de gènes induits par des stress abiotiques (Popko *et al.* 2010), par exemple, le stress hydrique, mais aussi par le froid (Chandler & Robertson, 1994 ; Tahtiharju & Palva 2001). Le niveau d'ABA augmenterait après une exposition au froid (Chen *et al.*, 1983 ; Lång *et al.*, 1994). Ainsi, une application d'ABA exogène permet d'augmenter la résistance au gel (Chen & Gusta, 1983 ; Galiba *et al.* 1993 ; Lång *et al.*, 1989 ; Veisz *et al.* 1996; Li *et al.*, 2003c) par l'intermédiaire du métabolisme glucidique (Kerepesi *et al.* 2004). Mais on peut également penser qu'une faible humidité pondérale peut limiter les pertes de carbone par la respiration car quelque soit la température, l'amidon est hydrolysé. Quoiqu'il en soit, ces résultats renforcent l'idée qu'il est nécessaire d'intégrer l'évolution physiologique afin de prédire l'évolution de la résistance au gel dans ces situations extrêmes.

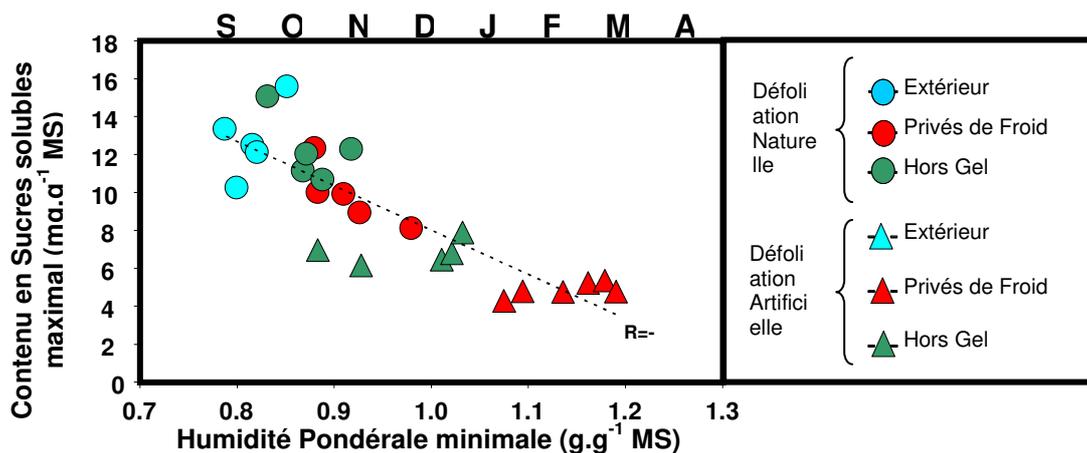


Figure 2.13. Relation entre humidité pondérale minimale et la quantité maximale de sucres solubles observés durant l'hiver pour différents traitements de défoliation ou température chez de jeunes noyers.

Modélisation de l'humidité pondérale

Pour pouvoir modéliser l'évolution de la résistance au gel, il apparaît donc nécessaire de pouvoir prédire l'évolution de l'humidité pondérale et du contenu en sucres solubles, ce dernier nécessitant au préalable une connaissance du niveau d'hydratation comme nous venons de le voir. Pour modéliser l'évolution de l'humidité pondérale (rapport entre la masse d'eau et la masse sèche), nous avons fait l'hypothèse que la masse sèche est constante durant cette période (respiration faible). L'évolution de la quantité d'eau ne dépendra donc que de son évaporation au travers l'écorce et de son absorption par les racines.

La déshydratation observée à l'automne est générée par une diminution de l'absorption en eau par les racines en réponse à la diminution de la température du sol (Kramer & Boyer, 1995). En effet, en conditions de températures douces, une augmentation de l'humidité pondérale est observée (Annexe 4). Les basses températures diminuent la fluidité membranaire et augmentent la viscosité de l'eau (Kramer, 1940 ; Kaufmann, 1975), et, par conséquent l'absorption de l'eau par les cellules des racelles s'en trouve fortement limitée. Une absorption limitée n'est pas le seul facteur expliquant la diminution du contenu en eau, car en hiver, il n'y a plus de transpiration par les feuilles après leur sénescence. Néanmoins, une déshydratation s'exerce encore au niveau de l'écorce diminuant progressivement la quantité d'eau libre dans l'arbre.

Au printemps une réhydratation est observée lorsque la température du sol remonte. Ainsi Améglio *et al.*, (2002) ont déterminé que cette température se situait aux alentours de 8°C. Lorsque la température du sol (à 50cm de profondeur) dépasse cette valeur, on assiste à

$$Ab_i = \frac{a}{1 + e^{b(\theta_{sol} - c)}}$$

une réhydratation importante sous l'effet d'une mise sous pression du xylème dépendante de la concentration en nitrate dans la rhizosphère (Ewers *et al.*, 2001). Ainsi, nous avons considéré que la capacité d'absorption racinaire suivait une loi d'action sigmoïde selon la température du sol à 50cm de profondeur .

L'évaporation par les parties aériennes est dépendante de deux facteurs : la disponibilité en eau et la demande climatique (Mellander *et al.*, 2006). Nous avons donc considéré ce processus comme évoluant de manière linéaire avec un terme croisé en fonction de l'ETP (reflétant la demande climatique Monteith & Unsworth, 1972) et de la quantité d'eau libre présent dans les tissus à la date n-1 :

Nous avons calibré les paramètres par minimisation de la somme des carrés des écarts

$$Tr = d \cdot M_{fw} + e \cdot ETP + f \cdot M_{fw} \cdot ETP + g$$

en utilisant des données indépendantes, provenant de suivi de noyers cv Franquette lors de quatre hivers différents dans des conditions climatiques similaires à celles de l'étude (trois suivis en plaine, un en moyenne montagne) comprenant n=130 données individuelles.

La relation entre données observées et données simulées montre une bonne prédiction avec un RMSE de l'ordre de 0,16 pour un coefficient de corrélation de 0,6 (figure 2.14). Les fortes humidités pondérales bien que dispersées ne montrent pas de biais significatifs. En revanche pour les faibles valeurs, il semblerait qu'il y ait une difficulté du modèle à prédire des valeurs inférieures à 0,9.

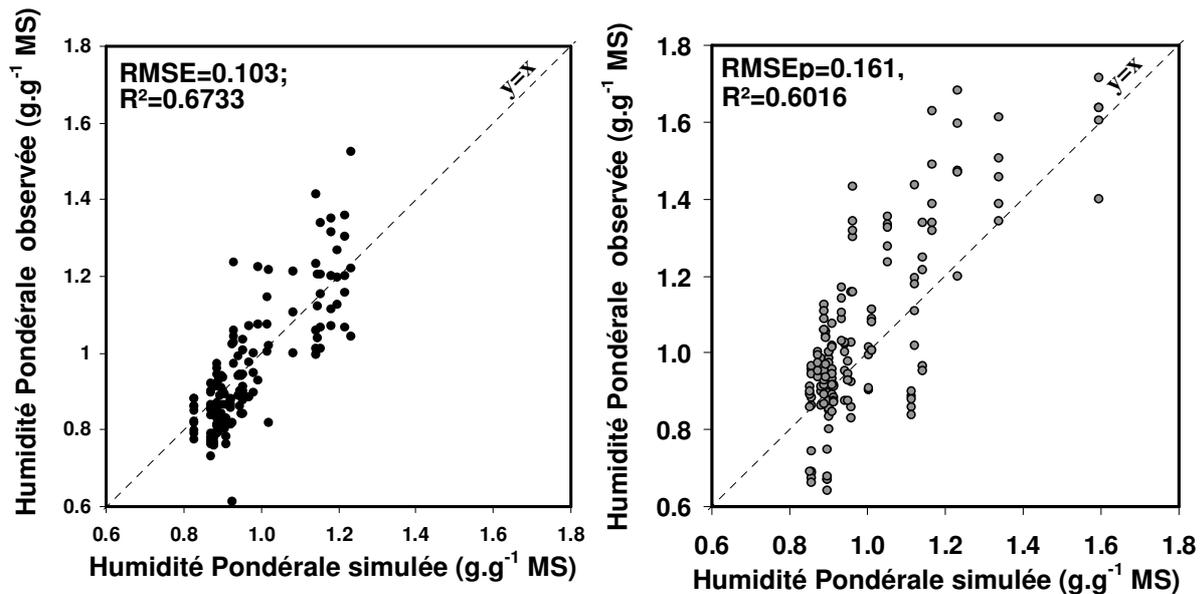


Figure 2.14. Relation entre humidité pondérale observée et humidité pondérale simulée selon le modèle.

En terme de dynamique, les tendances sont prédites à l’automne et au printemps, seule une différence est observée pour le site de moyenne montagne quant aux vitesses de diminution de l’humidité pondérale à l’automne et d’augmentation au printemps, alors que les dynamiques sont beaucoup plus proches en plaine (Figure 2.15). Des différences de composition du sol (se traduisant en terme de réserve utile par exemple), de couverture neigeuse ou de ratio entre la masse de l’appareil racinaire et aérien sont peut être des facteurs explicatifs à caractériser. Une différence importante est également observée pour la valeur minimale observée durant l’hiver en 2008-2009. Ceci est probablement dû à une gamme de

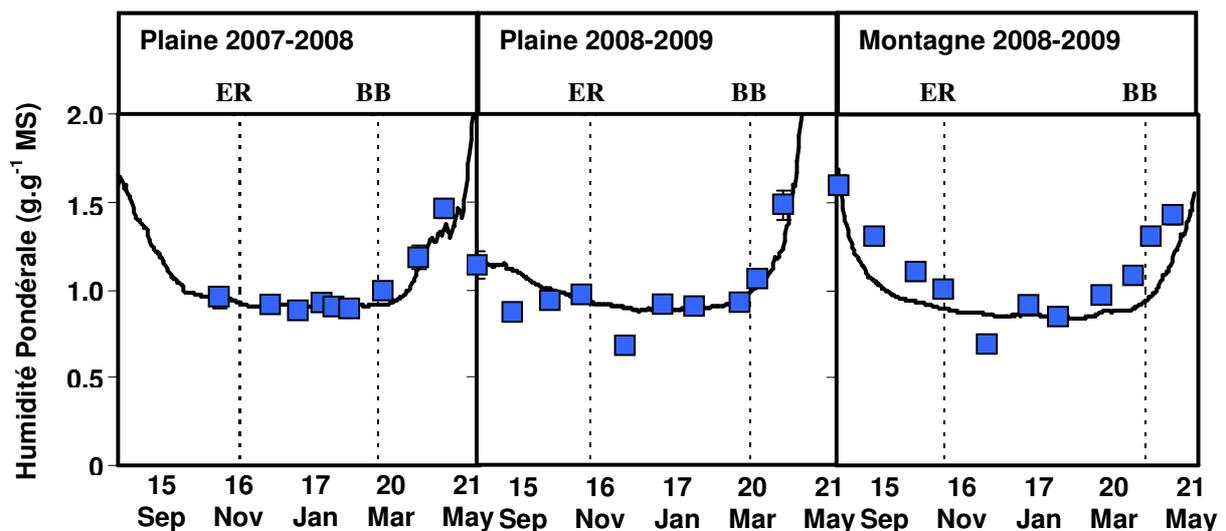


Figure 2.15. Cinétique d’évolution de l’humidité pondérale chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés bleus indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d’endodormance et de débourrement, respectivement.

variation insuffisante dans les données utilisées pour la calibration. Cependant, l'effet engendré sur la simulation de la résistance au gel est faible, car une humidité pondérale inférieure à 1,0 ne contribue pratiquement pas à la résistance selon la conception du modèle.

Modélisation du métabolisme carboné

Pour les sucres solubles, de nombreuses études ont décrit la dynamique des glucides au cours de l'hiver (Siminovitch *et al.*, 1953, Parker, 1959 ; Sauter, 1988 ; Sauter & van Cleve, 1991 ; Witt & Sauter, 1994 ; Lacoïnte *et al.* 1995 ; Sauter & Wellenkamp, 1998 ; Poirier *et al.*, 2010). Ainsi, à l'automne, de l'arrêt de croissance à la sénescence, l'amidon chloroplastique foliaire est hydrolysé et les sucres formés transportés vers les tissus pérennes où il y a re-synthèse d'amidon (Lüttge & Hertel, 2009). Puis, après la sénescence, l'amidon est hydrolysé en sucres solubles : chez le noyer essentiellement glucose et fructose (monosaccharides) et saccharose (disaccharides). La température est un paramètre contrôlant l'expression des enzymes impliquées dans ces réactions métabolique (Kaplan & Guy, 2004 ; Kaplan *et al.*, 2007 ; Guy *et al.* ,2008 ; Ruelland *et al.*, 2009) ainsi que leurs activités catalytique (Witt & Sauter, 1994 ; Elle & Sauter, 2000 ; Schrader & Sauter, 2002).

Généralement, la quantité minimale d'amidon est observée en plein hiver et semble limitée par un seuil d'environ 20 mg.g⁻¹ MS (Améglio, 1991 ; Kajji, 1992 ; Alves, 2003, Decourteix, 2006, Poirier, 2008). En effet, ce n'est qu'en conditions particulièrement froides et longues ou en limitant le niveau initial que l'on observe des valeurs inférieures au cours de l'hiver (Poirier, 2008).

Au printemps, le niveau en sucres solubles diminue et les réserves en amidon sont reformées. Les températures sont, là encore, un des facteurs de contrôle majeur. Enfin, au débourrement, on observe une nouvelle hydrolyse de l'amidon en sucres solubles qui vont pouvoir alimenter la croissance des bourgeons (Sauter & van Cleeve, 1994 ; Sauter & Wellenkamp, 1998).

Ainsi, nous avons considéré l'évolution du métabolisme carboné au travers un modèle simple d'interconversion entre amidon et sucres solubles. La vitesse de la réaction est dépendante de la température et l'on considère que la réaction limitante va déterminer la vitesse globale de conversion de la voie métabolique. L'hydrolyse de l'amidon s'effectue à deux optima thermiques avec une hydrolyse significative à basse et à haute température mais pas aux températures intermédiaires (Sakai, 1966). Les basses températures permettraient une hydrolyse en facilitant l'accessibilité des granules d'amidon aux amylases (Witt & Sauter, 1996 ; Elle & Sauter, 2002). A haute température, la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction

enzymatique, et donc la constante catalytique (k_{cat}), serait augmentée. Puis, selon les variations de facteurs physiologiques, en cohérence avec nos observations (rapportées ici ou fruit des vingt années d'observations sur noyer au sein du laboratoire), les voies d'hydrolyse ou de synthèse sont transitoirement activées.

- A l'automne, tant que l'humidité pondérale reste supérieure à 1,0 : Synthèse d'amidon.
- Puis lorsque l'humidité pondérale devient inférieure à 1,0 : Hydrolyse d'amidon.
- Lorsque le niveau d'amidon devient inférieur aux valeurs minimales observées (environ 20 mg.g^{-1}) : Hydrolyse et synthèse possibles.
- Au printemps, lorsque les bourgeons ont passé un stade critique de développement : Resynthèse d'amidon.
- A l'approche du débourrement : hydrolyse de l'amidon

Ce sous-modèle a été calibré sur les mêmes données que le sous-modèle d'évolution de l'état d'hydratation. Sur la figure 2.16, nous pouvons observer les relations entre données simulées et observées. Cette figure montre que les données ne présentent pas de biais que ce soit sur les données de calibration ou de validation. De plus, l'erreur de prédiction est plus faible sur les données de validation ($RMSE_p=12,1$) que celle de calibration ($RMSE=15,1$), ce qui est quelque peu surprenant. En observant les simulations de dynamique d'évolution des sucres solubles au cours de trois hivers (Figure 2.17), on remarque que le contenu en sucres solubles est mieux simulé en conditions de moyenne montagne qu'en plaine (Figure 2.17).

On observe une plus faible quantité simulée en plaine en 2008-2009 ce qui engendre une sous estimation importante sur la prédiction de la résistance au gel. Néanmoins, les tendances sont bien décrites. Un travail conséquent est encore probablement nécessaire pour

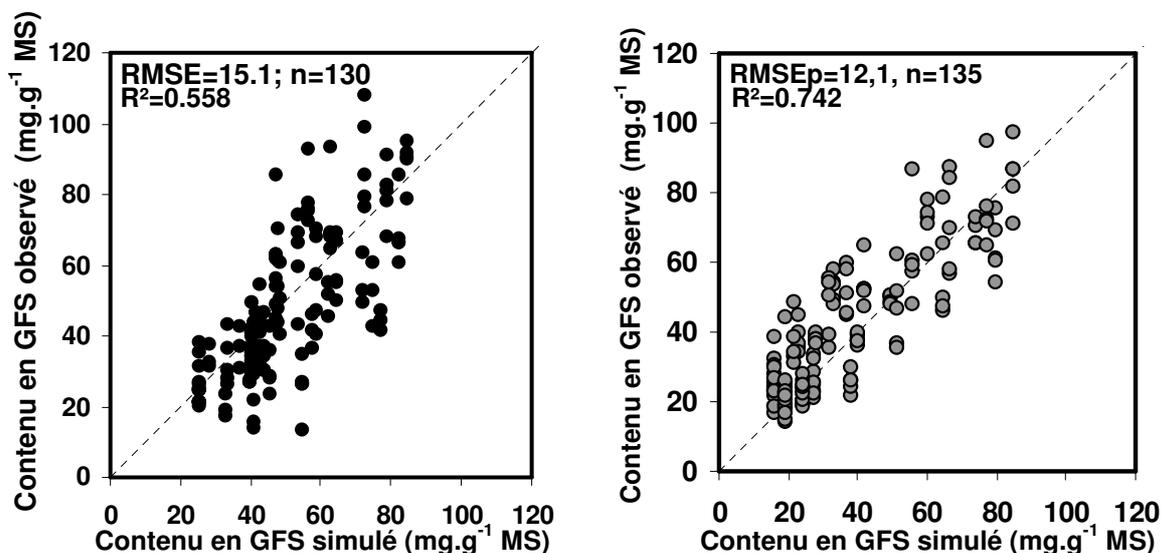


Figure 2.16 Relation entre contenu en sucres solubles observé et simulé selon le modèle.

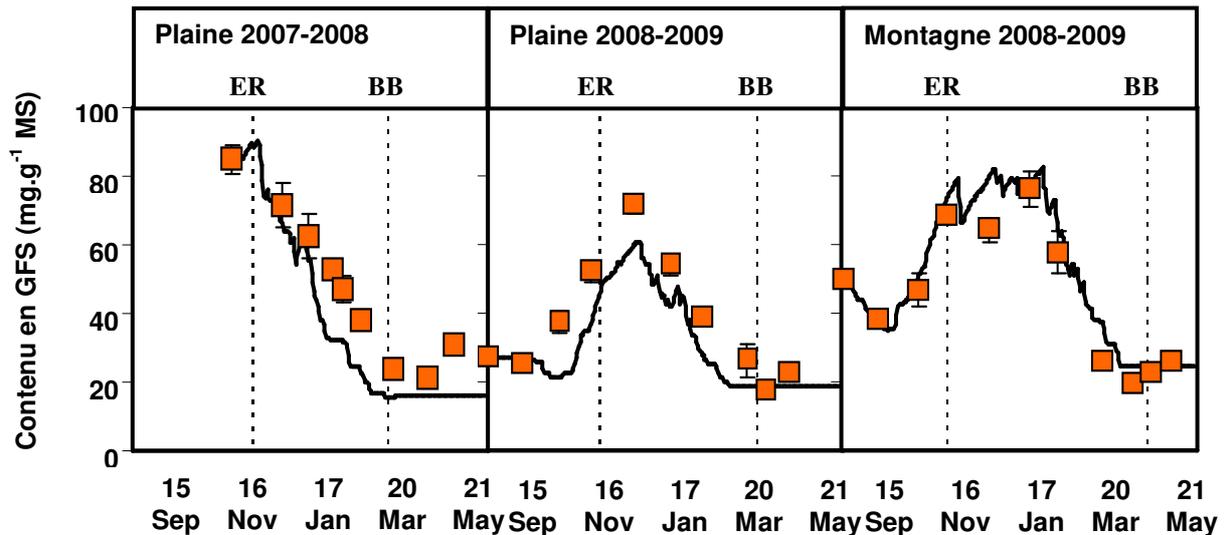


Figure 2.17. Cinétique d'évolution du contenu en sucres solubles chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés orange indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d'endormance et de débourrement, respectivement.

décrire plus finement le métabolisme carboné, car les paramètres utilisés sont nombreux et s'avèrent pour certains extrêmement sensibles. De plus, l'effet non significatif de la respiration sur les données de calibration peut s'avérer être un biais important pour des simulations en conditions environnementales prédites pour le futur, car lors de vagues de chaleur transitoire les pertes de carbone par respiration peuvent être importante, d'autant plus si elles sont associées à une humidité pondérale importante.

Prédiction de la vulnérabilité au gel

Le modèle élaboré est donc composé de trois sous-modèles modélisant différents processus. Ces sous-modèles interagissent et permettent de prédire la résistance au gel. Le pas de temps utilisé est journalier. Son architecture, les différentes interactions et les variables utilisées sont montrées sur la figure 2.18 :

Cycle annuel de développement, modélisant :

- Endormance
- Éclosion
- État d'hydratation
- Absorption racinaire
- Évaporation
- Métabolisme carboné
 - Hydrolyse de l'amidon
 - Synthèse de l'amidon

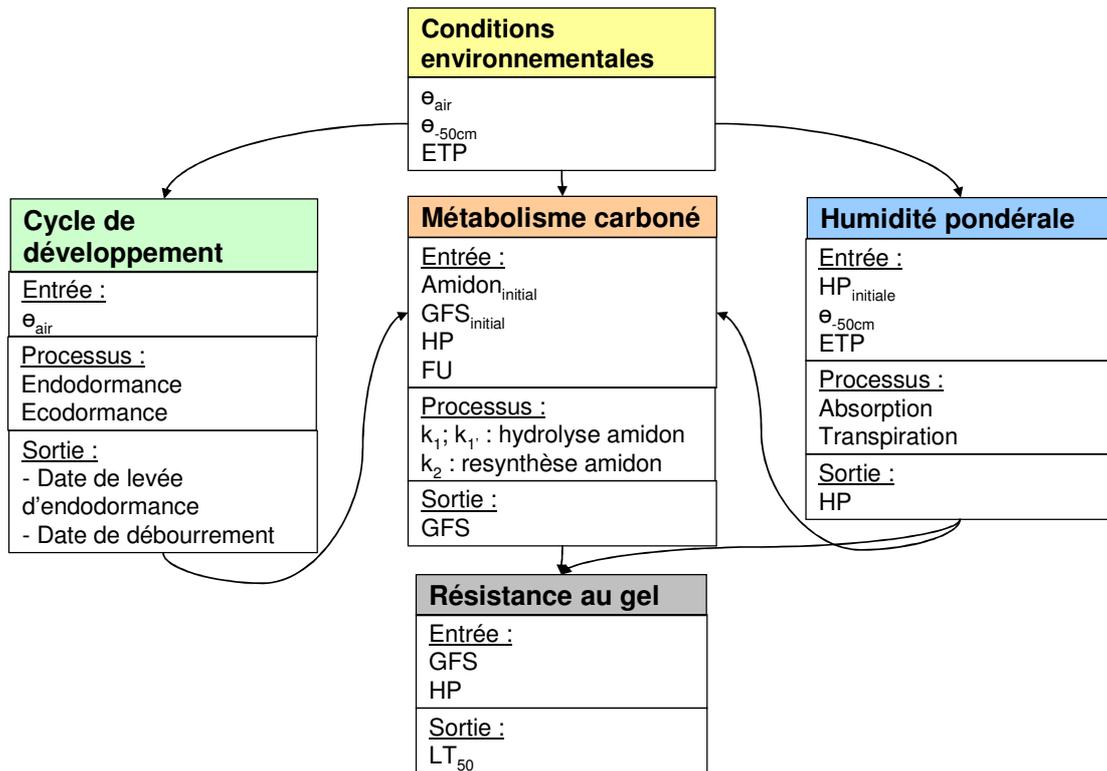


Figure 2.18. Architecture du modèle.

La résistance au gel est ainsi relativement bien prédite (Figure 2.19) avec une précision de l'ordre de 4°C. De plus, aucun biais n'est observé ($R^2=0,72$). En observant la cinétique dans le détail, on observe sur la cinétique une dynamique rendant fidèlement compte de l'acclimatation et de la désacclimatation. De plus, les écarts entre valeurs prédites et observées peuvent être essentiellement attribués au sous modèle métabolisme carboné. En effet, la trop rapide diminution en plaine en 2007-2008 et les trop faibles quantités de sucres solubles ne plein hiver en plaine en 2008-2009 permettent d'expliquer les différences observées. Ce sous-modèle nécessitera donc d'être observé plus finement par le futur.

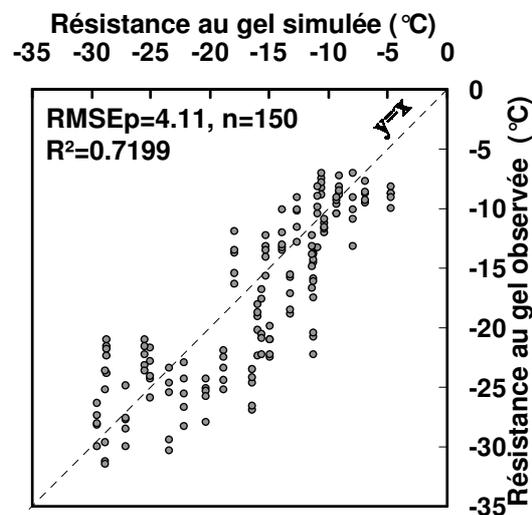


Figure 2.19 Relation entre résistance au gel observée et simulée selon le modèle.

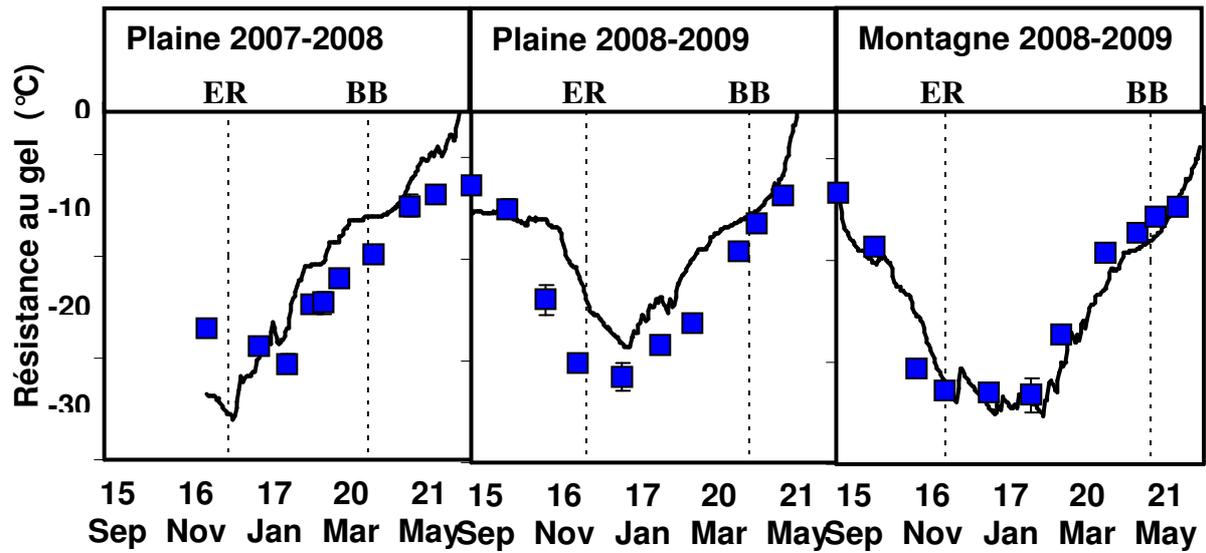


Figure 2.20. Cinétique d'évolution de la résistance au gel chez *J.regia* cv Franquette lors de trois hivers différents (2 en plaine, un en moyenne montagne). Les carrés orange indiquent les valeurs observées, la ligne noire les valeurs simulées. ER et BB indiquent les dates simulées de levée d'endormance et de débourrement, respectivement.

Néanmoins, ce modèle étant encore en cours d'élaboration, sa présentation nous permet de valider les concepts précédemment évoqués, sa version finale nécessitera probablement une calibration sur un jeu de données plus conséquent en terme de gamme de variation de conditions climatiques.

Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, des travaux écophysiologiques ont été menés afin de construire les hypothèses nécessaires à la construction d'un modèle mécaniste de prédiction de la résistance au gel. Il a été montré qu'il était nécessaire de prendre en compte la physiologie des arbres afin de prédire l'évolution de l'acclimatation en conditions extrêmes, conditions qui peuvent devenir plus fréquentes avec les changements globaux. Ce modèle n'est actuellement paramétré que pour une variété de noyer *J. regia* cv Franquette mais il peut dès à présent être appliqué à des scénarii climatiques futurs.

Ce travail a donc permis de construire différents sous-modèles qui s'articulent pour prédire la vulnérabilité au gel en intégrant le cycle de développement et les variations physiologiques de l'acclimatation :

- Cycle annuel de développement

Les deux processus de levée de dormance (endodormance et écodormance) sont modélisés de façon séquentielle. La levée d'endodormance est sous le contrôle de facteurs environnementaux uniquement chez les différents géotypes de noyer étudiés. L'effet des températures froides tel qu'il est prédit par le modèle de Landsberg permet également d'expliquer les différences inter-sites. En phase d'écodormance, la croissance des bourgeons suit une fonction non linéaire en fonction de la température.

- Humidité pondérale

L'humidité pondérale évolue en fonction de la température du sol (à travers un effet sur l'absorption de l'eau par l'appareil racinaire) et de la demande climatique (ETP).

- Métabolisme carboné

Le contenu en sucres solubles évolue en fonction de la température et de l'humidité pondérale. Une déshydratation préalable semble nécessaire pour observer une accumulation de sucres solubles durant l'hiver.

- Résistance au gel

L'humidité pondérale et le contenu en sucres solubles sont des facteurs causaux de l'acquisition d'une résistance au gel. Et alors que la résistance au gel semble directement dépendante de l'humidité pondérale, la relation entre résistance au gel et contenu en sucres solubles est modulée par l'humidité pondérale.

Ce modèle n'est calibré à l'heure actuelle que pour une variété de noyer (*J.regia* cv Franquette) mais les résultats obtenus permettent d'envisager son utilisation dans des conditions plus large. Tout d'abord, pour cette variété Franquette, une spatialisation des conditions optimales de développement peut être envisagée sur ce critère d'évitement des risques de gel. Son application pour d'autres variétés, sous réserve de compléter le paramétrage, permettrait une sélection des géotypes de noyer intéressant en adéquation avec les aires de répartition potentiellement favorable aux différents cultivars en terme de croissance et d'évitement des risques de gel.

Ensuite, nous avons vu qu'il y avait une relation entre précocité de débourrement, vitesse de désendurcissement et physiologie, i.e. resynthèse de l'amidon au printemps, réhydratation des parties aériennes sous l'effet de la poussée racinaire. Ainsi, la sensibilité à la température est différente entre ces variétés et l'on peut imaginer qu'il existe des marqueurs moléculaires de cette sensibilité qui pourrait s'exprimer sous forme d'une augmentation de l'expression des transcrits des protéines impliquées dans le métabolisme carboné principalement et/ou de leurs activités (isoenzymes?), mais également lié à l'absorption de l'eau par poussée racinaire (Aquaporine ? ATP-ase ? transporteur d'azote ? métabolisme carboné racinaire ?). Ce sujet rentre dans les préoccupations majeures de l'UMR PIAF qui travaille ces questions depuis de longues années au niveau des bourgeons ou des cellules associées aux vaisseaux. On peut donc penser que dans cette direction, la modélisation de la phase de désendurcissement pourrait s'appuyer uniquement sur les variabilités observés pour le métabolisme glucidique et non plus, comme aujourd'hui, sur le cycle de développement.

Plus généralement, nous avons vu que les grands mécanismes permettant de résister au gel étaient relativement bien partagés entre espèces, nous pouvons donc espérer un élargissement de notre modèle mécaniste de résistance au gel à d'autres espèces présentant des intérêts économiques plus partagés, même si le noyer fruitier est aujourd'hui en France, la seule espèce rentable pour les arboriculteurs. Ce travail de généralisation du modèle mécaniste pourrait dans un premier temps s'appuyer sur une étude de détermination du LT_{50} et des concentration en sucres solubles et humidité pondérale afin de tester la généricité de cette approche.

Enfin, pour évaluer les potentialités d'acclimatation à moyen et long terme des arbres, il serait nécessaire d'estimer l'effet de conditions environnementales plus contrastées sur la physiologie de l'arbre, notamment en conditions de stress sub-létaux cumulés. Pour cela, le couplage avec des modèles simulant la biologie estivale et surtout les niveaux de réserve ou l'état d'hydratation à l'entrée de l'automne, serait nécessaire.

Tout était changé. L'air lui-même. Au lieu des bourrasques sèches et brutales qui m'accueillaient jadis, soufflait une brise souple chargée d'odeurs. Un bruit semblable à celui de l'eau venait des hauteurs : c'était celui du vent dans les forêts. Enfin, chose plus étonnante, j'entendis le vrai bruit de l'eau coulant dans un bassin. Je vis qu'on avait fait une fontaine, qu'elle était abondante et, ce qui me toucha le plus, on avait planté près d'elle un tilleul qui pouvait déjà avoir dans les quatre ans, déjà gras, symbole incontestable d'une résurrection.

L'homme qui plantait des arbres, Jean Giono

Références Bibliographiques

- Acker, J.P., J.A.W. Elliott and L.E. McGann 2001. Intercellular ice propagation: Experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophysical Journal*. 81:1389-1397.
- Acker, J.P. and L.E. McGann 1998. The role of cell-cell contact on intracellular ice formation. *Cryo-Letters*. 19:367-374.
- Aitken, S.N., W.T. Adams, N. Schermann and L.H. Fuchigami 1996. Family variation for fall cold hardiness in two Washington populations of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Mirb.) Franco). *Forest Ecology and Management*. 80:187-195.
- Alden, J. and R. Hermann 1971. Aspects of the cold-hardiness mechanism in plants. *The Botanical Review*. 37:37-142.
- Alekhina, N.D., E.D. Shirshova and S.S. Andreenko 1975. Glutamine synthetase activity in corn roots grown at different temperatures in the rhizosphere. *Biol Nauki* 18:103-106.
- Alekhina, N.D. and S.A. Sokolova 1974. Change of the isozyme composition of glutamate dehydrogenase in connection with the growing temperature of plants. *Dokl Akad Nauk SSSR Ser Biol* 216:682-685.
- Alves, G. 2003. Les cellules associées aux vaisseaux (CAVs) chez *Juglans regia* : étude de l'ATPase-H⁺ du plasmalemme. In Directeur de thèse : G. Pétel, p. 202 + annexes.
- Ameglio, T., C. Bodet, A. Lacoite and H. Cochard 2002. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology*. 22:1211-1220.
- Ameglio, T., H. Cochard and F.W. Ewers 2001b. Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. *Journal of Experimental Botany*. 52:2135-2142.
- Ameglio, T. and P. Cruiziat 1992. Alternance tension/pression de la sève dans le xylème chez le noyer pendant l'hiver. Rôle des températures. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III: Sciences de la Vie*. 315:429-435.
- Ameglio, T. and P. Cruiziat 1992. Tension Pressure Alternation in Walnut Xylem Sap During Winter - the Role of Winter Temperature. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*. 315:429-435.
- Ameglio, T., P. Cruiziat and S. Beraud 1995. Alternance tension/pression de la sève dans le xylème chez le noyer pendant l'hiver. Conséquences sur la conductance hydraulique des rameaux. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III: Sciences de la Vie*. 318:351-357.
- Ameglio, T., M. Decourteix, G. Alves, V. Valentin, S. Sakr, J.L. Julien, G. Petel, A. Guilliot and A. Lacoite 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees : evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology*. 24:785-793.
- Ameglio, T., F.W. Ewers, H. Cochard, M. Martignac, M. Vandame, C. Bodet and P. Cruiziat 2001a. Winter stem xylem pressure in walnut trees: effects of carbohydrates, cooling and freezing. *Tree Physiology*. 21:387-394.
- Ameglio, T., A. Guilliot, A. Lacoite, J.L. Julien, G. Alves, V. Valentin and G. Petel 2000. Water relations in winter. Effect on bud break of walnut tree. In *Dormancy in plants* Ed. C.J. Viemont J.D. CAB, Farnham Royal, pp. 109-120.
- Ameglio, T., A. Kajji, P. Cruiziat, A. Lacoite and F.A. Daudet 1991. The role of winter temperature in the water status of walnut tree : tension/pressure. *Naturalia monspeliensia*:558-559.
- Ameglio, T., J. Morizet, P. Cruiziat and M. Martignac 1990. The effects of root temperature on water flux, potential and root resistance in sunflower. *Agronomie*. 10:331-340.
- Andergassen, S. and H. Bauer 2002. Frost hardiness in the juvenile and adult life phase of ivy (*Hedera helix* L.). *Plant Ecology*. 161:207-213.
- Anderson, G. 1944. Gas change and frost hardening studies in winter cereals. *Hakan Ohlssons Bocktryckeri, Lund*. 163pp p.
- Anderson, J.V., R.W. Gesch, Y. Jia, W.S. Chao and D.P. Horvath 2005. Seasonal shifts in dormancy status, carbohydrate metabolism, and related gene expression in crown buds of leafy spurge. *Plant Cell and Environment*. 28:1567-1578.
- Andersson, A., J. Keskitalo, A. Sjodin, R. Bhalerao, F. Sterky, K. Wissel, K. Tandere, H. Aspeborg, R. Moyle, Y. Ohmiya, R. Bhalerao, A. Brunner, P. Gustafsson, J. Karlsson, J. Lundeberg, O. Nilsson, G. Sandberg, S. Strauss, B. Sundberg, M. Uhlen, S. Jansson and P. Nilsson 2004. A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biology*. 5
- Andrews, P.K. and E. Proebsting 1985. The freezing properties and injury of sweet cherry (*Prunus avium* L.) and peach (*Prunus persica* L. Batsch) floral tissues. . In *Dep. Hortic. Landscape Architect. Washington State Univ, Pullman*.
- Anisko, T. and O.M. Lindstrom 1996. Cold hardiness and water relations parameters in *Rhododendron cv Catawbiense* Boursault subjected to drought episodes. *Physiologia Plantarum*. 98:147-155.
- Ap Rees, T., W.A. Fuller and J.H. Green 1981. Extremely High Activities of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Thermogenic Tissues of Araceae. *Planta*. 152:79-86.
- Aronsson, A. 1975. Influence of photo- and thermoperiod on the initial stages of frost hardening and dehardening of phytotron-grown seedlings of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Studia for. Suecica*:20 pp.
- Arrhenius, S.A. 1889. On the reaction velocity of the inversion of cane sugar by acids
- Artus, N.N., M. Uemura, P.L. Steponkus, S.J. Gilmour, C.T. Lin and M.F. Thomashow 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:13404-13409.
- Asahina, E. 1956. The freezing process of plant cell. *Contrib. Inst. Low Temp. Sci. Hokkaido Univ* 10:83-126.
- Asahina, E. 1962. Frost Injury in Living Cells. *Nature*. 196:445-446.
- Asahina, E. 1967. Freezing injury in egg cells of the sea urchin. In *Cellular injury and resistance in freezing organisms* Ed. E. Asahina. *Inst. Low Temp. Sci. Hokkaido Univ, Sapporo*, pp. 211-230.
- Ashworth, E.N. 1982. Properties of peach flower buds which facilitate supercooling. *Plant Physiology*. 70:1475-1479.
- Ashworth, E.N. 1984. Xylem development in *Prunus* flower buds and the relationship to deep supercooling. *Plant Physiology*. 74:862-865.
- Ashworth, E.N. 1990. The Formation and Distribution of Ice within *Forsythia* Flower Buds. *Plant Physiology*. 92:718-725.
- Ashworth, E.N. 1992. Formation and spread of ice in plant tissues. *Horticultural Reviews*. 13:215-255.
- Ashworth, E.N., G.A. Davis and J.A. Anderson 1985. Factors affecting ice nucleation in plant tissues. *Plant Physiology*. 79:1033-1037.
- Ashworth, E.N., G.A. Davis and M.E. Wisniewski 1989. The formation and distribution of ice within dormant and deacclimated peach flower buds. *Plant, Cell and Environment*. 12:521-528.
- Ashworth, E.N., P. Echlin, R.S. Pearce and T.L. Hayes 1988. Ice formation and tissue response in apple twigs. *Plant, Cell and Environment*. 11:703-710.
- Ashworth, E.N., T.J. Willard and S.R. Malone 1992. The Relationship between Vascular Differentiation and the Distribution of Ice within *Forsythia* Flower Buds. *Plant Cell and Environment*. 15:607-612.
- Ashworth, E.N. and M.E. Wisniewski 1991. Response of Fruit Tree Tissues to Freezing Temperatures. *Hortscience*. 26:501-504.
- B., C. 1991. Recherche de propriétés intrinsèques du bois pouvant expliquer la sensibilité à la gélivure de *Quercus petraea* (Liebl) et *Q. robur* (L). *Ann Sci For*. 48:453-468.
- B., S., D. M., G.d.C. I., B. N. and R. D. 2004. Le réchauffement climatique récent : impact sur les arbres fruitiers et la vigne. *France Changement global*. 16:50-54.
- Badeau, V., J.L. Dupouey, C. Cluzeau, J. Drapier and C. Le Bas 2004. Rapport final du projet CARBOFOR: Tache D1 Modélisation et cartographie de l'aire climatique potentielle des grandes essences forestières françaises.

Références Bibliographiques

- Baker, S.S., K.S. Wilhelm and M.F. Thomashow 1994. The 5'-Region of Arabidopsis-Thaliana Cor15a Has Cis-Acting Elements That Confer Cold-Regulated, Drought-Regulated and Aba-Regulated Gene-Expression. *Plant Molecular Biology*. 24:701-713.
- Bakkenes, M., J.R.M. Alkemade, F. Ihle, R. Leemans and J.B. Latour 2002. Assessing effects of forecasted climate change on the diversity and distribution of European higher plants for 2050. *Global Change Biology*. 8:390-407.
- Balandier, P., M. Bonhomme, R. Rageau, F. Capitan and E. Parisot 1993. Leaf Bud Endodormancy Release in Peach-Trees - Evaluation of Temperature Models in Temperate and Tropical Climates. *Agricultural and Forest Meteorology*. 67:95-113.
- Bauch, J., P. Klein, A. Fruhwald and H. Brill 1979. Alterations of Wood Characteristics in Abies-Alba Mill Due to Fir-Dying and Considerations Concerning Its Origin. *European Journal of Forest Pathology*. 9:321-331.
- Beaubien, E.G. and H.J. Freeland 2000. Spring phenology trends in Alberta, Canada: links to ocean temperature. *International Journal of Biometeorology*. 44:53-59.
- Beck, E. 1986. Cold tolerance in tropical alpine plants. In *Tropical Alpine Environments: Plants Form and Function* Eds. P.W. Rundel, A.P. Smith and F.C. Meinzer. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 77-110.
- Beck, E.H., R. Heim and J. Hansen 2004. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of Biosciences*. 29:449-459.
- Benson, E.E. and D. Bremner 2004. Oxidative Stress in the frozen plants: A free radical point of view. In *Life in the Frozen State* Eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 205-241.
- Berger, W.K. and B. Uhrík 1996. Freeze-induced shrinkage of individual cells and cell-to-cell propagation of intracellular ice in cell chains from salivary glands. *Experientia*. 52:843-850.
- Bertrand, A., G. Robitaille, Y. Castonguay, P. Nadeau and R. Boutin 1997. Changes in ABA and gene expression in cold-acclimated sugar maple. *Tree Physiology*. 17:31-37.
- Bervaes, J., D.O. Ketchie and P.J.C. Kuiper 1978. Cold Hardiness of Pine Needles and Apple Bark as Affected by Alteration of Day Length and Temperature. *Physiologia Plantarum*. 44:365-368.
- Bhalerao, R., J. Keskitalo, F. Sterky, R. Erlandsson, H. Björkbacka, S.J. Birve, J. Karlsson, P. Gardestrom, P. Gustafsson, J. Lundeberg and S. Jansson 2003. Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology*. 131:430-442.
- Bidabe, B. 1967. Action de la température sur l'évolution des bourgeons de pommier et comparaison de méthodes de contrôle de l'époque de floraison. *Annales de Physiologie végétale*:65-86.
- Biebl, R. 1962. Protoplasmatische Ökologie der pflanzen. *Wasser und Temperatur*. Springer-Verlag, Wien. 344pp. p.
- Bigras, F.J. and S.J. Colombo 2001. *Conifer Cold Hardiness*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 596pp. p.
- Billings, W.D. and H.A. Mooney 1968. The ecology of arctic and alpine plants. *Biological Reviews*. 43:481-529.
- Binet, M.N., C. Humbert, D. Lecourieux, M. Vantard and A. Pugin 2001. Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiology*. 125:564-572.
- Bird, C.J. and J. McLachlan 1974. Cold-hardiness of zygotes and embryos of Fucus (Phaeophyceae, Fuciales)*. *Phycologia*. 13:215-225.
- Blok, M.C., L.L.M. Van Deenen and J. De Gier 1976. Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behaviour of phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 433:1-12.
- Bogdanov, P. 1935. Photoperiodism in species of woody plants. *Preliminary Contribution*. . *Exp. Sta. Rec.* . 73:22.
- Bohlenius, H., T. Huang, L. Charbonnel-Campaa, A.M. Brunner, S. Jansson, S.H. Strauss and O. Nilsson 2006. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*. 312:1040-1043.
- Bootsma, A. 1976. Estimating Minimum Temperature and Climatological Freeze Risk in Hilly Terrain. *Agricultural Meteorology*. 16:425-443.
- Boysen-Jensen, P. 1932. *Die Stoffproduktion der pflanzen*. Jena.
- Braun, H.J. 1984. The significance of the accessory tissues of the hydrosystem for osmotic water shifting as the second principle of water ascent, with some thoughts concerning the evolution of trees. *IAWA Bulletin*. 5:275-294.
- Breen, A.P. and J.A. Murphy 1995. Reactions of Oxyl Radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*. 18:1033-1077.
- Brisson, N., B. Mary, D. Ripoche, M.H. Jeuffroy, F. Ruget, B. Nicoullaud, P. Gate, F. Devienne-Barret, R. Antonioletti, C. Durr, G. Richard, N. Beaudoin, S. Recous, X. Tayot, D. Plenet, P. Cellier, J.M. Machet, J.M. Meynard and R. Delecolle 1998. STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. *Agronomie*. 18:311-346.
- Brockmann-Jerosch, H. 1919. Baumgrenze und Klimacharakter. *Beiträge zur Geobotanischen Landesaufnahme der Schweiz*. 6:1-255.
- Browse, J. and B.M. Lange 2004. Counting the cost of a cold-blooded life: Metabolomics of cold acclimation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:14996-14997.
- Brush, R.A., M. Griffith and A. Mlynarz 1994. Characterization and Quantification of Intrinsic Ice Nucleators in Winter Rye (*Secale Cereale*) Leaves. *Plant Physiology*. 104:725-735.
- Bryant, G., K.L. Koster and J. Wolfe 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research*. 11:17-25.
- Buchanan, D.W., R.H. Biggs and J.F. Bartholic 1974. Cold hardiness of peach and nectarine trees growing at 29-30°N latitude. . *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 99:256-259.
- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page and D. Pink 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*. 1:3-22.
- Burke, M.J., L.V. Gusta, H.A. Quamme, C.J. Weiser and P.H. Li 1976. Freezing and Injury in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 27:507-528.
- Büsgen, M. and E. Münch 1913. *The structure and life in forest trees* Wiley, New York. 104 p.
- Bush, D.S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology*. 46:95-122.
- Byrne, D.H. 1986. Mechanisms of spring freeze injury avoidance in peach. *Hortscience*. 21:1235-1236.
- Calme, S., F.J. Bigras, H.A. Margolis and C. Hebert 1994. Frost tolerance and bud dormancy of container-grown yellow birch, red oak and sugar maple seedlings. *Tree Physiology*. 14:1313-1325.
- Campbell, S.A. and T.J. Close 1997. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist*. 137:61-74.
- Cannell, M.G.R. 1984. Spring Frost Damage on Young Picea-Sitchensis .1. Occurrence of Damaging Frosts in Scotland Compared with Western North-America. *Forestry*. 57:159-175.
- Cannell, M.G.R., M.B. Murray and L.J. Sheppard 1985a. Frost avoidance by selection for late budburst in Picea sitchensis. *Journal of applied Ecology*. 22:931-941.
- Cannell, M.G.R., L.J. Sheppard, R.I. Smith and M.B. Murray 1985b. Autumn frost damage on young Picea sitchensis 2. Shoot frost hardening, and the probability of frost damage in Scotland. *Forestry*. 58:145-166.
- Cannell, M.G.R. and R.I. Smith 1983. Thermal time, chill days and prediction of budburst in Picea sitchensis. *Journal of applied Ecology*. 20:951-963.
- Cannell, M.G.R. and R.I. Smith 1984. Spring Frost Damage on Young Picea-Sitchensis .2. Predicted Dates of Budburst and Probability of Frost Damage. *Forestry*. 57:177-197.
- Cannell, M.G.R. and R.I. Smith 1986. Climatic warming, spring budburst and frost damage on trees. *Journal of applied Ecology*. 23:177-191.
- Cavender-Bares, J. 2005. Impacts of Freezing on Long-Distance Transport in Woody Plants, pp. 401-423.
- Cavender-Bares, J., P. Cortes, S. Rambal, R. Joffre, B. Miles and A. Rocheteau 2005. Summer and winter sensitivity of leaves and xylem to minimum freezing temperatures: a comparison of co-occurring Mediterranean oaks that differ in leaf lifespan. *New Phytologist*. 168:597-611.
- Cen, Y.P. and R.F. Sage 2005. The regulation of rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO2 partial pressure in sweet potato. *Plant Physiology*. 139:979-990.
- Chambers, R. and H.P. Hale 1932. The Formation of Ice in Protoplasm. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*. 110:336-352.

Références Bibliographiques

- Champagnat, P. 1989. Rest and activity in vegetative buds of trees. *Annales des Sciences forestières*. 46:9s-26s.
- Champagnat, P. 1992. Dormance des bourgeons chez les végétaux ligneux. In *Les végétaux et le froid* Ed. C. D. Hermann, Paris, pp. 203-262.
- Chandler, P.M. and M. Robertson 1994. Gene-Expression Regulated by Abscisic-Acid and Its Relation to Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45:113-141.
- Chandler, W.H. 1913. The killing of plant tissue by low temperature. *Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bull.* 8:1-171.
- Chandler, W.H. 1954. Cold resistance in horticultural plants: a review. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 64:552-572.
- Chen, H.H. and P.H. Li 1980a. Biochemical changes in tuber-bearing Solanum species in relation to frost hardiness during cold acclimation. *Plant Physiology*. 66:414-421.
- Chen, H.H. and P.H. Li 1980b. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing Solanum species. *Plant Physiology*. 65:1146-1148.
- Chen, M., J. Chory and C. Fankhauser 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*. 38:87-117.
- Chen, P.M., M.J. Burke and P.H. Li 1976. Frost Hardiness of Several Solanum Species in Relation to Freezing of Water, Melting-Point Depression, and Tissue Water-Content. *Botanical Gazette*. 137:313-317.
- Chen, P.M. and L.V. Gusta 1978. Changes in membrane permeability of winter wheat cells following freeze-thaw injury as determined by nuclear magnetic resonance. *Plant Physiology*. 61:878-882.
- Chen, P.M. and P.H. Li 1977. Induction of Frost Hardiness in Stem Cortical Tissues of Cornus-Stolonifera-Michx by Water Stress 2. *Biochemical Changes*. *Plant Physiology*. 59:240-243.
- Chen, P.M., P.H. Li and M.J. Burke 1977. Induction of frost hardiness in stem cortical tissues of Cornus stolonifera Michx. by water stress. 1. Unfrozen water in cortical tissues and water status in plants and soil. *Plant Physiology*. 59:236-239.
- Chen, S.L., J.K. Li, T.H. Wang, S.S. Wang, A. Polle and A. Huttermann 2002. Osmotic stress and ion-specific effects on xylem abscisic acid and the relevance to salinity tolerance in poplar. *Journal of Plant Growth Regulation*. 21:224-233.
- Chen, T.H.H. and L.V. Gusta 1983. Abscisic Acid-Induced Freezing Resistance in Cultured Plant-Cells. *Plant Physiology*. 73:71-75.
- Chen, T.H.H., L.V. Gusta and D.B. Fowler 1983. Freezing-Injury and Root Development in Winter Cereals. *Plant Physiology*. 73:773-777.
- Chenevard, D., C. Jay Allemand, M. Gendraud and J.S. Frossard 1995. The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization. *Annales des Sciences forestières*. 52:147-156.
- Chinnusamy, V., M. Ohta, S. Kanrar, B.H. Lee, X.H. Hong, M. Agarwal and J.K. Zhu 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development*. 17:1043-1054.
- Choi, H.-i., J.-h. Hong, J.-o. Ha, J.-y. Kang and S.Y. Kim 2000. ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 275:1723-1730.
- Christensen, J.H. and O.B. Christensen 2007. A summary of the PRUDENCE model projections of changes in European climate by the end of this century. *Climatic Change*. 81:7-30.
- Christersson, L. 1978. The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus silvestris* and *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*. 44:288-294.
- Christersson, L. 1985. Frost damage during the growing season. In *Plant production in the north*, Eds. Å. Kaurin, O. Junttila and J. Nilsen. Norwegian Univ. Press, Oslo, pp. 191-198.
- Chuine, I. and E.G. Beaubien 2001. Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecology Letters*. 4:500-510.
- Chuine, I., X. Morin and H. Bugmann 2010. Warming, Photoperiods, and Tree Phenology. *Science*. 329:277-278.
- Cirelli, D., R. Jagels and M.T. Tyree 2008. Toward an improved model of maple sap exudation: the location and role of osmotic barriers in sugar maple, butternut and white birch. *Tree Physiology*. 28:1145-1155.
- Cleland, E.E., I. Chuine, A. Menzel, H.A. Mooney and M.D. Schwartz 2007. Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology & Evolution*. 22:357-365.
- Clements, R.J. and M.M. Ludlow 1977. Frost Avoidance and Frost Resistance in *Centrosema-Virginianum*. *Journal of Applied Ecology*. 14:551-566.
- Close, T.J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 97:795-803.
- Close, T.J. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*. 100:291-296.
- Cochard, H. 2006. Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique*. 7:1018-1026.
- Cochard, H., C. Bodet, T. Ameglio and P. Cruiziat 2000. Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiology*. 124:1191-1202.
- Cochard, H., M. Peiffer, K. Le Gall and A. Granier 1997. Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L. Impacts on water relations. *Journal of Experimental Botany*. 48:655-663.
- Cochard, H. and M.T. Tyree 1990. Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiology*:393-407.
- Côme, D. 1992. *Les végétaux et le froid* Ed. D. Côme, Paris. 600 p.
- Constantinescu, E. 1933. Weitere Beiträge zur Physiologie der Kälteresistenz bei Wintergetreide. *Planta*. 21:304-323.
- Cottignies, A. 1990. Potentiel osmotique et potentiel hydrique du bourgeon terminal de Frêne, au cours du cycle annuel. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III: Sciences de la Vie*. 310:211-216.
- Coutand, C. and B. Moulia 2000. Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany*. 51:1825-1842.
- Couturier, E. 2009. Pli et formes des feuilles. Université Paris Diderot, Paris VII, p. 178.
- Cox, S.E. and C. Stushnoff 2001. Temperature-related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in *Populus tremuloides*. *Canadian Journal of Forest Research*. 31:730-737.
- Crabbe, J. 1994. Dormancy. In *Encyclopedia of agricultural science*. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 597-611.
- Crowe, L.M. 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*. 131:505-513.
- Cruiziat, P., T. Ameglio and H. Cochard 2001. La cavitation: un mécanisme perturbant la circulation de l'eau chez le végétal. *Mec. Ind.* 2:289-298.
- Cruiziat, P., H. Cochard and T. Ameglio 2002. Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science*. 59:723-752.
- Dantuma, G. and J.E. Andrews 1960. Differential response of certain barley and wheat varieties to hardening and freezing during sprouting. *Canadian Journal of Botany*. 38:133-151.
- Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou and F. Sarhan 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*. 10:623-638.
- Davis, S.D., J.S. Sperry and U.G. Hacke 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany*. 86:1367-1372.
- Decourteix, M. 2005. Caractérisations physiologique et moléculaire de transporteurs de saccharose et d'hexoses de xylème de noyer (*Juglans regia* L. cv Franquette): rôles dans les échanges latéraux de sucres pendant la période non-feuillée. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.
- Decourteix, M., G. Alves, N. Brunel, T. Ameglio, A. Guilliot, R. Lemoine, G. Petel and S. Sakr 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant Cell and Environment*. 29:36-47.

Références Bibliographiques

- Delpierre, N., E. Dufrene, K. Soudani, E. Ulrich, S. Cecchini, J. Boe and C. Francois 2009. Modelling interannual and spatial variability of leaf senescence for three deciduous tree species in France. *Agricultural and Forest Meteorology*. 149:938-948.
- Dereuddre, J. and C. Gazeau 1992. Les végétaux et les très basses températures. In *Les végétaux et le froid* Ed. C. D. Hermann, Paris, pp. 107-175.
- Devitt, M.L. and J.P. Stafstrom 1995. Cell-Cycle Regulation During Growth-Dormancy Cycles in Pea Axillary Buds. *Plant Molecular Biology*. 29:255-265.
- Devlin, P.F. and S.A. Kay 2000. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*. 12:2499-2509.
- Dexter, S.T. 1933. Effect of several environmental factors on the hardening of plants. *Plant Physiol.* 8:123-139.
- Dhonukshe, P., A.M. Laxalt, J. Goedhart, T.W.J. Gadella and T. Munnik 2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *Plant Cell*. 15:2666-2679.
- Ding, J.P. and B.G. Pickard 1993. Modulation of Mechanosensitive Calcium-Selective Cation Channels by Temperature. *Plant Journal*. 3:713-720.
- Dixon, H.H. and J. Joly 1894. On the ascent of sap. *Annals of Botany*:468-470.
- Dixon, H.H. and J. Joly 1895. On the ascent of sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 186:563-576.
- Dowgert, M.F. and P.L. Steponkus 1984. Behavior of the Plasma-Membrane of Isolated Protoplasts During a Freeze-Thaw Cycle. *Plant Physiology*. 75:1139-1151.
- Dreyer, E. 1984. Comportement d'un plante perenne soumise a des contraintes hydriques: réponses physiologiques de jeunes noyers à des périodes de sécheresse. Université Clermont II, Clermont-Ferrand.
- Druart, N., A. Johansson, K. Baba, J. Schrader, A. Sjodin, R.R. Bhalerao, L. Resman, J. Trygg, T. Moritz and R.P. Bhalerao 2007. Environmental and hormonal regulation of the activity-dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *Plant Journal*. 50:557-573.
- Dufrene, E., H. Davi, C. Francois, G. le Maire, V. Le Dantec and A. Granier 2005. Modelling carbon and water cycles in a beech forest Part I: Model description and uncertainty analysis on modelled NEE. *Ecological Modelling*. 185:407-436.
- Duman, J.G. and T.M. Olsen 1993. Thermal Hysteresis Protein-Activity in Bacteria, Fungi, and Phylogenetically Diverse Plants. *Cryobiology*. 30:322-328.
- Egerton-Warburton, L.M., R.A. Balsamo and T.J. Close 1997. Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*. 101:545-555.
- Elle, D. and J.J. Sauter 2000. Seasonal changes of activity of a starch granule bound endoamylase and of a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench < robusta >) and their possible regulation by temperature and phytohormones. *Journal of Plant Physiology*. 156:731-740.
- Ellenberg, H. 1963. *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Elliott, J.A.W. 2001. On the complete Kelvin equation. *Chemical Engineering Education*. 35:274-278.
- Enright, J.T. 1982. Sleep Movements of Leaves - in Defense of Darwins Interpretation. *Oecologia*. 54:253-259.
- Ensminger, I., F. Busch and N.P.A. Huner 2006. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. 126:28-44.
- Erez, A. and G.A. Couvillon 1987. Characterization of the influence of moderate temperatures on rest completion in peach. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 112:677-680.
- Erez, A., M. Faust and M.J. Line 1998. Changes in water status in peach buds on induction, development and release from dormancy. *Scientia Horticulturae*. 73:111-123.
- Erez, A., S.Y. Wang and M. Faust 1997. Lipids in peach buds during dormancy, a possible involvement in dormancy control. *Advances in Horticultural Science*. 11:128-132.
- Ericsson, A. 1984. Effects of low temperature and light treatment, following winter cold storage on starch accumulation in Scots pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*. 14:114-118.
- Essiamah, S. and W. Eschrich 1985. Changes of starch content in the storage tissues of deciduous trees during winter and spring. *IAWA Bulletin*:97-106.
- Esterbauer, H., R.J. Schaur and H. Zollner 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11:81-128.
- Esterbauer, H., H. Zollner and R.J. Schaur 1988. Hydroxyalkenals - Cyto-Toxic Products of Lipid-Peroxidation. *Isi Atlas of Science-Biochemistry*. 1:311-317.
- Ewers, F.W., T. Ameglio, H. Cochard, F. Beaujard, M. Martignac, M. Vandame, C. Bodet and P. Cruiziat 2001. Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree Physiology*. 21:1123-1132.
- Farauo, J. and A. Travasset 2007. Phosphatidic acid domains in membranes: Effect of divalent counterions. *Biophysical Journal*. 92:2806-2818.
- Faust, M., D. Liu, M.M. Millard and G.W. Stutte 1991. Bound versus free water in dormant apple buds. A theory for endodormancy. *Hortscience*. 26:887-890.
- Filichkin, S.A., H.D. Priest, S.A. Givan, R.K. Shen, D.W. Bryant, S.E. Fox, W.K. Wong and T.C. Mockler 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*. 20:45-58.
- Finkelstein, A. 1987. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes. Theory and reality. In *Distinguished lecture series of the society of general physiologists*. John Wiley, New York, p. 228 pp.
- Fisher, J.B., G. Angeles, F.W. Ewers and J. LopezPortillo 1997. Survey of root pressure in tropical vines and woody species. *International Journal of Plant Sciences*. 158:44-50.
- Fisher, J.B., G. Goldstein, T.J. Jones and S. Cordell 2007. Wood vessel diameter is related to elevation and genotype in the Hawaiian tree *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *American Journal of Botany*. 94:709-715.
- Fishman, S., A. Erez and G.A. Couvillon 1987. The temperature dependence of dormancy breaking in plants : mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *Journal of theoretical Biology*. 124:473-483.
- Fitter, A.H. and R.K.M. Hay 1987. *Environmental physiology of plants*. Academic Press, London, p. 423 pp.
- Fletcher, N.H. 1970. *Chemical Physics of Ice*. Cambridge University Press, Cambridge. 71 p.
- Flinn, C.L. and E.N. Ashworth 1994. Seasonal changes in ice distribution and xylem development in blueberry flower buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 119:1176-1184.
- Franks, F. 1982. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In *Water: A comprehensive treatise* Ed. F. Franks. Plenum Press, New York.
- Franks, F., S.F. Mathias, P. Galfre, S.D. Webster and D. Brown 1983. Ice Nucleation and Freezing in Undercooled Cells. *Cryobiology*. 20:298-309.
- Fraser, J.W. and J.L. Farrar 1957. Frost hardiness of white spruce and red pine seedlings in relation to soil moisture. *For. Res. Div. Tech. Note* 59 1-5.
- Freyman, S. and V.C. Brink 1967. Nature of ice sheet injury to alfalfa. *Agron J.* 59:557-560.
- Fuchigami, L.H., C.J. Weiser, K. Kobayashi, R. Timmis and L.V. Gusta 1982. A degree growth stage (degree GS) model and cold acclimation in temperate woody plants. In *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications*. Vol. 2 Ed. S.A. Li P.H. Academic Press, Sapporo, (JPN), pp. 93-116.
- Fuller, M.P. and M. Wisniewski 1998. The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *Journal of Thermal Biology*. 23:81-89.
- Furbank, R.T., C.H. Foyer and D.A. Walker 1987. Regulation of Photosynthesis in Isolated Spinach-Chloroplasts During Ortho-Phosphate Limitation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 894:552-561.
- Galiba, G., R. Tuberosa, G. Kocsy and J. Sutka 1993. Involvement of Chromosome-5a and Chromosome-5d in Cold-Induced Abscisic-Acid Accumulation in and Frost Tolerance of Wheat Calli. *Plant Breeding*. 110:237-242.
- Gassner, G. and C. Grime 1913. Beiträge zur frage des frosthärte des getreidepflanzen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 31:507-516.
- Gilmour, S.J. and M.F. Thomashow 1991. Cold-Acclimation and Cold-Regulated Gene-Expression in *Aba* Mutants of *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 17:1233-1240.

Références Bibliographiques

- Goldstein, G. and F. Meinzer 1983. Influence of insulating dead leaves and low temperatures on water balance in an andean giant rosette plant. *Plant, Cell and Environment*:649-656.
- Goldstein, G., F. Meinzer and M. Monasterio 1985. Physiological and Mechanical Factors in Relation to Size-Dependent Mortality in an Andean Giant Rosette Species. *Acta Oecologica-Oecologia Plantarum*. 6:263-275.
- Goldstein, G. and P.S. Nobel 1991. Changes in Osmotic-Pressure and Mucilage During Low-Temperature Acclimation of *Opuntia-Ficus-Indica*. *Plant Physiology*. 97:954-961.
- Göppert, H.R. 1883. Über das gefrieren, erfrieren der pflanzen und schutzmittel dagegen. In *Altes und neues*. Enke, Stuttgart, pp. 1-87.
- Graham, P.R. and R. Mullin 1976. Study of Flower Bud Hardiness in *Azalea*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 101:7-10.
- Green, D.C. and C.D. Ratzlaff 1975. An apparent relationship of soluble sugars with hardiness in winter wheat varieties. *Canadian Journal of Botany*. 53:2198-2201.
- Greer, D.H. 1983. Temperature regulation of the development of frost hardiness in *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Plant Physiology*. 10:539-547.
- Greer, D.H., L.A. Robinson, A.J. Hall, K. Klages and H. Donnison 2000. Frost hardening of *Pinus radiata* seedlings. Effect of temperature on relative growth rate, carbon balance and carbohydrate concentration. *Tree Physiology*. 20:107-114.
- Greer, D.H. and I.J. Warrington 1982. Effect of photoperiod, night temperature, and frost incidence on development of frost hardiness in *Pinus radiata*. *Australian Journal of Plant Physiology*. 9:333-342.
- Griffith, M., M. Antikainen, W.C. Hon, K. Pihakaski-Maunsbach, X.M. Yu, J.U. Chun and S.C. Yang 1997. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiologia Plantarum*. 100:327-332.
- Griffith, M. and M. Antikainen 1996. Extracellular ice formation in freezing-tolerant plants. *Advances in Low Temperature Biology*. 3:107-139.
- Griffith, M., B. Elfman and E.L. Camm 1984. Accumulation of Plastoquinone-a During Low-Temperature Growth of Winter Rye. *Plant Physiology*. 74:727-729.
- Griffith, M., N.P.A. Huner and D.J. Kyle 1984. Fluorescence Properties Indicate That Photosystem-II Reaction Centers and Light-Harvesting Complex Are Modified by Low-Temperature Growth in Winter Rye. *Plant Physiology*. 76:381-385.
- Griffith, M., C. Lumb, S.B. Wiseman, M. Wisniewski, R.W. Johnson and A.G. Marangoni 2005. Antifreeze proteins modify the freezing process in plants. *Plant Physiology*. 138:330-340.
- Grime, J.P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley, Chichester, p. 222 pp.
- Grisham, C.M. and R.E. Barnett 1973. Role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium + potassium ion)-dependent adenosinetriphosphatase. *Biochemistry*. 12:2635-2637.
- Gross, D.C., E.L. Proebsting, Jr. and H. Maccrindle Zimmerman 1988. Development, distribution and characteristics of intrinsic, nonbacterial ice nuclei in *Prunus* wood. *Plant Physiology*. 88:915-922.
- Guedon, Y. and J.M. Legave 2008. Analyzing the time-course variation of apple and pear tree dates of flowering stages in the global warming context. *Ecological Modelling*. 219:189-199.
- Guo, Y., Z. Cai and S. Gan 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell and Environment*. 27:521-549.
- Gurian-Sherman, D. and S.E. Lindow 1993. Bacterial Ice Nucleation - Significance and Molecular-Basis. *Faseb Journal*. 7:1338-1343.
- Gusta, L.V., M.J. Burke and A.C. Kapoor 1975. Determination of Unfrozen Water in Winter Cereals at Subfreezing Temperatures. *Plant Physiology*. 56:707-709.
- Gusta, L.V., N.J. Tyler and T.H.H. Chen 1983. Deep Undercooling in Woody Taxa Growing North of the -40-Degrees-C Isotherm. *Plant Physiology*. 72:122-128.
- Gusta, L.V., M. Wisniewski, N.T. Nesbitt and M.L. Gusta 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology*. 135:1642-1653.
- Gutierrez, C., E. Ramirez-Parra, M.M. Castellano and J.C. del Pozo 2002. G1 to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:480-486.
- Guy, C., F. Kaplan, J. Kopka, J. Selbig and D.K. Hinch 2008. Metabolomics of temperature stress. *Physiologia Plantarum*. 132:220-235.
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance : role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology*. 41:187-223.
- Guy, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. 81:1216-1223.
- Guy, C.L., K.J. Niemi and R. Brambl 1985. Altered Gene-Expression During Cold-Acclimation of Spinach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:3673-3677.
- Haag, R.W. 1974. Nutrient limitations to plant production in two tundra communities. *Canadian Journal of Botany*. 52:103-116.
- Haberlandt, F. 1875. *Wissenschaftlicht-praktische Untersuchungen auf dem gebiete des pflanzenbaues*. .
- Hacke, U. and J.J. Sauter 1995. Vulnerability of xylem to embolism in relation to leaf water potential and stomatal conductance in *Fagus sylvatica* f. *purpurea* and *Populus balsamifera*. *Journal of experimental Botany*. 46:1177-1183.
- Hacke, U.G. and J.S. Sperry 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Functional and ecological xylem anatomy*. 4:97-115.
- Häckel, H. 1985. Kälte und Frost als Belastungsfaktor. In *Handbuch der Pflanzenkrankheiten* Ed. P. Sorauer. Parey, Berlin, pp. 70-106.
- Hannah, M.A., A.G. Heyer and D.K. Hinch 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics*. 1:179-196.
- Hannah, M.A., D. Wiese, S. Freund, O. Fiehn, A.G. Heyer and D.K. Hinch 2006. Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142:98-112.
- Hanninen, H. 1990. Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. *Acta Forestalia Fennica*:1-47.
- Hanninen, H. 1991. Does climatic warming increase the risk of frost damage in northern trees ? *Plant, Cell and Environment*. 14:449-454.
- Hanninen, H. 2006. Climate warming and the risk of frost damage to boreal forest trees: identification of critical ecophysiological traits. *Tree Physiology*. 26:889-898.
- Hansen, J. and E. Beck 1988. Evidence for Ideal and Non-Ideal Equilibrium Freezing of Leaf Water in Frosthardy Ivy (*Hedera-Helix*) and Winter Barley (*Hordeum-Vulgare*). *Botanica Acta*. 101:76-82.
- Hardham, A.R. and B.E.S. Gunning 1978. Structure of Cortical Microtubule Arrays in Plant-Cells. *Journal of Cell Biology*. 77:14-34.
- Harms, U. and J.J. Sauter 1992. Localization of a storage protein in the wood ray parenchyma cells of *Taxodium distichum* (L.) L.C. Rich. by immunogold labeling. *Trees*:37-40.
- Harvey, R.B. 1922. Varietal Differences in the Resistance of Cabbage and Lettuce to Low Temperatures. *Ecology*. 3:134-139.
- Hasegawa, K. and A. Tsuboi 1960. The effect of low temperature on the breaking of rest for winter bud in mulberry tree. *Jpn Assoc Sericult*. 25:320-326.
- Hatakeyama, I. 1960. The relation between growth and cold hardiness of leaves of *Caellia sinensis*. *Biological Journal of Nara Women's University*. 10:65-69.
- Hatakeyama, I. 1961. Studies on the freezing of living and dead tissues of plants with special references to the colloidal bound water in living state. *Mem Coll. Sci Univ Kyoto Ser B*. 28:401-429.
- Heber, U. and K.A. Santarius 1973. Cell death by cold and heat resistance to extreme temperatures. Mechanisms of hardening and dehardening. In *Temperature and life* Ed. C.J.H.H.L.W. Precht H. Springer Verlag, Berlin, pp. 232-263.
- Heber, U., H. Volger, V. Overbeck and K.A. Santarius 1979. Membrane Damage and Protection during Freezing. *Advances in Chemistry*. 180:159-189.
- Hedberg, I. and O. Hedberg 1979. Tropical-Alpine Life-Forms of Vascular Plants. *Oikos*. 33:297-307.
- Heide, O.M. 1974. Growth and dormancy in Norway spruce ecotypes (*Picea abies*). I. Interaction of photoperiod and temperature. *Physiologia Plantarum*. 30:1-12.
- Heide, O.M. 1993. Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. *Physiologia Plantarum*. 88:531-540.

Références Bibliographiques

- Heide, O.M. 1993. Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiologia Plantarum*. 89:187-191.
- Heide, O.M. 2003. High autumn temperature delays spring bud burst in boreal trees, counterbalancing the effect of climatic warming. *Tree Physiology*. 23:931-936.
- Heino, P., G. Sandman, V. Lang, K. Nordin and E.T. Palva 1990. Abscisic-Acid Deficiency Prevents Development of Freezing Tolerance in *Arabidopsis-Thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics*. 79:801-806.
- Henson, W.R. 1952. Chinook winds and red belt injury to lodgepole pine in the Rocky mountains parks area of Canada. *Forestry Chronicle*. 28:62-64.
- Hirsh, A.G., R.J. Williams and H.T. Meryman 1985. A novel method of natural cryoprotection. Intracellular glass formation in deeply frozen *Populus*. *Plant Physiology*. 79:41-56.
- Hoch, G., M. Popp and C. Korner 2002. Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggests sink limitation of growth at the Swiss treeline. *Oikos*. 98:361-374.
- Hoffman, H. 1887. *Phänologische Untersuchungen*. In Universitätsprogramm zum, Giessen.
- Hon, W.C., M. Griffith, P. Chong and D.S.C. Yang 1994. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology*. 104:971-980.
- Horiuchi, T. and A. Sakai 1978. Effect of solar radiation on frost damage to young cryptomerias. In *Plant cold hardiness and freezing stress* Eds. L. P.H. and S. A. Academic Press, London, New York, pp. 281-295.
- Howe, G.T., P. Saruul, J. Davis and T.H.H. Chen 2000. Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F-2 family of hybrid poplars. *Theoretical and Applied Genetics*. 101:632-642.
- Howell, G.S. and C.J. Weiser 1970. The environmental control of cold acclimation in apple. *Plant Physiology*. 45:390-394.
- Hsieh, T.H., J.T. Lee, P.T. Yang, L.H. Chiu, Y.Y. Chang, Y.C. Wang and M.T. Chan 2002. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology*. 129:1086-1094.
- Hughes, M.A. and M.A. Dunn 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 47:291-305.
- Huner, N.P.A. and F.D.H. MacDonald 1976a. Chloroplastic proteins of wheat and rye grown at warm and cold-hardening temperatures. *Canadian Journal of Biochemistry*. 54:848-853.
- Huner, N.P.A. and F.D.H. MacDonald 1976b. Effect of Cold adaptation of puma rye on properties of RuBPCase carboxylase. *Biochimica et Biophysica Research Communications*. 73:411-429.
- Huner, N.P.A. and F.D.H. MacDonald 1979a. Changes in net charge and subunit properties of RuBPCase during cold hardening of Puma rye. *Canadian Journal of Biochemistry*. 57:155-164.
- Huner, N.P.A. and F.D.H. MacDonald 1979b. The effect of low temperature acclimation of winter rye on catalytic properties of its ribulose biphosphate carboxylase oxygenase. *Canadian Journal of Biochemistry*. 57:1036-1041.
- Huner, N.P.A., G. Oquist, V.M. Hurry, M. Krol, S. Falk and M. Griffith 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research*. 37:19-39.
- Hurry, V., A. Strand, R. Furbank and M. Stitt 2000. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 24:383-396.
- Hurry, V.M., P. Gardstrom and G. Oquist 1993. Reduced Sensitivity to Photoinhibition Following Frost-Hardening of Winter Rye Is Due to Increased Phosphate Availability. *Planta*. 190:484-490.
- Hwang, J.U. and Y. Lee 2001. Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*. 125:2120-2128.
- Ichiki, S. and H. Yamaya 1982. Sorbitol in tracheal sap of dormant apple (*Malus domestica* Borkh) shoots as related to cold hardiness. In *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications*. Vol. 2 Ed. S.A. Li P.H. Academic Press, New York, pp. 181-187.
- Iida, K., M. Seki, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, T. Toyoda, A. Konagaya and K. Shinozaki 2004. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 32:5096-5103.
- Ilker, R., R.W. Breidenbach and J. Lyons 1979. Sequence of ultrastructural changes in tomato cotyledons during short periods of chilling. In *Low Temperature Stress in Crop Plants*. Eds. J.M. Lyons, D. Graham and J.K. Raison. Academic Press, New York, London, Sydney, San Francisco, pp. 97-113.
- Imanishi, H.T., T. Suzuki, K. Masuda and T. Harada 1998. Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. *Scientia Horticulturae*. 72:255-263.
- IPCC, I.P.O.C.C. 2007. *Climate change 2007: the physical science basis (summary for policymakers)*. IPCC Secretariat, Geneva. 18 p.
- Irmscher, E. 1912. Über die resistenz der laubmoose gegen austrocknung und kälte. *Jarhb. Wiss. Bot.* 50:387-449.
- Ishida, S. 1963. On the development of frost cracks on Todomatsu trunks, *Abies sachalinensis* especially in relation to their wetwood. *Res Bull College Exp For Hokkaido Univ* 22:273-373.
- Ishikawa, M., W.S. Price, H. Ide and Y. Arata 1997. Visualization of freezing behaviors in leaf and flower buds of full-moon maple by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant Physiology*. 115:1515-1524.
- Ishikawa, M. and A. Sakai 1985. Extraorgan Freezing in Wintering Flower Buds of *Cornus-Officinalis* Sieb-Et-Zucc. *Plant Cell and Environment*. 8:333-338.
- Iverson, L.R. and A.M. Prasad 2001. Potential changes in tree species richness and forest community types following climate change. *Ecosystems*. 4:186-199.
- Jackson, S.D. 2009. Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*. 181:517-531.
- Jaglo-Ottosen, K.R., S.J. Gilmour, D.G. Zarka, O. Schabenberger and M.F. Thomashow 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*. 280:104-106.
- Johansson, N.O. and E. Krull 1970. Ice formation, cell contraction, and frost killing of wheat plants. *Meddelanden Statens Vaxtskyddsanstalt/National Swedish Institute for Plant Protection Contributions*. 14:343-362.
- Johnsen, O., O.G. Daehlen, G. Ostreng and T. Skroppa 2005. Daylength and temperature during seed production interactively affect adaptive performance of *Picea abies* progenies. *New Phytologist*. 168:589-596.
- Johnsen, O., C.G. Fossdal, N. Nagy, J. Molmann, O.G. Daehlen and T. Skroppa 2005. Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant Cell and Environment*. 28:1090-1102.
- Johnson, J.R. and J.R. Havis 1977. Photoperiod and temperature effects on root cold acclimation. *Journal of the American Society for horticultural Sciences*. 102:306-308.
- Jolly, W.M., R. Nemani and S.W. Running 2005. A generalized, bioclimatic index to predict foliar phenology in response to climate. *Global Change Biology*. 11:619-632.
- Jonsson, A., G. Eriksson, I. Dormling and J. Ifver 1981. Studies on frost hardiness of *Pinus contorta* Dougl. seedlings grown in climate chambers. In *Studia Forestalia Suecica*, p. 47pp.
- Junttila, O. 2007. Regulation of annual shoot growth cycle in northern tree species. In *Physiology of northern plants under changing environment*. Eds. Taulavuori E and T. K. Research Signpost, Kerala, pp. 177-210.
- Junttila, O., C. Stushnoff and L.W. Gusta 1983. Dehardening in flower buds of saskatoon-berry, *Amelanchier alnifolia*, in relation to temperature, moisture content, and spring bud development. *Canadian Journal of Botany*. 61:164-170.
- Kacperska-Palacz, A. 1978. Mechanism of cold acclimation in herbaceous plants. In *Plant cold hardiness and freezing stress*, Ed. P.H. Li, Sakai, A. Academic Press, London, New York, pp. 139-152.
- Kader, S.A. and E.L. Proebsting 1992. Freezing Behavior of *Prunus*, Subgenus *Padus*, Flower Buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117:955-960.
- Kajji, A. 1992. Gestion du carbone chez le jeune noyer, p. 77 pp + ann.
- Kaku, S. 1975. Analysis of freezing temperature distribution in plants. *Cryobiology*. 12:154-159.

Références Bibliographiques

- Kaku, S. and M. Iwaya 1979. Deep Supercooling in Xylems and Ecological Distribution in the Genera *Ilex*, *Viburnum* and *Quercus* in Japan. *Oikos*. 33:402-411.
- Kalberer, S.R., M. Wisniewski and R. Arora 2006. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science*. 171:3-16.
- Kandler, O., C. Dover and P. Ziegler 1979. Kälteresistenz der Fichte. I. Steuerung von Kalteresistenz, Kohlehydrat- und Proteinstoffwechsel durch Photoperiode und Temperatur. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft*. 92:225-241.
- Kaplan, F. and C.L. Guy 2004. beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*. 135:1674-1684.
- Kaplan, F., J. Kopka, D.W. Haskell, W. Zhao, K.C. Schiller, N. Gatzke, D.Y. Sung and C.L. Guy 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 136:4159-4168.
- Kaplan, F., J. Kopka, D.Y. Sung, W. Zhao, M. Popp, R. Porat and C.L. Guy 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Plant Journal*. 50:967-981.
- Kaplan, F., D.Y. Sung and C.L. Guy 2006. Roles of beta-amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum*. 126:120-128.
- Kasuga, J., K. Arakawa and S. Fujikawa 2007. High accumulation of soluble sugars in deep supercooling Japanese white birch xylem parenchyma cells. *New Phytologist*. 174:569-579.
- Kasuga, J., K. Mizuno, N. Miyaji, K. Arakawa and S. Fujikawa 2006. Role of intracellular contents to facilitate supercooling capability in beech (*Fagus crenata*) xylem parenchyma cells. *Cryoletters*. 27:305-310.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*. 17:287-291.
- Kaufmann, M.R. 1975. Leaf water stress in Engelmann spruce. Influence of the root and shoot environments. *Plant Physiology*. 56:841-844.
- Kaurin, A., C. Stushnoff and O. Junttila 1982. Vegetative Growth and Frost Hardiness of Cloudberry (*Rubus-Chamaemorus*) as Affected by Temperature and Photoperiod. *Physiologia Plantarum*. 55:76-81.
- Kerepesi, I., E. Banyai-Stefanovits and G. Galiba 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 161:131-133.
- Keskitalo, J., G. Bergquist, P. Gardestrom and S. Jansson 2005. A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology*. 139:1635-1648.
- Kim, W.Y., S. Fujiwara, S.S. Suh, J. Kim, Y. Kim, L.Q. Han, K. David, J. Putterill, H.G. Nam and D.E. Somers 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 449:356-+.
- Kindel, P.K., S.Y. Liao, M.R. Liske and C.R. Olien 1989. Arabinoxylans from Rye and Wheat Seed That Interact with Ice. *Carbohydrate Research*. 187:173-185.
- Kitaura, K. 1967. Supercooling and ice formation in mulberry trees. In *Cellular Injury and resistance in freezing organisms* Ed. E. Asahina. *Inst. Low Temp. Sci.*, Hokkaido, pp. 143-156.
- Klotke, J., J. Kopka, N. Gatzke and A.G. Heyer 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation - evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment*. 27:1395-1404.
- Knight, M.R., A.K. Campbell, S.M. Smith and A.J. Trethewey 1991. Transgenic Plant Aequorin Reports the Effects of Touch and Cold-Shock and Elicitors on Cytoplasmic Calcium. *Nature*. 352:524-526.
- Knutson, R.M. 1974. Heat Production and Temperature Regulation in Eastern Skunk Cabbage. *Science*. 186:746-747.
- Kobayashi, K.D., L.H. Fuchigami and C.J. Weiser 1983. Modeling cold hardiness of red-osier dogwood. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 108:376-381.
- Koike, T. 1990. Autumn Coloring, Photosynthetic Performance and Leaf Development of Deciduous Broad-Leaved Trees in Relation to Forest Succession. *Tree Physiology*. 7:21-32.
- Korn, M., T. Gartner, A. Erban, J. Kopka, J. Selbig and D.K. Hincha 2010. Predicting *Arabidopsis* Freezing Tolerance and Heterosis in Freezing Tolerance from Metabolite Composition. *Molecular Plant*. 3:224-235.
- Körner, C. 2003. *Alpine plant life*. Springer Verlag, Heidelberg. 344 p.
- Körner, C. and D. Basler 2010a. Phenology Under Global Warming. *Science*. 327:1461-1462.
- Körner, C. and D. Basler 2010b. Warming, Photoperiods, and Tree Phenology Response. *Science*. 329:278-278.
- Kramer, J.P. and T.H. Wetmore 1943. Effects of defoliation on cold resistance and diameter growth of broad leaved evergreens. *American Journal of Botany*. 30:428-431.
- Kramer, K. 1994. A modelling analysis of the effects of climatic warming on the probability of spring frost damage to tree species in the Netherlands and Germany. *Plant, Cell and Environment*. 17:367-377.
- Kramer, K. 1995. Phenotypic Plasticity of the Phenology of 7 European Tree Species in Relation to Climatic Warming. *Plant Cell and Environment*. 18:93-104.
- Kramer, K., I. Leinonen and D. Loustau 2000. The importance of phenology for the evaluation of impact of climate change on growth of boreal, temperate and Mediterranean forests ecosystems: an overview. *International Journal of Biometeorology*. 44:67-75.
- Kramer, P.J. 1937. The relation between rate of transpiration and rate of absorption of water in plants. *American Journal of Botany*. 24:10-15.
- Kramer, P.J. 1940. Root resistance as a cause of decreased water absorption by plants at low temperatures. *Plant Physiology*. 15:63-79.
- Kramer, P.J. and J.S. Boyer 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press, San Diego, p. 495 pp.
- Kramer, P.J. and T.T. Kozlowski 1979. *Physiology of woody plants*. Academic Press, New York, p. 811 pp.
- Krasavtsev, O.A. 1973. Effect of initial negative temperatures in frost hardening of plants. *Fiziol. Rast.* 16:228-236.
- Krause, G.H., R.J. Klosson and V. Tröster 1982. On the mechanism of freezing injury and cold acclimation of spinach leaves. In *Plant Cold Hardiness and freezing Stress* Ed. S.A. Li P.H. Academic Press, London, New York, pp. 55-76.
- Kreps, J.A., Y.J. Wu, H.S. Chang, T. Zhu, X. Wang and J.F. Harper 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*. 130:2129-2141.
- Kreutz, W. 1942. Das Eindringen des Frostes in den Boden unter gleichen und verschiedenen Witterungsbedingungen während des sehr kalten Winters 1939/1940. *Wiss. Abh.*, Berlin.
- Krog, J.O., K.E. Zachariassen, B. Larsen and O. Smidsrod 1979. Thermal Buffering in Afro-Alpine Plants Due to Nucleating Agent-Induced Water Freezing. *Nature*. 282:300-301.
- Kuroda, H. and S. Sagisaka 2005. Seasonal ultrastructural changes in xylem parenchyma cells of apple twigs in relation to cold hardiness. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 74:181-188.
- Labate, C.A., M.D. Adcock and R.C. Leegood 1990. Effects of temperature on the regulation of photosynthetic carbon assimilation in leaves of maize and barley. *Planta*. 181:547-554.
- Lacointe, A., A. Kajji, T. Ameglio, F.A. Daudet, P. Cruiziat, P. Archer and J.S. Frossard 1993. Storage and mobilization of carbon reserves in walnut and its consequences on the water status during winter. *Acta Horticulturae*. 311:201-209.
- Lacointe, A., J.J. Sauter, T. Ameglio, U. Harms, V. Pellicer and J.S. Frossard 1995. Carbohydrate and protein reserves in trees. In *EUROSILVA contribution to forest tree physiology* Ed. B.M.M. Sandermann H. Jr. INRA, Paris, pp. 273-296.
- Lambers, H. 1982. Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*. 55:478-485.
- Landsberg, J.J. 1974. Apple fruit bud development and growth. Analysis and an empirical model. *Annals of Botany*. 38:1013-1023.
- Lang, G.A., J.D. Early, G.C. Martin and R.L. Darnell 1987. Endo-, para- and ecodormancy : physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*. 22:371-377.
- Lang, V., P. Heino and E.T. Palva 1989. Low-Temperature Acclimation and Treatment with Exogenous Abscisic-Acid Induce Common Polypeptides in *Arabidopsis-Thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics*. 77:729-734.

Références Bibliographiques

- Lang, V., P. Heino and E.T. Palva 1989. Low-Temperature Acclimation and Treatment with Exogenous Abscisic-Acid Induce Common Polypeptides in Arabidopsis-Thaliana (L) Heynh. Theoretical and Applied Genetics. 77:729-734.
- Lang, V., E. Mantyla, B. Welin, B. Sundberg and E.T. Palva 1994. Alterations in Water Status, Endogenous Abscisic-Acid Content, and Expression of Rab18 Gene During the Development of Freezing Tolerance in Arabidopsis-Thaliana. Plant Physiology. 104:1341-1349.
- Langan, S.J., F.W. Ewers and S.D. Davis 1997. Xylem dysfunction caused by water stress and freezing in two species of co-occurring chaparral shrubs. Plant, Cell and Environment. 20:425-437.
- Langlet, O. 1937. Studier över tallens fysiologiska variabilitet och dess samband med klimatet. Medd Stat Skogsförs Anst 29:421-470.
- Larcher, W. 1957. Frosttrocknis an der waldgrenze und in der alpinen zwergstrauchheide auf dem Patscherkofel bei Innsbruck . Fernindanteum. 37:49-81.
- Larcher, W. 1961. Jahresgang des Assimilations- und Respirationsvermögens von *Olea europaea* L. SSP. *sativa* Hoff. et Link., *Quercus illex* L. und *Quercus pubescens* Willd. aus dem nördlichen Gardaseegebiet. Planta. 56:575-606.
- Larcher, W. 1963. Zur spätwinterlichen Erschwerung der Wasserbilanz von Holzpflanzen an der Waldgrenze. Ber Naturwiss Med Ver. 53:125-137.
- Larcher, W. 1977. Ergebnisse des IBP-Projekt „Zwergstrauchheide Patscherkofel“. Sitzungsber Österr Akad Wiss Math.-Naturwiss K1 Abt I 186:301-371.
- Larcher, W. 1981. Effects of low temperature stress and frost injury on plant productivity. In Physiological processes limiting plant productivity Ed. J.C. B. Butterworths, London, pp. 253-269.
- Larcher, W. 1985. Kälte und frost. In Handbuch der pflanzenökologie Ed. P. Sorauer. Parey, Berlin, pp. 107-326.
- Larcher, W. 1985. Winter Stress in high mountains. In Establishment and tending of subalpine forest: research and management. Eds. H. Turner and W. Tranquillini. Eidgen Anst Forstl Versuchw, Berlin, pp. 11-19.
- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer, Berlin, p. 506 pp.
- Larcher, W., U. Heber and K.A. Santarius 1973. Limiting Temperatures for Life Functions. In Temperature and Life Eds. H. Precht, J. Christopherson, H. Hensel and W. Larcher. Springer-Verlag, Berlin, pp. 195-263.
- Larcher, W. and B. Mair 1968. Das kälteresistenzverhalten von *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* und *Fraxinus ornus* auf drei thermisch unterschiedlichen standorten. Oecologia Plantarum. 3:255-270.
- Lasheen, A.M. and C.E. Chaplin 1971. Biochemical comparison of seasonal variations in three peach cultivars differing in cold hardness. Journal of the american Society for horticultural Sciences. 96:154-159.
- Law, R.D. and J.C. Suttle 2003. Transient decreases in methylation at 5'-CCGG-3' sequences in potato (*Solanum tuberosum* L.) meristem DNA during progression of tubers through dormancy precede the resumption of sprout growth. Plant Molecular Biology. 51:437-447.
- Le Chatelier, H. 1884. Sur un énoncé général des lois des équilibres chimiques. Comptes-rendus de l'Académie des sciences. 99:786-789.
- Lecomte, C., A. Giraud and V. Aubert 2003. Testing a predicting model for frost resistance of winter wheat under natural conditions. Agronomie. 23:51-66.
- Lee, A.G. 1975. Interactions with biological membranes. Endeavour. 31:67-71.
- Lee, B.H., D.A. Henderson and J.K. Zhu 2005a. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. Plant Cell 17:3155-3175.
- Lee, D.W., J. O'Keefe, N.M. Holbrook and T.S. Feild 2003. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. Ecological Research. 18:677-694.
- Lee, S.H., G.C. Chung and E. Steudle 2005b. Low temperature and mechanical stresses differentially gate aquaporins of root cortical cells of chilling-sensitive cucumber and -resistant figleaf gourd. Plant Cell and Environment. 28:1191-1202.
- Lee, S.P. and T.H.H. Chen 1993. Molecular-Cloning of Abscisic Acid-Responsive Messenger-Rnas Expressed During the Induction of Freezing Tolerance in Bromegrass (*Bromus-Inermis* Leys) Suspension-Culture. Plant Physiology. 101:1089-1096.
- Leikin, S., V.A. Parsegian, D.C. Rau and R.P. Rand 1993. Hydration Forces. Annual Review of Physical Chemistry. 44:369-395.
- Leinonen, I. 1996. A Simulation Model for the Annual Frost Hardiness and Freezing Damage of Scots Pine. Annals of Botany. 78:687-693.
- Leinonen, I. and K. Kramer 2002. Applications of phenological models to predict the future carbon sequestration potential of boreal forests. Climatic Change. 55:99-113.
- Leinonen, I., T. Repo and H. Hanninen 1997. Changing environmental effects on frost hardness of Scots pine during dehardening. Annals of Botany. 79:133-138.
- Leinonen, I., T. Repo, H. Hänninen and K.E. Burr 1995. A Second -order Dynamic Model for the Frost Hardiness of Trees. Annals of Botany. 76:89-95.
- Lennartsson, M. 2003. Cold hardening and dehardening in *Salix*. In Forest Genetics and Plant Physiology. Swedish University of Agricultural Sciences, Umea, p. 39.
- Lenne, T., G. Bryant, R. Holcomb and K.L. Koster 2007. How much solute is needed to inhibit the fluid to gel membrane phase transition at low hydration? Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes. 1768:1019-1022.
- Lenne, T., C.J. Garvey, K.L. Koster and G. Bryant 2009. Effects of Sugars on Lipid Bilayers during Dehydration - SAXS/WAXS Measurements and Quantitative Model. Journal of Physical Chemistry B. 113:2486-2491.
- Lens, F., J.L. Luteyn, E. Smets and S. Jansen 2004. Ecological trends in the wood anatomy of Vaccinioideae (*Ericaceae* s.l.). Flora. 199:309-319.
- Levitt, J. 1956. The Hardiness of plants. Academic Press, New York. 278 p.
- Levitt, J. 1957. The moment of frost injury. Protoplasma. 48:289-302.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing, and high temperature stress. In Physiological Ecology series. Academic Press, New York, p. 497 pp.
- Levitt, J.D. 1958. Frost, drought and heat resistance. Protoplasmatologia. 6:1-87.
- Levitt, J.D. and G.W. Scarth 1936. Frost hardening studies with living cells. I. Osmotic and bound water changes in relation to frost resistance and the seasonal cycle. Can. J. Res. C14:267-284.
- Lewis, B.D., G. KarlinNeumann, R.W. Davis and E.P. Spalding 1997. Ca²⁺-activated anion channels and membrane depolarizations induced by blue light and cold in Arabidopsis seedlings. Plant Physiology. 114:1327-1334.
- Li, C.Y., O. Junttila, P. Heino and E.T. Palva 2003a. Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application. Tree Physiology. 23:481-487.
- Li, C.Y., O. Junttila, P. Heino and E.T. Palva 2003c. Different responses of northern and southern ecotypes of *Betula pendula* to exogenous ABA application. Tree Physiology. 23:481-487.
- Li, C.Y., T. Puhakainen, A. Welling, A. Vihera-Aarnio, A. Ernsten, O. Junttila, P. Heino and E.T. Palva 2002. Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*). Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. Physiologia Plantarum. 116:478-488.
- Li, C.Y., A. Vihera-Aarnio, T. Puhakainen, O. Junttila, P. Heino and E.T. Palva 2003b. Ecotype-dependent control of growth, dormancy and freezing tolerance under seasonal changes in *Betula pendula* Roth. Trees-Structure and Function. 17:127-132.
- Li, C.Y., A. Welling, T. Puhakainen, A. Vihera-Aarnio, A. Ernsten, O. Junttila, P. Heino and E.T. Palva 2005. Differential responses of silver birch (*Betula pendula*) ecotypes to short-day photoperiod and low temperature. Tree Physiology. 25:1563-1569.
- Li, P.H. and C.J. Weiser 1969. Metabolism of nucleic acids in one year old apple twig during cold hardening and dehardening. Plant and Cell Physiology. 10:21-30.
- Li, P.H. and C.J. Weiser 1971. Increasing cold resistance of stem sections of *Cornus stolonifera* by artificial dehydration : A preliminary report. Cryobiology. 8:108-111.
- Lim, P.O., H.J. Kim and H.G. Nam 2007. Leaf senescence. Annual Review of Plant Biology. 58:115-136.

Références Bibliographiques

- Lindow, S.E. 1990. Use of genetically altered bacteria to achieve plant frost control. In *Biotechnology of Plant-Microbe Interactions*. Eds. J.P. Nakas and C. Hagedorn. McGraw-Hill, New York, pp. 85-110.
- Lindow, S.E., D.C. Army and C.D. Upper 1982. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. *Plant Physiol.* 70:1084-1089.
- Lindow, S.E., P.G. Army and C.D. Upper 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Applied Environmental Microbiology.* 36:831-838.
- Lindow, S.E. and J.H. Leveau 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology.* 13:238-243.
- Linkosalo, T., T.R. Carter, R. Hakkinen and P. Hari 2000. Predicting spring phenology and frost damage risk of *Betula* spp. under climatic warming: a comparison of two models. *Tree Physiology.* 20:1175-1182.
- Liu, J.P. and J.K. Zhu 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science.* 280:1943-1945.
- Llorente, F., J.C. Oliveros, J.M. Martinez-Zapater and J. Salinas 2000. A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, frs1, is a new aba3 allele. *Planta.* 211:648-655.
- Los, D.A. 2004. The effect of low-temperature-induced DNA supercoiling on the expression of the desaturase genes in *Synechocystis*. *Cellular and Molecular Biology.* 50:605-612.
- Luedeling, E., M.H. Zhang, G. McGranahan and C. Leslie 2009. Validation of winter chill models using historic records of walnut phenology. *Agricultural and Forest Meteorology.* 149:1854-1864.
- Luoranen, J., T. Repo and J. Lappi 2004. Assessment of the frost hardiness of shoots of silver birch (*Betula pendula*) seedlings with and without controlled exposure to freezing. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere.* 34:1108-1118.
- Luttge, U. and B. Hertel 2009. Diurnal and annual rhythms in trees. *Trees-Structure and Function.* 23:683-700.
- Luyet, B.J. and M.C. Gibbs 1937. On the mechanism of congelation and of death in the rapid freezing of epidermal plant cells. *Biodynamica:*1-18.
- Lyons, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology.* 24:445-466.
- Lyons, J.M., D. Graham and J.K.E. Raison 1979. Low temperature stress in crop plants. The role of membrane. Academic Press, New York, p. 565 pp.
- Lyons, J.M. and J.K. Raison 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiology.* 45:386-389.
- Lyons, J.M., T.A. Wheaton and H.K. Pratt 1964. Relationship between the Physical Nature of Mitochondrial Membranes and Chilling Sensitivity in Plants. *Plant Physiol.* 39:262-268.
- M., D., L.J. M., C. M., M. N., B. N. and S. B. 2004. Réchauffement climatique : quels effets sur la floraison chez trois espèces fruitières ? *Arboriculture fruitière.* 578:27-33.
- Mac Irving, R. and F.O. Lanphear 1967. The long day leaf as a source of cold hardiness inhibitors. *Plant Physiology.* 42:1384-1388.
- MacGuire, J.J. and H.L. Flint 1962 Effects of temperature and light on frost hardiness of conifers. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science.* 80:630-635.
- Malone, S.R. and E.N. Ashworth 1991. Freezing stress response in woody tissues observed using low-temperature scanning electron microscopy and freeze substitution techniques. *Plant Physiology.* 95:871-881.
- Mantyla, E., V. Lang and E.T. Palva 1995. Role of Abscisic-Acid in Drought-Induced Freezing Tolerance, Cold-Acclimation, and Accumulation of Lt178 and Rab18 Proteins in *Arabidopsis-Thaliana*. *Plant Physiology.* 107:141-148.
- Marangoni, A.G., P.M. Duplessis and R.Y. Yada 1997. Kinetic model for carbon partitioning in *Solanum tuberosum* tubers stored at 2 degrees C and the mechanism for low temperature stress-induced accumulation of reducing sugars. *Biophysical Chemistry.* 65:211-220.
- Marcellos, H. and W.V. Single 1975. Temperatures in wheat during Radiation frost. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry.* 15:818-822.
- Markhart, A.H., E.L. Fiscus, A.W. Naylor and P.J. Kramer 1979. Effect of Temperature on Water and Ion-Transport in Soybean and Broccoli Systems. *Plant Physiology.* 64:83-87.
- Martinez-Garcia, J.F., A. Virgos-Soler and S. Prat 2002. Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the *Arabidopsis* flowering-time gene *CONSTANS*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99:15211-15216.
- Matsumoto, K., T. Ohta, M. Irasawa and T. Nakamura 2003. Climate change and extension of the Ginkgo biloba L. growing season in Japan. *Global Change Biology.* 9:1634-1642.
- Mauget, J.C. 1976. Sur la dormance des bourgeons végétatifs du noyer (*Juglans regia* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série D: Sciences naturelles.* 283:499-502.
- Mauget, J.C. 1981. Modification des capacités de croissance des bourgeons du noyer par application d'une température de 4 degrés C à différents moments de leur période de repos apparent. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III: Sciences de la Vie.* 292:1081-1084.
- Mayr, S., H. Cochard, T. Ameglio and S.B. Kikuta 2007. Embolism formation during freezing in the wood of *Picea abies*. *Plant Physiology.* 143:60-67.
- Mayr, S., A. Gruber and H. Bauer 2003b. Repeated freeze-thaw cycles induce embolism in drought stressed conifers (Norway spruce, stone pine). *Planta.* 217:436-441.
- Mayr, S. and P. Schmid 2006. Refilling in conifers at the alpine timberline. In *5th Plant Biomechanics Conference*, Stockholm.
- Mayr, S., F. Schwienbacher and H. Bauer 2003. Winter at the alpine timberline. Why does embolism occur in Norway spruce but not in stone pine? *Plant Physiology.* 131:780-792.
- Mayr, S., F. Schwienbacher and H. Bauer 2003a. Winter at the alpine timberline. Why does embolism occur in Norway spruce but not in stone pine? *Plant Physiology.* 131:780-792.
- Mayr, S. and J.S. Sperry 2010. Freeze-thaw-induced embolism in *Pinus contorta*: centrifuge experiments validate the 'thaw-expansion hypothesis' but conflict with ultrasonic emission data. *New Phytologist.* 185:1016-1024.
- Mayr, S., G. Wieser and H. Bauer 2006. Xylem temperatures during winter in conifers at the alpine timberline. *Agricultural and Forest Meteorology.* 137:81-88.
- Mayr, S., M. Wolfschwenger and H. Bauer 2002. Winter-drought induced embolism in Norway spruce (*Picea abies*) at the Alpine timberline. *Physiologia Plantarum.* 115:74-80.
- Mazur, P. 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology.* 47:347-369.
- Mazur, P. 1965. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Annals of New York Academy of Science.* 125:658-676.
- Mazur, P. 2004. Principles of Cryobiology. In *Life in the Frozen State* Eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 3-65.
- McKenzie, J.S., C.J. Weiser and M.J. Burke 1974. Effects of red and far red light on the initiation of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. *Plant Physiology.* 53:783-789.
- Meese, B.J.D. 1975. Thermogenic Respiration in Aroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 26:117-126.
- Menzel, A. and P. Fabian 1999. Growing season extended in Europe. *Nature.* 397:659-659.
- Menzel, A., T.H. Sparks, N. Estrella, E. Koch, A. Aasa, R. Ahas, K. Alm-Kubler, P. Bissolli, O. Braslavskaja, A. Briede, F.M. Chmielewski, Z. Crepinsek, Y. Curnel, A. Dahl, C. Defila, A. Donnelly, Y. Filella, K. Jatca, F. Mage, A. Mestre, O. Nordli, J. Penuelas, P. Pirinen, V. Remisova, H. Scheffinger, M. Striz, A. Susnik, A.J.H. Van Vliet, F.E. Wielgolaski, S. Zach and A. Züst 2006a. European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology.* 12:1969-1976.
- Menzel, A., T.H. Sparks, N. Estrella and D.B. Roy 2006b. Altered geographic and temporal variability in phenology in response to climate change. *Global Ecology and Biogeography.* 15:498-504.
- Michaelis, P. 1934. Ökologische studien an der alpinen Baumgrenze. IV: Zur Kenntnis des winterlichen Wasser haushaltes. *Jahrb Wiss Bot.* 80:169-298.
- Michaelis, P. 1934. Ökologische studien an der alpinen Baumgrenze. V: Osmotischer Wert und Wassergehalt während des winters in den verschiedenen Höhenlagen. *Jahrb Wiss Bot.* 80:337-362.
- Migliavacca, M., E. Cremonese, R. Colombo, L. Busetto, M. Galvagno, L. Ganis, M. Meroni, E. Pari, M. Rossini, C. Siniscalco and U.M. di Cella 2008. European larch phenology in the Alps: can we grasp the role of ecological factors by combining field observations

Références Bibliographiques

- and inverse modelling? *International Journal of Biometeorology*. 52:587-605.
- Miller, G., V. Shulaev and R. Mittler 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*. 133:481-489.
- Modlibowska, I. 1957. Le problème des gelées printanières et la culture fruitière. . In *Congrès Pomologique International*, pp. 83-112.
- Modlibowska, I. 1962. Frost damage and recovery in plant tissues. . In *Proceedings of the XVIII Int. Hort. Cong.*, pp. 180-189.
- Molisch, H. 1896. Das Erfrieren von Pflanzen bei Temperaturen über dem Eispunkt. *Sitzber Kaiserlichen Akad. Wiss. Wien. Math. Naturwiss. Kl.* . 105:1-14.
- Molmann, J.A., D.K.A. Asante, J.B. Jensen, M.N. Krane, A. Ernstsen, O. Junttila and J.E. Olsen 2005. Low night temperature and inhibition of gibberellin biosynthesis override phytochrome action and induce bud set and cold acclimation, but not dormancy in PHYA overexpressors and wild-type of hybrid aspen. *Plant Cell and Environment*. 28:1579-1588.
- Monroy, A.F. and R.S. Dhindsa 1995. Low-temperature signal transduction. Induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. *Plant Cell*:321-331.
- Monroy, A.F., F. Sarhan and R.S. Dhindsa 1993. Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation and gene expression. *Plant Physiology*. 102:1227-1235.
- Monteith, J.L. 1972. Latent Heat of Vaporization in Thermal Physiology. *Nature*. 236:96.
- Monteith, J.L. and M.H. Unsworth 1990. Principles of environmental physics. Edward Arnold, London, p. 291 pp.
- Mooney, H.A., P.J. Weisser and S.L. Gulmon 1977. Environmental Adaptations of Atacaman Desert Cactus Copiapoa-Haseltoniana. *Flora*. 166:117-124.
- Morin, X., T. Ameglio, R. Ahas, C. Kurz-Besson, V. Lanta, F. Lebourgeois, F. Miglietta and I. Chuine 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*. 27:817-825.
- Morin, X. and I. Chuine 2005. Sensitivity analysis of the tree distribution model PHENOFIT to climatic input characteristics: implications for climate impact assessment. *Global Change Biology*. 11:1493-1503.
- Moschkov, B.S. 1935. Photoperiodismus und Frosthärte ausdauernder Gewächse. *Planta*. 23:774-803.
- Moser, W., W. Brzoska, K. Zachhuber and W. Larcher 1977. Ergebnisse des IBP-projekts "Hoher Nebelkogel 3184m". . *Sitzungsber Österr Akad Wiss Math.- Naturwiss KI Abt I*. 186:387-419.
- Muldrew, K., J.P. Acker, J.A.W. Elliott and L.E. McGann 2004. The Water to Ice transition: Implications for living cells. In *Life in the Frozen State* Eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 67-107.
- Münch, E. 1923. Die Knospentfaltung der Fichte und die Spätfrostgefahr. *Allg Frost Jagd Z*. 1923:241-265.
- Murray, M.B., M.G.R. Cannell and R.I. Smith 1989. Date of budburst of fifteen tree species in Britain following climatic warming. *Journal of Applied Ecology*. 26:693-700.
- Narberhaus, F., T. Waldmann and S. Chowdhury 2006. RNA thermometers. *Fems Microbiology Reviews*. 30:3-16.
- Neilson, R.E., M.M. Ludlow and P.G. Jarvis 1972. Photosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). II. Response to temperature. *Journal of Applied Ecology*:721-745.
- Nejad, P., M. Ramstedt and U. Granhall 2004. Pathogenic ice-nucleation active bacteria in willows for short rotation forestry. *Forest Pathology*. 34:369-381.
- Neuner, G. and B. Beikircher 2010. Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma*. 243:145-152.
- Nissila, P.C. and L.H. Fuchigami 1978. The relationship between vegetative maturity and the first stage of cold acclimation. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 103:710-711.
- Nobel, P.S. 1980. Morphology, Surface Temperatures, and Northern Limits of Columnar Cacti in the Sonoran Desert. *Ecology*. 61:1-7.
- Nobel, P.S. 1987. Principles underlying the prediction of temperature in plants, with special reference to desert succulents. In *Plants and Temperature* Eds. S.I. Long and F.I. Woodward. Society for Experimental Biology, Cambridge, pp. 1-25.
- Noodén, L.D. 1988. The phenomena of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants* Eds. L.D. Noodén and A.C. Leopold. Academic, San Diego, pp. 1-50.
- Ogren, E. 1996. Premature dehardening in *Vaccinium myrtillus* during a mild winter: A cause for winter dieback? *Functional Ecology*. 10:724-732.
- Ogren, E. 1999. Fall frost resistance in willows used for biomass production. I. Characterization of seasonal and genetic variation. *Tree Physiology*. 19:749-754.
- Ogren, E. 2001. Effects of climatic warming on cold hardiness of some northern woody plants assessed from simulation experiments. *Physiologia Plantarum*. 112:71-77.
- Ögren, E. 1997. Relationship between temperature, respiratory loss of sugar and premature dehardening in dormant Scots pine seedlings. *Tree Physiology*. 17:47-51.
- Olien, C.R. 1965. Interference of cereal polymers and related compounds with freezing. *Cryobiology*. 2:47-54.
- Olien, C.R. and M.N. Smith 1977. Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiology*. 60:499-503.
- Olsen, J.E., O. Junttila, J. Nilsen, M.E. Eriksson, I. Martinussen, O. Olsson, G. Sandberg and T. Moritz 1997. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. *Plant Journal*. 12:1339-1350.
- Olson, R.A. and T.A. Steeves 1983. Frost damage in flowers and immature fruits of *Amelanchier alnifolia* Nutt (Maloideae). *Canadian Journal of Plant Science*. 63:461-466.
- Orvar, B.L., V. Sangwan, F. Omann and R.S. Dhindsa 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal*. 23:785-794.
- Pagter, M., C.R. Jensen, K.K. Petersen, F.L. Liu and R. Arora 2008. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal cold acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. *Physiologia Plantarum*. 134:473-485.
- Palonen, P. and D. Buszard 1997. Current state of cold hardiness research on fruit crops. *Canadian Journal of Plant Science*. 77:399-420.
- Palta, J.P., J. Levitt, E.J. Stadelmann and M.J. Burke 1977. Dehydration of onion cells. A comparison of freezing vs desiccation and living vs dead cells. *Physiologia Plantarum*. 41:273-279.
- Paquin, R. and G.R. Mehuys 1980. Influence of Soil-Moisture on Cold Tolerance of Alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science*. 60:139-147.
- Parker, J. 1959. Seasonal variations in sugars of conifers with some observations on cold resistance. *Forest Science*:56-63.
- Parker, J. 1962. Seasonal changes in cold resistance and free sugars of some hardwood tree barks. *Forest Science*:255-262.
- Parker, J. 1963. Cold resistance in woody plants. *Botanical Review*. 29:123-201.
- Parmentier, C.M., L.J. Rowland and M.J. Linc 1998. Water Status in Relation to Maintenance and Release from Dormancy in Blueberry Flower Buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:762-769.
- Parmesan, C. and G. Yohe 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*. 421:37-42.
- Pastore, A., S.R. Martin, A. Politou, K.C. Kondapalli, T. Stemmler and P.A. Temussi 2007. Unbiased cold denaturation: Low- and high-temperature unfolding of yeast frataxin under physiological conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 129:5374-+.
- Pauley, S. and T.O. Perry 1954. Ecotypic variation of the photoperiodic responses in poplars. *J Arnold Arbor*. 35:167-188.
- Pavel, E.W. and E. Fereres 1998. Low soil temperatures induce water deficits in olive (*Olea europaea*) trees. *Physiologia Plantarum*. 104:525-532.
- Pearce, R.S. 1988. Extracellular ice and cell shape in frost-stressed cereal leaves : a low temperature scanning-electron-microscopy study. *Planta*. 175:313-324.
- Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*. 29:47-76.
- Pearce, R.S. 2001. Plant freezing and damage. *Annals of Botany*. 87:417-424.
- Pearce, R.S. 2004. Adaptation of Higher Plants to Freezing. In *Life in the Frozen State* Eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., pp. 171-203.

Références Bibliographiques

- Pearce, R.S. and E.N. Ashworth 1992. Cell-Shape and Localization of Ice in Leaves of Overwintering Wheat During Frost Stress in the Field. *Planta*. 188:324-331.
- Pearce, R.S., M.A. Dunn, J.E. Rixon, P. Harrison and M.A. Hughes 1996. Expression of cold-inducible genes and frost hardiness in the crown meristem of young barley (*Hordeum vulgare* L cv Igri) plants grown in different environments. *Plant Cell and Environment*. 19:275-290.
- Pearce, R.S. and M.P. Fuller 2001. Freezing of barley studied by infrared video thermography. *Plant Physiology*. 125:227-240.
- Pennycooke, J.C., R. Vepachedu, C. Stushnoff and M.L. Jones 2004. Expression of an alpha-galactosidase gene in *Petunia* is upregulated during low-temperature deacclimation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129:491-496.
- Penuelas, J., T. Rütishauser and I. Filella 2009. Phenology Feedbacks on Climate Change. *Science*. 324:887-888.
- Perry, T.O. 1968. Dormancy, Turion Formation, and Germination by Different Clones of *Spirodela polyrrhiza*. *Plant Physiol.* 43:1866-1869.
- Perry, T.O. 1971. Dormancy of trees in winter. *Science*. 171:29-36.
- Pfeiffer, M. 1933. Frostuntersuchungen an fichtentrieben. *Tharandter Forstl. Jahrb.* 84:664-695.
- Pihakaski-Maunsbach, K., M. Griffith, M. Antikainen and A.B. Maunsbach 1996. Immunogold localization of glucanase-like antifreeze protein in cold acclimated winter rye. *Protoplasma*. 191:115-125.
- Pihakaski-Maunsbach, K., B. Moffatt, P. Testillano, M. Risueno, S.S. Yeh, M. Griffith and A.B. Maunsbach 2001. Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots. *Physiologia Plantarum*. 112:359-371.
- Pisek, A. 1950. Frosthärte und Zusammensetzung des Zellsaftes bei *Rhododendron ferrugineum*, *Pinus cembra* und *Picea excelsa*. *Protoplasma*. 39:129-146.
- Pisek, A. 1958. Versuche zur frostresistenzprüfung von rinde, winterknospen und blüten einiger arten von obstgehölzen. *Gartenbauwissenschaft*. 23:54-74.
- Pisek, A. and R. Schiessl 1947. Die temperaturbeeinflussbarkeit des frosthärte von nadelhölzern und zweigsträuchern an der alpinen waldgrenze. *Ber Naturwiss Med Verein* 47:33-52.
- Pitt, R.E. 1990. Cryobiological Implications of Different Methods of Calculating the Chemical-Potential of Water in Partially Frozen Suspending Media. *Cryo-Letters*. 11:227-240.
- Pittermann, J. and J. Sperry 2003. Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers. *Tree Physiology*. 23:907-914.
- Pittermann, J. and J.S. Sperry 2006. Analysis of freeze-thaw embolism in conifers. The interaction between cavitation pressure and tracheid size. *Plant Physiology*. 140:374-382.
- Plieth, C., U.P. Hansen, H. Knight and M.R. Knight 1999. Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant Journal*. 18:491-497.
- Pockman, W.T. and J.S. Sperry 1997. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. *Oecologia*. 109:19-27.
- Pogosyan, K.S. and A. Sakai 1969. Freezing resistance in grape vines. *Low Temperature Science Serie B*. 27:125-142.
- Poirier, M. 2008. Etude écophysiological de l'endurcissement au gel des arbres : Impact des conditions estivales de croissance sur la résistance au gel des arbres. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, p. 307.
- Poirier, M., A. Lacoite and T. Ameglio 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiology*. 30:1555-1569.
- Popko, J., R. Hansch, R.R. Mendel, A. Polle and T. Teichmann 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biology*. 12:242-258.
- Priestley, J.H. 1920. The mechanism of root pressure. *New Phytologist*. 19:189-200.
- Proebsting, E.L., Jr. 1963. The role of air temperatures and bud development in determining hardiness of dormant Elberta peach fruit buds. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 83:259-269.
- Puhakainen, T. 2004a. Physiological and Molecular Analyses of Cold Acclimation of Plants. In *Department of Biological and Environmental Sciences, Genetics, Biosciences, Helsinki*, p. 60.
- Puhakainen, T., C.Y. Li, M. Boije-Malm, J. Kangasjarvi, P. Heino and E.T. Palva 2004b. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. *Plant Physiology*. 136:4299-4307.
- Quamme, H.A. 1976. Relationship of the low temperature exotherm to apple and pear production in North America. *Canadian Journal of Plant Science*. 56:493-500.
- Quamme, H.A. 1978. Mechanism of supercooling in overwintering peach flower buds. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 103:57-61.
- Quinn, P.J. 1985. A Lipid-Phase Separation Model of Low-Temperature Damage to Biological-Membranes. *Cryobiology*. 22:128-146.
- Raese, J.T., M.W. Williams and H.D. Billingsley 1977. Sorbitol and Other Carbohydrates in Dormant Apple Shoots as Influenced by Controlled Temperatures. *Cryobiology*. 14:373-378.
- Raison, J.K., E.A. Chapman, L.C. Wright and S.W. Jacobs 1979. Membrane lipids transitions. Their correlation with the climatic distribution of plants. In *Low temperature stress in crop plants. The role of membrane* Ed. G.D.R.J.K. Lyons J.M. Academic Press, New York, pp. 177-186.
- Rajashekar, C., M.N. Westwood and M.J. Burke 1982. Deep Supercooling and Cold Hardiness in Genus *Pyrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 107:968-972.
- Rakitina, Z.G. 1965. The permeability of ice with respect to CO₂ and O₂ in connection with a study of the cause of death of winter cereals under a ice crust. *Fiziol Rast.* 12:909-919.
- Rakitina, Z.G. 1967. Effect of the gas composition of the atmosphere on the frost resistance of winter wheat plants. *Fiziol Rast.* 14:328-336.
- Rakitina, Z.G. 1970. Effect of ice crust on gas composition of the interior atmosphere on winter wheat. *Fiziol Rast.* 17:907-912.
- Rasmussen, D.H., M.N. Macaulay and A.P. Mackenzie 1975. Supercooling and nucleation of ice in single cells. *Cryobiology*. 12:328-339.
- Rasmussen, D.H. and A.P. MacKenzie 1972. Effect of solute on ice-solution interfacial free energy; calculation from measured homogeneous nucleation temperature. In *Water Structure at the Water Polymer Interface* Ed. H.H.G. Jellinek. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 126-145.
- Raunkjær, C. 1904. Om biologiske typer, med Hensyn til Planternes Tilpasning til at overle ugunstige Aarister. *Bot. Tidsskrift*, 26
- Réaumur, R.A.F.d. 1735. Observations du thermomètre, faites à Paris durant l'année 1735, comparées avec celles qui ont été faites sous la ligne, à l'isle de France, à Alger et quelques unes de nos isles de l'Amérique. *Mémoire de l'Académie des Sciences de Paris*
- Redfern, D.B. and M.G.R. Cannell 1982. Needle Damage in Sitka Spruce Caused by Early Autumn Frosts. *Forestry*. 55:39-&
- Repo, T., H. Hanninen and S. Kellomaki 1996. The effects of long-term elevation of air temperature and CO₂ on the frost hardiness of scots pine. *Plant, Cell and Environment*. 19:209-216.
- Repo, T., I. Leinonen, A. Ryyppo and L. Finer 2004. The effect of soil temperature on the bud phenology, chlorophyll fluorescence, carbohydrate content and cold hardiness of Norway spruce seedlings. *Physiologia Plantarum*. 121:93-100.
- Repo, T., A. Makela and H. Hanninen 1990. Modeling frost resistance of trees. *Silva Carelica*. 15:61-74.
- Reuther, G. 1971. Die Dynamik des kohlenhydratmetabolismus als kriterium der frostresistenz von obstgehölzen in abhängigkeit von der winterruhe. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. 84:571-583.
- Richardson, E.A., S.D. Seeley and D.R. Walker 1974. A model for estimating the completion of rest for Redhaven and Elberta peach trees. *Hortscience*:331-332.
- Rinne, P.L.H., P.L.M. Kaikuranta, L.H.W. van der Plas and C. van der Schoot 1999. Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*. 209:377-388.
- Rinne, P.L.H., P.M. Kaikuranta and C. van der Schoot 2001. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant Journal*. 26:249-264.
- Rinne, P.L.H. and C.v.d. Schoot 2003. Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Canadian Journal of Botany*. 81:1182-1197.

Références Bibliographiques

- Riou, C. and R. Pouget 1992. Nouvelles propositions pour évaluer la vitesse de débournement des bourgeons de la vigne et modélisation de la date de débournement. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*. 26:63-74.
- Roberts, J.A., K.A. Elliott and Z.H. Gonzalez-Carranza 2002. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual Review of Plant Biology*. 53:131-158.
- Rodrigo, J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees - morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*. 85:155-173.
- Rogers, W.S. 1952. Some aspects of spring frost damage to fruit and its control. In XIII Int. Hort. Cong. pp. 941-946.
- Rudolph, T.D. 1964. *Forest Sciences Monography n°6*. Forest Science. 10:361.
- Ruelland, E., M.N. Vaultier, A. Zachowski and V. Hurry 2009. Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. In *Advances in Botanical Research*, Vol 49. Academic Press Ltd, London, pp. 35-150.
- Ruthsatz, B. 1978. Las plantas es cojin de los semi-desiertos andinos del Nordeste Argentino. *Darwiniana*. 21:492-539.
- Ruttink, T., M. Arend, K. Morreel, V. Storme, S. Rombauts, J. Fromm, R.P. Bhalerao, W. Boerjan and A. Rohde 2007. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell*. 19:2370-2390.
- Ryu, S.B., A. Costa, Z.G. Xin and P.H. Li 1995. Induction of Cold-Hardiness by Salt Stress Involves Synthesis of Cold-Responsive and Abscisic Acid-Responsive Proteins in Potato (*Solanum-Commersonii* Dun). *Plant and Cell Physiology*. 36:1245-1251.
- Ryppö, A., T. Repo and E. Vapaavuori 1998. Development of freezing tolerance in roots and shoots of Scots pine seedlings at nonfreezing temperatures. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*. 28:557-565.
- Sachs, J. 1864. Ueber die obere Temperatur-Grenze der vegetation. *Flora*. 47:5-12, 24-29, 33-39, 65-75.
- Sakai, A. 1956. The effect of temperature on the maintenance of the frost hardiness. *Low Temp. Sci. Ser.* B14:1-6.
- Sakai, A. 1960a. The frost hardening process of woody plant. VIII Relation of polyhydric alcohol to frost hardiness. *Low Temp. Sci. Ser.* B18:15-22.
- Sakai, A. 1960b. Survival of the Twig of Woody Plants at -196[deg] C. *Nature*. 185:393-394.
- Sakai, A. 1961. Effect of Polyhydric Alcohols to Frost Hardiness in Plants. *Nature*. 189:416-417.
- Sakai, A. 1962. Studies on frost hardiness of woody plants. I. The causal relation between sugar content and frost hardiness. *Contr Inst Low temp Sci* B11:1-40.
- Sakai, A. 1966a. Temperature Fluctuation in Wintering Trees. *Physiologia Plantarum*. 19:105-114.
- Sakai, A. 1966b. Seasonal variations in the amount of polyhydric alcohol and sugar in fruit trees. *Journal of Horticultural Science*. 41:207-213.
- Sakai, A. 1966c. Studies of frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. *Plant Physiology*. 41:353-359.
- Sakai, A. and W. Larcher 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. In *Ecological studies*. Springer Verlag, Berlin, p. 321 pp.
- Sakai, A. and C.J. Weiser 1973. Freezing Resistance of Trees in North America with Reference to Tree Regions. *Ecology*. 54:118-126.
- Sakai, A. and S. Yoshida 1968. The role of sugars and related compounds in variation of freezing resistance. *Cryobiology*. 5:160-174.
- Salt, R.W. 1958. Role of Glycerol in producing Abnormally Low Supercooling and Freezing Points in an Insect, *Bracon cephi* (Gahan). *Nature*. 181:1281-1281.
- Samach, A., H. Onouchi, S.E. Gold, G.S. Ditta, Z. Schwarz-Sommer, M.F. Yanofsky and G. Coupland 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*. 288:1613-1616.
- Sangwan, V., I. Foulds, J. Singh and R.S. Dhindsa 2001. Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *Plant Journal*. 27:1-12.
- Santarius, K.A. 1982. The mechanism of cryoprotection of biomembrane systems by carbohydrates. In *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications*. Vol. 2 Ed. S.A. Li P.H. Academic Press, New York, pp. 475-486.
- Sarvas, R. 1974. Investigations on the annual cycle of development of forest trees. 2. Autumn dormancy and winter dormancy. *Commun. Inst. for fenn.* 84:101 pp.
- Saure, M.C. 1985. Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Reviews*:239-300.
- Sauter, J.J. 1988. Temperature induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis* "robusta". *Journal of Plant Physiology*. 132:608-612.
- Sauter, J.J. and T. Ambrosius 1986. Changes in the partitioning of carbohydrates in the wood during bud break in *Betula pendula* Roth. *Journal of Plant Physiology*. 124:31-43.
- Sauter, J.J., D. Elle and W. Witt 1998. A starch granule bound endoamylase and its possible role during cold acclimation of parenchyma cells in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench "robusta"). *Journal of Plant Physiology*. 153:739-744.
- Sauter, J.J., W. Iten and M.H. Zimmermann 1973. Studies on the release of sugar into the vessels of sugar maple (*Acer saccharum*). *Canadian Journal of Botany*. 51:1-8.
- Sauter, J.J. and B. Van Cleve 1991. Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. *Journal of Plant Physiology*. 139:19-26.
- Sauter, J.J. and B. Van Cleve 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. *Trees*:297-304.
- Sauter, J.J. and S. Wellenkamp 1998. Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the twig wood of *Salix caprea* L. *Holzforschung*. 52:255-262.
- Savitch, L.V., G.R. Gray and N.P.A. Huner 1997. Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta*. 201:18-26.
- Saxe, H., M.G.R. Cannell, O. Johnsen, M.G. Ryan and G. Vourlitis 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist*. 149:369-400.
- Schaffnirt, E. 1910. Studien über der einfluss neiderer temperaturen auf die pflanzliche. *Zell. Mitt. Kaiser-Wilhelm Inst. Landwirtsch. Bromberg*. 3:93-144.
- Scheumann, W. and S. Börtitz 1965. Studien zur physiologie der frosthärtung kei koniferen. *Biol. Zentralbl.* 84:489-500.
- Scheumann, W. and H. Schönbach 1968. Die prüfung des frostresistenz und ihre bestimmung an gehölzen im massentest. *Dtsch Akad Landwirtsch Wiss*. 100:45-54.
- Schoolfield, R.M., P.J.H. Sharpe and C.E. Magnuson 1981. Non-Linear Regression of Biological Temperature-Dependent Rate Models Based on Absolute Reaction-Rate Theory. *Journal of Theoretical Biology*. 88:719-731.
- Schrader, S. and J.J. Sauter 2002. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench < robusta >) and their possible role in carbohydrate metabolism. *Journal of Plant Physiology*. 159:833-843.
- Schreuders, P.D., E.D. Smith, K.W. Cole, M.D.P. Valencia, A. Laughinghouse and P. Mazur 1996. Characterization of intraembryonic freezing in *Anopheles gambiae* embryos. *Cryobiology*. 33:487-501.
- Schwartz, M.D. 2003. *Phenology: An Integrative Environmental Science*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Schwartz, M.W., L.R. Iverson and A.M. Prasad 2001. Predicting the potential future distribution of four tree species in ohio using current habitat availability and climatic forcing. *Ecosystems*. 4:568-581.
- Schwarz, W.v. 1970. Der einfluss der photoperiode auf das austreiben, die frosthärte und die hitzeresistenz von zirben und alpenrozen. *Flora*. 159:258-285.
- Schwintzer, C.R. 1971. Energy Budgets and Temperatures of Nyctinastic Leaves on Freezing Nights. *Plant Physiol*. 48:203-207.
- Segrest, J.P., H. Deloof, J.G. Dohlman, C.G. Brouillette and G.M. Anantharamaiah 1990. Amphipathic Helix Motif - Classes and Properties. *Proteins-Structure Function and Genetics*. 8:103-117.
- Seo, P.J., M.J. Kim, J.S. Song, Y.S. Kim, H.J. Kim and C.M. Park 2010. Proteolytic processing of an *Arabidopsis* membrane-bound NAC transcription factor is triggered by cold-induced changes in membrane fluidity. *Biochemical Journal*. 427:359-367.
- Shafer, S.L., P.J. Bartlein and R.S. Thompson 2001. Potential changes in the distributions of western North America tree and shrub taxa under future climate scenarios. *Ecosystems*. 4:200-215.

Références Bibliographiques

- Shearman, L.L., C.R. Olien, B.L. Marchetti and E.H. Everson 1973. Characterization of Freezing Inhibitors from Winter Wheat Cultivars I. *Crop Sci.* 13:514-519.
- Shimada, K. and E. Asahina 1975. Visualization of intracellular ice crystals formed in very rapidly frozen cells at -27 °C. *Cryobiology.* 12:209-218.
- Shimizu, S. and H. Mori 1998. Analysis of cycles of dormancy and growth in pea axillary buds based on mRNA accumulation patterns of cell cycle related genes. *Plant and Cell Physiology.* 39:255-262.
- Shinwari, Z.K., K. Nakashima, S. Miura, M. Kasuga, M. Seki, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki 1998. An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 250:161-170.
- Shmueli, E. 1960. Chilling and frost damage in banana leaves. *Bull. Res. Counc Isr.* 8D:225-288.
- Shutova, E., F.E. Wielgolaski, S.R. Karlsen, O. Makarova, N. Berlina, T. Filimonova, E. Haraldsson, P.E. Aspholm, L. Flo and K.A. Hogda 2006. Growing seasons of Nordic mountain birch in northernmost Europe as indicated by long-term field studies and analyses of satellite images. *International Journal of Biometeorology.* 51:155-166.
- Siddiqui, K.S. and R. Cavicchioli 2006. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry.* 75:403-433.
- Siegel, D.P. 1987. Membrane-membrane interactions via intermediates in lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions. In *Cell Fusion* Ed. A.E. Sowers. Plenum Press, New York, pp. 181-207.
- Siminovich, D. and Y. Cloutier 1982. 24-Hour Induction of Freezing and Drought Tolerance in Plumules of Winter Rye Seedlings by Desiccation Stress at Room-Temperature in the Dark. *Plant Physiology.* 69:250-255.
- Siminovich, D., B. Rheume, K. Pomeroy and M. Lepage 1968. Phospholipid, protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black locust tree cells. *Cryobiology.* 202-225.
- Siminovich, D., J. Singh and I.A. De La Roche 1978. Freezing behavior of free protoplasts of winter rye. *Cryobiology.* 15:205-213.
- Siminovich, D., C.M. Wilson and D.R. Briggs 1953. Studies on the Chemistry of the Living Bark of the Black Locust in Relation to Its Frost Hardiness. V. Seasonal Transformations and Variations in the Carbohydrates: Starch-Sucrose Interconversions. *Plant Physiol.* 28:383-400.
- Simons, R.K. 1959. Anatomical and morphological responses of four varieties of apples to frost injury. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science.* 74:10-24.
- Simons, R.K. 1969. Tissue response of young developing apple fruits to freeze injury. *Journal of American Society for Horticultural Science.* 94:376-382.
- Simons, R.K. and C.C. Doll 1976. Morphological and Anatomical Response of Apples to a Late Spring Frost in Relation to Stage of Fruit Development. *Journal of the American Society for Horticultural Science.* 101:315-320.
- Simons, R.K., F.N. Hewetson and M.C. Chu 1970. Fruit tissue injury by frost to 'York Imperial' apples. *Journal of American Society of Horticultural Science.* 95:821-827.
- Simons, R.K. and R.V. Lott 1963. The morphological and anatomical development of apple injured by late spring frost. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 83: 88-100.
- Smeeton, R. 1964. Late spring frost damage to apple shoots in the nursery. *Rep. E. Mallng Res. Sta. for 1963* A47:73-74.
- Smith, D. 1968. Varietal chemical differences associated with freezing resistance in forage plants. *Cryobiology.* 5:148-159.
- Smith, M.N. and C.R. Olien 1981. Recovery from winter injury. In *Analysis and improvement of plant cold hardiness.* Ed. S.M.N. Olien C.R. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 117-138.
- Smits-Spinks, B., B.T. Swanson and A.H. Markhart 1985. The Effect of Photoperiod and Thermoperiod on Cold-Acclimation and Growth of *Pinus-Sylvestris*. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere.* 15:453-460.
- Snedden, W.A. and H. Fromm 2001. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist.* 151:35-66.
- Soitamo, A.J., M. Piippo, Y. Allahverdiyeva, N. Battchikova and E.M. Aro 2008. Light has a specific role in modulating Arabidopsis gene expression at low temperature. *Bmc Plant Biology.* 8
- Somers, D.E., P.F. Devlin and S.A. Kay 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science.* 282:1488-1490.
- Sparks, J.P., G.S. Campbell and R.A. Black 2001. Water content, hydraulic conductivity, and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: a TDR case study. *Oecologia.* 127:468-475.
- Sperry, J.S., J.R. Donnelly and M.T. Tyree 1988. Seasonal occurrence of xylem embolism in sugar maple (*Acer saccharum*). *American Journal of Botany.* 75:1212-1218.
- Sperry, J.S. and J.E.M. Sullivan 1992. Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous and conifer species. *Plant Physiology.* 100:605-613.
- Sperry, J.S. and M.T. Tyree 1988. Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology.* 88:581-587.
- Stattin, E., C. Hellqvist and A. Lindstrom 2000. Storability and root freezing tolerance of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere.* 30:964-970.
- Steffen, K.L., R. Arora and J.P. Palta 1989. Relative Sensitivity of Photosynthesis and Respiration to Freeze-Thaw Stress in Herbaceous Species - Importance of Realistic Freeze-Thaw Protocols. *Plant Physiology.* 89:1372-1379.
- Steponkus, P.L. 1981. Responses to extreme temperatures. Cellular and sub-cellular bases. In *Encyclopedia of plant physiology* Eds. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 371-402.
- Steponkus, P.L., M.P. Garber, S.P. Myers and R.D. Lineberger 1977. Effects of cold acclimation and freezing on structure and function of chloroplast thylakoids. *Cryobiology.* 14:303-321.
- Steponkus, P.L., D.G. Stout, J. Wolfe and R.V.E. Lovelace 1984. Freeze-Induced Electrical Transients and Cryoinjury. *Cryo-Letters.* 5:343-348.
- Steponkus, P.L., M. Uemura, R.A. Balsamo, T. Arvinte and D.V. Lynch 1988. Transformation of the Cryobehavior of Rye Protoplasts by Modification of the Plasma-Membrane Lipid-Composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 85:9026-9030.
- Stergios, B.G. and G.S. Howell 1977. Effects of Defoliation, Trellis Height, and Cropping Stress on Cold Hardiness of Concord Grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 28:34-42.
- Stockinger, E.J., S.J. Gilmour and M.F. Thomashow 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 94:1035-1040.
- Stösser, R. and S.F. Anvari 1982. On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae.* 16:29-38.
- Strati, S., S. Patino, C. Slidders, E.P. Cundall and M. Mencuccini 2003. Development and recovery from winter embolism in silver birch: seasonal patterns and relationships with the phenological cycle in oceanic Scotland. *Tree Physiology.* 23:663-673.
- Sugio, A., R. Dreos, F. Aparicio and A.J. Maule 2009. The Cytosolic Protein Response as a Subcomponent of the Wider Heat Shock Response in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21:642-654.
- Sun, W.Q. 1999. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: Relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology.* 38:372-385.
- Tahtiharju, S. and T. Palva 2001. Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal.* 26:461-470.
- Tanino, K., C.J. Weiser, L.H. Fuchigami and T.H.H. Chen 1990. Water-Content During Abscisic-Acid Induced Freezing Tolerance in Bromegrass Cells. *Plant Physiology.* 93:460-464.
- Tappeiner, U. 1985. Bestandesstruktur, Mikroklima und Energiehaushalt einer naturnahen Almweide und einer begrüneten Schipistenplanierung im gasteiner tal (Hohe Tauern). Innsbruck.
- Taschler, D., B. Beikircher and G. Neuner 2004. Frost resistance and ice nucleation in leaves of five woody timberline species measured in situ during shoot expansion. *Tree Physiology.* 24:331-337.
- Taulavuori, E., M. Tahkokorpi, K. Taulavuori and K. Laine 2004a. Anthocyanins and glutathione S-transferase activities in response to low temperature and frost hardening in *Vaccinium myrtillus* (L.). *Journal of Plant Physiology.* 161:903-911.

Références Bibliographiques

- Taulavuori, K., K. Laine, E. Taulavuori, T. Pakonen and E. Saari 1997b. Accelerated dehardening in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) induced by a small elevation in air temperature. *Environmental Pollution*. 98:91-95.
- Taulavuori, K., A. Niinimaa, K. Laine, E. Taulavuori and P. Lahdesmaki 1997a. Modelling frost resistance of Scots pine seedlings using temperature, daylength and pH of cell effusate. *Plant Ecology*. 133:181-189.
- Taulavuori, K., M. Sarala and E. Taulavuori 2009. Growth responses to changing light environment. *Prog Bot*. 71
- Taulavuori, K.M.J., E.B. Taulavuori, O. Skre, J. Nilsen, B. Igeland and K.M. Laine 2004b. Dehardening of mountain birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii*) ecotypes at elevated winter temperatures. *New Phytologist*. 162:427-436.
- Thomas, D.J., J.B. Thomas, S.D. Prier, N.E. Nasso and S.K. Herbert 1999. Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Plant Physiology*. 120:275-282.
- Thomas, F.M., G. Meyer and M. Popp 2004. Effects of defoliation on the frost hardness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Annals of Forest Science*. 61:455-463.
- Thomas, W.D. and A. Lazenby 1968. Growth cabinet studies into cold-tolerance of *Festuca arundinacea* populations: II. Responses to pretreatment conditioning and to number and duration of low temperature periods. *The Journal of Agricultural Science*. 70:347-353.
- Thomashow, M.F., S.J. Gilmour, E.J. Stockinger, K.R. Jaglo-Ottosen and D.G. Zarka 2001. Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum*. 112:171-175.
- Thomson, W.W. and K.A. Plat-Aloia 1987. Ultrastructure and senescence in plants. In *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology* Eds. W.W. Thomson, E.A. Nothnagai and R.C. Huffaker. American Society of Plant Physiology, Rockville, pp. 20-30.
- Till, O. 1956. Über die frosthärte von pflanzen sommergrüner laubwälder. *Flora*. 143:499-542.
- Timmis, R., J. Flewelling and C. Talbert 1994. Frost injury prediction model for Douglas-fir seedlings in the Pacific northwest. *Tree Physiology*. 14:855-869.
- Tinus, R.W., K.E. Burr, N. Atzmon and J. Riov 2000. Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. *Tree Physiology*. 20:1097-1104.
- Toner, M., E.G. Cravalho and M. Karel 1990. Thermodynamics and Kinetics of Intracellular Ice Formation During Freezing of Biological Cells. *Journal of Applied Physics*. 67:1582-1593.
- Tranquillini, W. 1979. *Physiological Ecology of the Alpine Timberline*. Springer-Verlag, Berlin.
- Tremblay, M.F. and M. Lalonde 1987. Effect of Photoperiod and Temperature on the Development of Frost Hardiness in 3 *Alnus* Species. *Physiologia Plantarum*. 70:327-331.
- Tumanov, I.I. 1931. Das abhärten winterannueller pflanzen gegen niedrige temperaturen. *Phytopathol. Z.* 3:303-334.
- Tumanov, I.I. 1969. *Physiology of plants not killed by frost*. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol. 4:469-480.
- Tumanov, I.I., G.V. Kuzina and L.D. Karnikova 1965. Effect of photoperiod on the frost resistance of apricots and black currants. *Fiziol Rast* 12:665-682.
- Tumanov, I.I., G.V. Kuzina and L.D. Karnikova 1972. Effect of the duration of vegetation in trees on the accumulation of reserve carbohydrates and the character of photoperiodic reaction. *Fiziol Rast* 19:1122-1131.
- Tumanov, I.I., G.V. Kuzina and L.D. Karnikova 1973. Dormancy and the capacity of woody plants for hardening at low temperatures. *Fiziologiya Rastenii*. 20:5-16.
- Turcotte, A., H. Morin, C. Krause, A. Deslauriers and M. Thibeault-Martel 2009. The timing of spring rehydration and its relation with the onset of wood formation in black spruce. *Agricultural and Forest Meteorology*. 149:1403-1409.
- Tyree, M.T. and H. Cochard 1996. Summer and winter embolism in oak. Impact on water relations. *Annales des Sciences forestières*. 53:173-180.
- Uemura, M., R.A. Joseph and P.L. Steponkus 1995. Cold-Acclimation of *Arabidopsis-Thaliana* - Effect on Plasma-Membrane Lipid-Composition and Freeze-Induced Lesions. *Plant Physiology*. 109:15-30.
- Uemura, M., Y. Tominaga, C. Nakagawara, S. Shigematsu, A. Minami and Y. Kawamura 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*. 126:81-89.
- Uno, Y., T. Furihata, H. Abe, R. Yoshida, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:11632-11637.
- Urrutia, M.E., J.G. Duman and C.A. Knight 1992. *Plant Thermal Hysteresis Proteins*. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1121:199-206.
- Van der Schoot, C. 1996. Dormancy and symplasmic Networking at the Shoot Apical Meristem. In *Plant dormancy - Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* Ed. G.A. Lang. CAB International, Wallingford, pp. 59-81.
- Van 't Hoff, J.H. 1884. *Études de la dynamique chimique*.
- Vasil-Yev, I.M. 1961. *Wintering of plants*. American Institute of Biological Sciences, Washington D.C.
- Vaultier, M.N., C. Cantrel, C. Vergnolle, A.M. Justin, C. Demandre, G. Benhassaine-Kesri, D. Cicek, A. Zachowski and E. Ruelland 2006. Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *Febs Letters*. 580:4218-4223.
- Vegis, A. 1973. Dependence of growth processes on temperature. In *Temperature and life* Eds. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel and W. Larcher. Springer-Verlag, Berlin, pp. 145-169.
- Veisz, O., G. Galiba and J. Sutka 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardness of wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 149:439-443.
- Veisz, O., G. Galiba and J. Sutka 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardness of wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 149:439-443.
- Vigh, L., H. Nakamoto, J. Landry, A. Gomez-Munoz, J.L. Harwood and I. Horvath 2007. Membrane regulation of the stress response from prokaryotic models to mammalian cells. In *Stress Responses in Biology and Medicine - Stress of Life in Molecules, Cells, Organisms, and Psychosocial Communities* Eds. P. Csermely, T. Korcsmaros and K. Sulyok. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 40-51.
- Vitasse, Y., A.J. Porte, A. Kremer, R. Michalet and S. Delzon 2009. Responses of canopy duration to temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*. 161:187-198.
- von Fircks, H.A. 1985. Frost hardness of fast-growing *Salix* species. In *Plant production in the north*. Eds. Å. Kaurin, O. Junttila and J. Nilsen. Norwegian Univ. Press, Oslo, pp. 199-204.
- von Koskull-Doring, P., K.D. Scharf and L. Nover 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science*. 12:452-457.
- Walther, G.R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T.J.C. Beebee, J.M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg and F. Bairlein 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature*. 416:389-395.
- Wang, J., N.E. Ives and M.J. Lechowicz 1992. The relation of foliar phenology to xylem embolism in trees. *Functional Ecology*. 6:469-475.
- Wang, S.Y. and M. Faust 1990. Changes of membrane lipids in apple buds during dormancy and budbreak. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 115:803-808.
- Wang, S.Y. and M. Faust 1994. Changes in the antioxidant system associated with budbreak in "Anna" apple (*Malus domestica* Borkh) buds. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*. 119:735-741.
- Wang, S.Y., H.J. Jiao and M. Faust 1991. Changes in Metabolic Enzyme-Activities During Thidiazuron-Induced Lateral Budbreak of Apple. *Hortscience*. 26:171-173.
- Wardle, P. 1971. An explanation for alpine timberline. *New Zealand Journal of Botany*. 9:371-402.
- Wareing, P.F. 1954. Growth studies in woody species. 6. The locus of photoperiodic perception in relation to dormancy. *Physiologia Plantarum*:261-277.
- Wareing, P.F. and I.D.J. Phillips 1978. *The control of growth and differentiation in plants*. Pergamon Press, Oxford.

Références Bibliographiques

- Warmund, M.R., F. Takeda and G.A. Davis 1992. Supercooling and Extracellular Ice Formation in Differentiating Buds of Eastern Thornless Blackberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117:941-945.
- Wei, H., A.L. Dhanaraj, R. Arora, L.J. Rowland, Y. Fu and L. Sun 2006. Identification of cold acclimation-responsive Rhododendron genes for lipid metabolism, membrane transport and lignin biosynthesis: importance of moderately abundant ESTs in genomic studies. *Plant, Cell and Environment*. 29:558-570.
- Weinberger, J.H. 1950. Chilling requirements of peach varieties. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 56:122-128.
- Weinberger, J.H. 1967. Some temperature relations in natural breaking of the rest of peach flower buds in the San Joaquin Valley, California. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 91:84-89.
- Weiser, C.J. 1970. Cold resistance and acclimation in woody plants. In *Cold hardiness, dormancy and freeze protection of fruit crops* Ed. L.R. P., Pullman, Wash., (USA), pp. 403-410.
- Welling, A., P. Kaikuranta and P. Rinne 1997. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*. Involvement of ABA and dehydrins. *Physiologia Plantarum*. 100:119-125.
- Welling, A., T. Moritz, E.T. Palva and O. Junttila 2002. Independent activation of cold acclimation by low temperature and short photoperiod in hybrid aspen. *Plant Physiology*. 129:1633-1641.
- Welling, A. and E.T. Palva 2006. Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiologia Plantarum*. 127:167-181.
- Westwood, M.N. 1993. *Temperate-zone Pomology: Physiology and Culture*. Timber Press, Portland.
- White, M.A., S.W. Running and P.E. Thornton 1999. The impact of growing-season length variability on carbon assimilation and evapotranspiration over 88 years in the eastern US deciduous forest. *International Journal of Biometeorology*. 42:139-145.
- White, M.A., P.E. Thornton and S.W. Running 1997. A continental phenology model for monitoring vegetation responses to interannual climatic variability. *Global Biogeochemical Cycles*. 11:217-234.
- Wigge, P.A., M.C. Kim, K.E. Jaeger, W. Busch, M. Schmid, J.U. Lohmann and D. Weigel 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. 309:1056-1059.
- Williams, B., M. Kabbage, R. Britt and M.B. Dickman 2010. AtBAG7, an *Arabidopsis* Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:6088-6093.
- Williams, B.J., N.E. Pellett and R.M. Klein 1972. Phytochrome control of growth cessation and initiation of cold acclimation in selected woody plants. *Plant Physiol*. 50:262-5.
- Williams, R.J. 1992. Anomalous Behavior of Ice in Solutions of Ice-Binding Arabinoxylans. *Thermochimica Acta*. 212:105-113.
- Williams, R.R. 1970. Factors affecting pollination in fruit trees. In *Physiology of Tree Crops*. Eds. L.C. Luckwill and C.V. Cutting. Academic Press, London, pp. 193-207.
- Winkler, A. 1913. Über den Einfluss des ausserbedingungen auf die Kälteresistenz ausdauernder gewächse. *Jahrb. Wiss. Bot.* 52:467-506.
- Wisniewski, M. and M. Fuller 1999. Ice nucleation and deep supercooling in plants: new insights using infrared thermography. In *Cold adapted organisms-Ecology, physiology, enzymology and molecular biology* Eds. R. Margesin and F. Schinner. Springer, Berlin, pp. 105-118.
- Wisniewski, M., S.E. Lindow and E.N. Ashworth 1997. Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *Plant Physiology*. 113:327-334.
- Withers, L.A. and P.J. King 1979. Proline: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Cultured Cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol*. 64:675-678.
- Witt, W., A. Buchholz and J.J. Sauter 1995. Binding of endoamylase to native starch grains from poplar wood. *Journal of Experimental Botany*. 46:1761-1769.
- Witt, W. and J.J. Sauter 1994a. Enzymes of Starch Metabolism in Poplar Wood During Fall and Winter. *Journal of Plant Physiology*. 143:625-631.
- Witt, W. and J.J. Sauter 1994b. Starch Metabolism in Poplar Wood Ray Cells During Spring Mobilization and Summer Deposition. *Physiologia Plantarum*. 92:9-16.
- Witt, W. and J.J. Sauter 1995. Partial purification of amylases and starch phosphorylases from poplar wood. *Journal of Plant Physiology*. 146:15-21.
- Wittaker, R.H. 1975. *Communities and ecosystems*. Macmillan, New York.
- Wolber, P.K. 1993. Bacterial Ice Nucleation. In *Advances in Microbial Physiology*, Vol 34. Academic Press Ltd, London, pp. 203-237.
- Woldendorp, G., M.J. Hill, R. Doran and M.C. Ball 2008. Frost in a future climate: modelling interactive effects of warmer temperatures and rising atmospheric [CO₂] on the incidence and severity of frost damage in a temperate evergreen (*Eucalyptus pauciflora*). *Global Change Biology*. 14:294-308.
- Wolfe, J. 1978. Chilling injury in plants. The role of membrane lipid fluidity. *Plant, Cell and Environment*. 1:241-247.
- Wolfe, J. and G. Bryant 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*. 39:103-129.
- Wolfe, J. and G. Bryant 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration-Revue Internationale Du Froid*. 24:438-450.
- Wolfe, J., G. Bryant and K.L. Koster 2002. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? *Cryoletters*. 23:157-166.
- Wolfe, J., M.F. Dowgert and P.L. Steponkus 1985. Dynamics of membrane exchange of the plasma membrane and the lysis of isolated protoplasts during rapid expansions in area. *J. Membrane Biol*. 86:127-138.
- Wong, B.L., K.L. Baggett and A.H. Rye 2003. Seasonal patterns of reserve and soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. 81:780-788.
- Woodward, F.I. 1987. Climate and plant distribution. In *Cambridge Studies in Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 174 pp.
- Xiong, L.M., M. Ishitani, H. Lee and J.K. Zhu 2001. The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*. 13:2063-2083.
- Xue, G.P. 2003. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *Plant Journal*. 33:373-383.
- Yamada, K., Y. Fukao, M. Hayashi, M. Fukazawa, I. Suzuki and M. Nishimura 2007. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 282:37794-37804.
- Yamaguchi, A., Y. Kobayashi, K. Goto, M. Abe and T. Araki 2005. TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant and Cell Physiology*. 46:1175-1189.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki 1994. A Novel Cis-Acting Element in an *Arabidopsis* Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell*. 6:251-264.
- Yano, R., M. Nakamura, T. Yoneyama and I. Nishida 2005. Starch-related alpha-glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138:837-846.
- Yelenosky, G. 1979. Water-stress-induced cold hardening of young Citrus trees. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 104:270-273.
- Ylimaki, A. 1962. The effect of snow cover on temperature conditions in the soil and overwintering of field crops. *Annales Agricoltae Fenniae*. 1:192-216.
- Yoon, Y., J. Pope and J. Wolfe 2003. Freezing stresses and hydration of isolated cell walls. *Cryobiology*. 46:271-276.
- Yoon, Y.H., J.M. Pope and J. Wolfe 1998. The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. *Biophysical Journal*. 74:1949-1965.
- Yoshida, S. and A. Sakai 1968. The effect of thawing rate on freezing injury in plants. *Low Temp. Sci. Ser.* 26:23-31.

Références Bibliographiques

- Yoshida, S. and A. Sakai 1973. Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem. *Plant and Cell Physiology*. 14:353-359.
- Yoshida, S. and M. Uemura 1990. Responses of the plasma membrane to cold acclimation and freezing stress. In *The plant plasma membrane*. Eds. C. Larsson and I.M. Møller. Springer-Verlag., Berlin, pp. 293-319.
- Yoshie, F. and A. Sakai 1981. Freezing resistance of plants in relation to their life form and habitat. *Japanese Journal of Ecology*. 31:395-404.
- Yu, X.M. and M. Griffith 1999. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. *Plant Physiology*. 119:1361-1369.
- Yun, K.Y., M.R. Park, B. Mohanty, V. Herath, F.Y. Xu, R. Mauleon, E. Wijaya, V.B. Bajic, R. Bruskiwich and B.G. de los Reyes 2010. Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress. *Bmc Plant Biology*. 10
- Zalasky, H. 1975a. Chimeras, hyperplasia and hypoplasia in frost burls induced by low temperature. *Canadian Journal of Botany* 53:1888-1898.
- Zalasky, H.L. 1975b. Low temperature induced cankers and buds in test conifers and hardwoods. *Canadian Journal of Botany*. 53:2526-2535.
- Zarka, D.G., J.T. Vogel, D. Cook and M.F. Thomashow 2003. Cold induction of Arabidopsis CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*. 133:910-918.
- Zhang, X.Y., M.A. Friedl, C.B. Schaaf and A.H. Strahler 2004. Climate controls on vegetation phenological patterns in northern mid- and high latitudes inferred from MODIS data. *Global Change Biology*. 10:1133-1145.
- Zhao, L., F.X. Liu, W.Y. Xu, C. Di, S.X. Zhou, Y.B. Xue, J.J. Yu and Z. Su 2009. Increased expression of OsSPX1 enhances cold/subfreezing tolerance in tobacco and Arabidopsis thaliana. *Plant Biotechnology Journal*. 7:550-561.
- Zhou, Y., X.D. Sun and M. Ni 2007. Timing of photoperiodic flowering: Light perception and circadian clock. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49:28-34.
- Zhu, J.J. and E. Beck 1991. Water Relations of Pachysandra Leaves During Freezing and Thawing - Evidence for a Negative-Pressure Potential Alleviating Freeze-Dehydration Stress. *Plant Physiology*. 97:1146-1153.
- Zhu, X.B., R.M. Cox and P.A. Arp 2000. Effects of xylem cavitation and freezing injury on dieback of yellow birch (*Betula alleghaniensis*) in relation to a simulated winter thaw. *Tree Physiology*. 20:541-547.
- Zhu, X.B., R.M. Cox, C.P.A. Bourque and P.A. Arp 2002. Thaw effects on cold-hardiness parameters in yellow birch. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*. 80:390-398.
- Ziegler, J. 1879. Über phänologische beobachtungen und termische vegetations. Konstanten zivei vorträge. Jahresbed. Senkenberg. naturf. ges. Frankfurt a. M.
- Ziegler, P. and O. Kandler 1980. Tonoplast stability as a critical factor in frost injury and hardening of spruce (*Picea abies* L.) needles. *Pflanzenphysiologie*. 99:393-410.
- Zweifel, R. and R. Hasler 2000. Frost-induced reversible shrinkage of bark of mature subalpine conifers. *Agricultural and Forest Meteorology*. 102:213-222.
- Zwiazek JJ, Renault S, Croser C, Hansen J and B. E 2001. Biochemical and biophysical changes in relation to cold hardiness. In *Conifer cold hardiness* Ed. C.S. Bigras FJ. Kluwer, Dordrecht, pp. 165-18.

Annexe 1 : Limite altitudinale potentielle des arbres et résistances au gel

Article soumis à *Physiologia plantarum* le 07/12/2010



How potential altitudinal limit of trees is related to frost resistances?

Guillaume Charrier^{1,2}, Hervé Cochard^{1,2}, Thierry Améglio^{1,2,*}

¹ INRA, UMR547 PIAF, F-63100 CLERMONT-FERRAND, France

² Université Blaise Pascal, UMR547 PIAF, F-63 AUBIERE, France

* *Correspondence: THIERRY AMÉGLIO, U.M.R. PIAF (INRA - Univ. Blaise Pascal), Site INRA de Crouël, 234 av. du Brezet, F-63100 Clermont-Ferrand Cedex 2, France*

Phone number: (33) (0)4 73 62 43 69

Fax number: (33) (0)4 73 62 44 54

E-Mail: ameglio@clermont.inra.fr

Abstract

Winter biology of eleven European tree species was monitored to investigate frost resistances mechanisms at the interspecific level from November until budburst. Those resistances were frost hardiness of living cells (estimated by Lethal Temperature of 50% of cells: LT50), winter embolism sensitivity (estimated by Percentage of Loss of Conductivity: PLC) and phenological variation of most sensitive stage in annual cycle (estimated by Thermal Time until budburst: TT). Differences observed between tree species were related to potential altitudinal limit which is highly dependent of frost exposure. Despite a close relationship was not established between LT50 and PLC for lowland and low mountain species, high mountain species showed significant enhancement for living cell and xylem frost resistances, but not for TT. Thus, LT50 and PLC seasonal change were relatively related to potential altitudinal limit. Moreover results from this study suggests that living cells' frost resistance and winter embolism sensitivity could be used as good indicators of potential altitudinal limit when combined. Some physiological mechanisms inherent to winter biology and altitudinal limit were observed among a larger panel of species than expected. Dehydration of trees during winter and rehydration before spring made them more resistant to freezing temperature. This effect was increased by cryoprotective compounds. Winter embolism, diameter of vessels and altitudinal limit were highly correlated. Some resorption mechanisms were generated during winter. Stem pressure through carbohydrates increased raise sap osmolarity and generated xylem pressure in *Fagus sylvatica* and *Juglans regia x nigra*. Root pressure was probably involved just before budburst in order to restore sap connection and fluxes whereas some species were totally resistant to embolism formation within studied area or extremely sensitive with no restoration capacity. Monitoring different winter resistance traits, this study give some new elements in understanding what the adaptations driving altitudinal limits for trees are.

Keywords index: cold hardiness, LT₅₀, embolism, xylem pressure, carbohydrate, water content, sap osmolarity, winter biology

Abbreviations: LT₅₀: the lethal temperature causing the lyse of 50% of the cells

Introduction

During winter perennial plants are able to increase the tolerance of perennial parts and avoid the exposure of sensitive parts (new leaves/needles). Winter freezing tolerance is one of the key factors limiting survival and distribution of plants in many ecosystems (Sakai and Larcher 1987; Pockman and Sperry 1997; Ewers et al. 2003). Freezing survival of plants involves tolerance of living tissues and of nonliving water transport system function in stems (Pratt et al. 2005).

On one hand, damage and subsequent death may occur when intracellular water freezes or when cells dehydrate too much due to extracellular freezing of sap (Sakai and Larcher 1987; Améglio et al. 2001a). Thus, plants from temperate regions show in the course of the year dramatic changes in their resistance to freezing temperatures. Cold hardening, a survival strategy, is under genetic control (Xin & Browse, 2000). This one starts late in the growing season as day length shortens and as temperature declines (Huner et al. 1998; Li et al., 2003). These environmental cues cause physiological and biochemical changes in the plant inducing greater tolerance (Levitt 1980). In particular, the dynamics of stem carbohydrate reserves (especially starch to soluble sugars inter-conversion) have been largely investigated in relation to frost resistance (Siminovitch et al. 1953; Sakai 1966; Sakai & Larcher 1987; Sauter & Kloth 1987; Tinus et al. 2000; Morin et al. 2007; Poirier et al., 2010). An additional relevant factor is the water status. Many studies proved a decline in the water content of tissues when plants acclimate to low temperatures (Chen et al. 1976; Chen & Gusta 1978; Tanino et al. 1990; Ögren 1999; Gusta et al. 2004).

On the other hand, freeze-thaw event is one of the main factors that can induce embolism in plant xylem (Tyree and

Cochard 1996). The occurrence of frost-induced embolism has been related to geographical distribution of plant species (Langan et al. 1997; Pockman and Sperry 1997). The embolism in vessels is assumed to be a consequence of the freeze-thaw alternation (Zimmermann 1983; Cochard and Tyree 1990; Just and Sauter 1991; Améglio et al. 1995; Pockman and Sperry 1997; Améglio et al. 2002). As the sap freezes, dissolved gases escape due to their very low solubility in ice (Sperry and Sullivan 1992). During subsequent thawing, these bubbles can either dissolve back into the xylem sap or expand until the entire xylem conduit is obstructed (Yang and Tyree 1992). This obstructed conduit will no longer contribute to water transport. Mean diameter of the conduit is one of the most important parameter in the winter embolism sensitivity (Davis et al. 1999; Sperry and Robson 2001; Pittermann and Sperry 2003, 2006). For coniferous species, freezing events causes generally little damage to xylem (Sperry and Sullivan 1992). Lately Mayr et al (2007) showed that lower water potential and a very large number of freeze-thaw events are also critical parameters in embolism formation for conifer species. In the opposite, for ring-porous species such as *Quercus* (Cochard and Tyree 1990) or *Fraxinus* (Cochard et al. 1997), a single freeze-thaw event may be enough to damage most xylem conduits. Generally, the number of obstructed xylem conduits increases progressively over winter for diffuse-porous species like *Acer* (Sperry and Sullivan 1992) or *Fagus* (Borghetti et al. 1993; Cochard et al. 2001), whereas in *Juglans* (Améglio et al. 1995; Améglio et al. 2002) the embolism rate decreases during winter.

Sap circulation has to be restored before budburst for deciduous trees and different mechanisms have been characterized as possible ways to do that (Cochard et al. 2001): the development of new functional vessels and/or the refilling through an active mechanism (Ewers et al.

2001). Development of a new ring is common to all plant species exhibiting a secondary cambium, but its efficiency at budbreak time depends on the time of radial growth resumption vs. budburst. Several authors (Sperry et al. 1987; Sperry et al. 1988; Améglio et al. 1995; Hacke and Sauter 1996; Ewers et al. 2001; Améglio et al. 2002, 2004) investigated the second mechanism: the vessel refilling through positive pressures in xylem. Depending on timing, mechanisms generating this pressure are different. Some species (i.e. Juglans or Acer) exhibit positive pressures in the xylem sap during the winter associated with high xylem sap content in sugars and high osmolarity (Améglio and Cruiziat 1992; Améglio et al. 1995). A positive pressure of xylem sap is also found during autumn and spring (Ewers et al. 2001), associated with mineral nutrition and soil temperature. Conversely, in several species (i.e. mainly ring porous and conifer species), positive pressure has never been observed. Finally, active refilling has also been observed in the presence of high xylem tensions; however, the mechanism underlying this process has not been identified (Holbrook and Zwieniecki 1999, Tyree et al. 1999; Salleo et al 2006). In stem pressure, the state of the living cells influences on the possibility to repair the embolism (Améglio et al., 2001b) while embolism appeared totally independent on the state of aerial living cells in root pressure mechanism.

Frost resistances could be monitored on different focuses: living cell resistances (frost induced lyses), non living water transport resistance (e.g. winter embolism), avoidance of spring frost for sensitive organs (early or late budburst). Those resistances and some physiological explaining mechanisms were concomitantly monitored on several common European tree species differing in frost sensitivity (e.g. altitudinal limit distribution as observed in France (Rameau et al., 1989; 1993) and growing in the same

area in Auvergne region. Thus, the first purpose of this study was to investigate and compare frost hardiness and embolism during the winter and to characterize the crucial parameters (some physical or physiological traits) explaining different strategies between species. The second purpose of this study was to focus on these frost resistance mechanisms according to distribution of these species (through their potential altitudinal limits) and understand which frost resistance is critical in distribution of trees.

Material and Methods

Plant material

Tree species were sampled in on two distant sites around Clermont-Ferrand (France) (~13 km): (i) Fontfreyde (45° 41' 58'' N, 2° 59' 55'' E, altitude 875 m), (ii) Crouël (45° 46' 27'' N, 3° 8' 36'' E, altitude 338 m). Fontfreyde is located in uplands and Crouel in lowland. In Fronfreyde sample site, there is birch (*Betula pendula*), beech (*Fagus sylvatica*), Scot pine (*Pinus sylvestris*), common oak (*Quercus robur*), hazelnut (*Corylus avellana*), hybrid walnut (*Juglans regia x nigra*). In Crouel sample site, there is sycamore (*Acer pseudoplatanus*), alder (*Alnus cordata*), hornbeam (*Carpinus betulus*), plum (*Prunus cerasifera*) and black locust (*Robinia pseudoacacia*) (Tab.1). One-year-old twigs were sampled on three trees of each tree species for four different times during leafless period: (i) after the fall for deciduous trees (November 8th), (ii, iii) two times in the core of winter (January 16th and February 13th), (iv) during the budburst time for each species.

Electrolyte leakage test (LT₅₀: frost resistance for Living cells)

The frost resistance of each individual species was estimated by using the

electrolyte leakage test (Zhang & Willison 1987; Sutinen *et al.* 1992). For each one-year-old twigs (n=3), they were cut into six 5-cm long segments without buds per date to assess frost hardiness. All fresh harvested segments were washed in distilled-deionised water and placed in a moistened tissue and wrapped in aluminum foil. Shoot segments were cooled to one of four sub-zero temperatures. In addition, there was an unfrozen control in a cold room at +5°C (control) and a lethal control in deep freezer at -80°C. In each case, sample temperatures were monitored using copper-constantan thermocouples inserted into the foil pouch. For control and lethal control, samples were cooled at the rate of $\approx 7^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ in pre-chilled vacuum flask. For temperature-controlled boxes, cooling and warming cycle were computer-controlled by a circulator bath (Ministat Huber, Offenburg, Germany) with external Pt100 into the chamber. A steady rate of cooling

and thawing of $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ and with freeze-thaw cycle between +5°C to respectively -5°C, -10°C; -20°C and -30°C was applied. Before thawing, the air temperature was maintained during 1h to the freeze temperature. Temperature were recorded with data logger (Campbell, Logan, United States) as one-minute averages and averaged at five minute intervals.

After this freezing treatment, the segments were cut into 5 mm-long sections and placed in glass vials with 15 ml of distilled-deionized water. The vials were shaken for 24 h at +5°C (limiting non frozen induced lysis) on a horizontal gravity shaker (ST5, CAT, Germany). The electrolytic conductivity of the water in which the stem segments were immersed (C1) was measured at room temperature with a conductimeter (Held Meter LF340, TetraCon® 325, Germany).

Samples were then autoclaved at +120°C for 30 min, cooled to room temperature, and a second conductivity measure (C₂) was done. Relative electrolytic leakage (REL) was calculated as $(C_1/C_2)*100$ as described in Zhang & Willison (1987). We assumed the following relationship between REL and percentage of cellular lysis (L) for each sample:

Frost hardiness (LT₅₀) was estimated as the temperature where we observed inflection point (C) of the logistic sigmoid function (Repo & Lappi, 1989)

$$REL = \frac{A}{(1 + e^{B(C-x)})} + D \quad (1)$$

where x is exposure temperature. The parameters A and D define the asymptotes of the function, and B is the slope at the inflection point C. The parameter estimation of Eq. (1) was performed by nonlinear regression using ExcelStat ver. 7.5.2. Mean LT₅₀ was calculated for each treatment from the individual LT₅₀ values.

Species	Altitudinal distribution	Potential altitudinal limit in France	Sample site
<i>Acer pseudoplatanus</i>	1: High mountain	1800	Crouël
<i>Alnus cordata</i>	2: Lowland and low mountain	1400	Crouël
<i>Betula pendula</i>	1: Lowland and mountain	2000	Fontfreyde
<i>Carpinus betulus</i>	3: Lowland	1000	Crouël
<i>Corylus avellana</i>	1: Lowland and low mountain	1700	Fontfreyde
<i>Fagus sylvatica</i>	1: Lowland and low mountain	1700	Fontfreyde
<i>Juglans regia x nigra</i>	3: Lowland	800	Fontfreyde
<i>Pinus sylvestris</i>	1: High mountain	2000	Fontfreyde
<i>Prunus cerasifera</i>	3: Lowland	800	Crouël
<i>Quercus robur</i>	2: Lowland and low mountain	1300	Fontfreyde
<i>Robinia pseudoacacia</i>	3: Lowland	700	Crouël

Table 1: Studied species and their potential altitudinal limit in France (cf Rameau *et al.* 1989, 1993)

Hydraulic conductivity of nonliving water transport system

Sampled twigs were kept the bottom immersed until percentage of loss of conductivity (PLC) was measured by Xyl'em device (Bronkhort, France, licensed INRA; described in Cochard et al., 2000). For each tree species, stem of 7 cm was prepared with scalpel, immersed in water to prevent air entry into vessels. Three replicates were done by species. A first measure of conductance was done using solution of KCL 0.1mol.l^{-1} at low pressure (0.350 kPa): initial conductance (k_i). After perfusion of the same solution at high pressure (140 kPa) for embolism resorption, conductance was measured again: maximal conductance (k_{max}). This step was repeated two times. The PLC was then calculated as: $(k_{\text{max}} - k_i) / k_{\text{max}}$.

Water content and sap osmolarity

A 40cm length stem was cut and used for Xylem Sap extraction using a vacuum pump. Extracted sap was weighted (SW) (Améglio et al. 2002) and osmolarity was measured with a Roebling 13DR automatic osmometer (Messtechnik, D-1000 Berlin, Germany). Following extraction of xylem sap, stem sample fresh weights (FW) were measured, then dry weight (DW) after seven days at 80 °C, and the water content was calculated as $((\text{FW}+\text{SW})-\text{DW})/\text{DW}$. Three replicates were done by tree species.

Extraction and quantify-cation of soluble carbohydrates

After sap extraction, stems (bark + xylem) were used for the quantification of soluble carbohydrates. Lyophilized samples ($m > 2\text{g}$) were ground into a powder that was used (50 mg) for extraction of soluble carbohydrates. It was extracted with 1 ml of mannitol (5g.l⁻¹) in ethanol 80%, and shaken for 30 min at

80°C, then centrifuged for 10 min at 15775g (SR2000, Prolabo, France). The supernatant was filtered in a cartridge containing AGX-1 anion-exchange resin (150 µl), polyvinylpyrrolidone (100 µl) and activated carbon (200 µl). The solid was melted three more times with ethanol 80% (1 ml), ethanol 50% (0.5 ml) and ethanol 80% (0.5 ml), before the cartridge was rinsed with 1 ml ethanol 80%. The liquid fraction was SpeedVac-dried for carbohydrates analysis and the solid was SpeedVac-dried for starch analysis. For carbohydrate analysis, dried samples were made soluble in 0.5 ml of water and separated on an Aminex-HPX87C column with a refractometer (R12000, Sopares). Soluble carbohydrates from the sap samples were also quantified using the same method.

To measure starch content, solid was melted with NaOH 0.02 N and autoclaved (2 h, 120°C, 1 bar). Samples were then incubated with amyloglucosidase (1h30', 52°C) in a microplate well, where each well contained 12 µl ATP ($5.10^{-4}\text{mol.l}^{-1}$), 12 µl NADP ($1.4.10^{-4}\text{mol.l}^{-1}$), 60 µl triethanolamine buffer (triethanolamine 0.48mol.l^{-1} , magnesium sulfate $1.10^{-2}\text{mol.l}^{-1}$, pH=7.6), 96 µl of water, and 12 µl of sample supernatant. A spectrophotometric measuring was made at 340 nm (Power Wave 200, BioTek instruments) as a blank before incubation with 10 µl of hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (*EC* 1.1.1.49) for 40 min under shaking after which another absorbance measurement was taken.

Mean diameter of vessels

For each tree species, cross sections of 20 µm thick were made on one year old stems using a microtome (Reichert ®) with a platinum-cooled Peltier (Mectron ®) and put between slide and covers glass. Two cuts were made by individuals on different twigs ($n=6$ per species). A digital picture of the vessels (magnification: 400 X) was

taken. This one was processed (ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>)) and used for an individual measuring of vessels further to calibration with a micrometer picture taken at the same magnification. When individual vessels diameter were measured, mean hydraulic diameter (HD) was calculated as $HD = \Sigma D^5 / \Sigma D^4$. This hydraulic diameter is a better descriptor of hydraulic conductance within a twig (Davis et al., 1999).

Phenological and Climatic data

Budburst time was determined on 5 twigs per tree species when 50% of the buds that would eventually break had reached stage 10 of BBCH scale (Meier, 2001). In parallel with budbreak measuring, daily maximum and minimum air temperature were measured for each sample site by a governmental weather station (Meteo France) located at less than 1 km. One near of the Fontfreyde sample site (Saint-Genes-Champanelle: 45°43'7.58"N, 3° 1'0.57"E, altitude 887 m) and the other near of the Crouël sample site (Aulnat: 45°47'12.67"N, 3° 8'57.30"E, altitude 328 m). Then, for each tree species, the thermal time (TT: Arnold, 1959) as $\Sigma(T_{mean} - 5)$ (if $T_{mean} > 5^\circ C$) was calculated in order to take into account difference between locations from 1st January (when endodormancy is removed) until day of budburst (DBB).

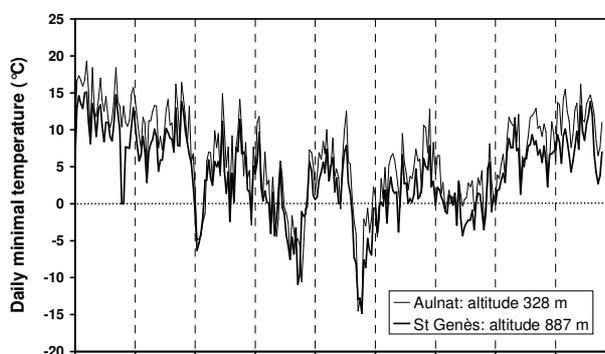


Figure 1: a) Mean temperature during winter for Aulnat (solid line) and Saint-Genès-Champanelle (dotted line).

Statistical analyses

Linear regression and P-values were calculated using R software (R

Development Core Team, 2008). ANOVA were done and significant different groups were determined using Fisher's test (Least Significant Difference) with $\alpha=0.05$. Correlation tests were done using the Pearson's parametric test with $\alpha=0.05$. Modelling of potential altitudinal limit depending on LT_{50min} and PLC_{max} during winter was made by multiple linear regression, type III. ExcelStat Software ver 7.5.2 was used and best result was fitted by R^2 minimization.

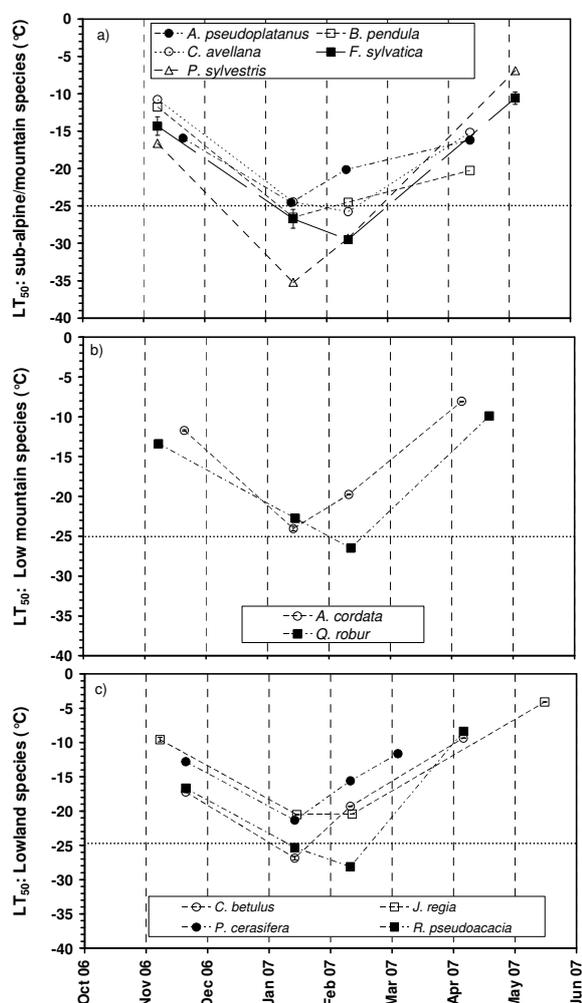


Figure 2: Time course of LT_{50} ($^\circ C$) for tree species according to their altitudinal distribution: high mountain and sub-mountain tree species (a), low mountain species (b) and lowland species (c). Symbols and bars represent mean and standard error of three replicates.

Results

Climatic data

Minimal air temperature during the winter

(Fig. 1a) was rather warm with some sudden freezing events. Until beginning of November mean temperature was around 15°C. First freezing event occurred before the first sampling date. Thereafter, temperature was mild with only few freezing events. The mean temperatures were relatively similar between the two sample sites (up (Fontfreyde) and lowland (Crouel)).

Frost resistance of living cells

Seasonal change of living cells' frost resistance for all tree species is shown in Fig. 2. The tree species were grouped according to their altitudinal distribution (*cf.* Table1): high mountain tree species (Fig. 2a), low mountain species (Fig. 2b)

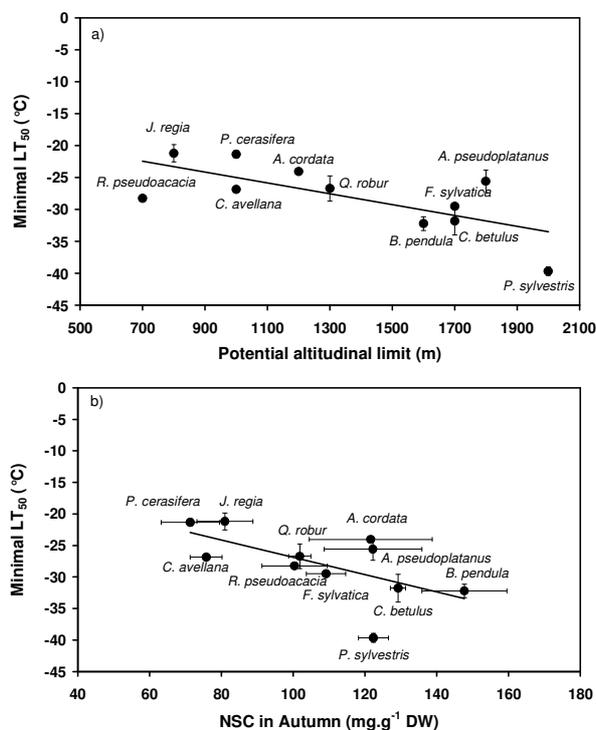


Figure 3: Relation between minimal frost resistance reached during winter and potential altitudinal limit (a) or non structural carbohydrate content in autumn (b). Symbols and bars represent mean and standard error of three replicates.

and lowland species (Fig. 2c). For all tree species, seasonal change of LT₅₀ (i.e. lethal temperature for 50% of cells) decreased from November until deep winter during a cold acclimation period (i.e. frost hardening) and thereafter increased until budburst during a dehardening period.

During the winter, the minimal value of LT₅₀ (i.e. LT_{50min.}) was $-24.4 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for lowland species and was similar to LT_{50min.} of low mountain species ($-25.4 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$), but higher than LT_{50min.} of high mountain species ($-31.7 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$; Fig 3a). In this latter group, the coniferous *P. sylvestris* presented a very low LT_{50min.} in winter ($-39.7 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$), but even without this species, the frost hardiness of mountain species remained significantly lower than in the other groups ($P < 0.05$). Moreover, the correlation between potential altitudinal limit of each sampled tree species and maximal frost hardiness was relatively strong ($r = -0.545$, $p < 0.001$ *P. sylvestris* included and $r = -0.392$, $p = 0.032$ without *P. sylvestris*; Fig. 3a). Maximum frost resistance presented also a good relationship with the total non structural carbohydrate content (NSC: starch + soluble carbohydrates) measured during the leaf fall period of deciduous trees ($r = 0.357$; $p = 0.041$; Fig. 3b). Thus, NSC was significantly higher for frost resistant species ($r = 0.426$; $p = 0.013$) and was also related with potential altitudinal limit in France ($r = 0.854$; $p = 0.001$).

Frost hardiness was related with physiological changes for carbohydrate reserves and water content (see Table 2). Thus, LT₅₀ was negatively correlated with starch content for all species except *A. cordata*, *A. pseudoplatanus*, *C. betulus*, *P. cerasifera* and good relationship was also observed between LT₅₀ and soluble carbohydrate content. For all species, an increase of carbohydrate content was observed for higher resistance except for the coniferous *P. sylvestris*. Finally a significant relationship between water content and frost hardiness was observed

for *C.betulus*, *J. regia x nigra* and *P. sylvestris*.

Frost resistance to embolism of the nonliving water transport system

For each sampled tree species, seasonal change in loss of conductivity for the nonliving water transport system is shown in Fig. 4. As the experiment on the frost resistance of living cells, the sampled tree species were grouped according to their altitudinal distribution: high mountain tree species (Fig. 4a), low mountain species (Fig. 4b) and lowland species (Fig. 4c). Fig. 4a shows that maximal PLC (PLC_{max}) was of 43 % (*A. pseudoplatanus*) for the high mountain species and three

Species	Starch Content	Soluble sugars content	Water Content
<i>A. pseudoplatanus</i>	-- (-0.067)	++ (-0.648)	-- (0.181)
<i>A. cordata</i>	- (-0.269)	+++ (-0.797)	- (0.3331)
<i>B. pendula</i>	++ (0.618)	+ (-0.484)	-- (-0.188)
<i>C. betulus</i>	- (0.292)	++++ (-0.867)	++ (0.647)
<i>C. avellana</i>	++ (0.626)	+ (-0.553)	-- (-0.081)
<i>F. sylvatica</i>	++ (0.634)	++++ (-0.855)	- (0.423)
<i>J. regia x nigra</i>	+++ (0.746)	++++ (-0.907)	++ (0.578)
<i>P. sylvestris</i>	++ (0.698)	-- (0.173)	++ (0.651)
<i>P. cerasifera</i>	- (0.148)	+++ (-0.801)	- (0.305)
<i>Q. robur</i>	++ (0.590)	+++ (-0.807)	- (0.251)
<i>R. pseudoacacia</i>	++ (0.643)	+++ (-0.583)	-- (0.124)

Table 2: Relationships between frost hardness (time course of LT₅₀) and (i) starch content (mg.g⁻¹ DW), (ii) soluble carbohydrates content (mg.g⁻¹

DW) and (iii) water content (g.g⁻¹ DW) during leafless period for deciduous trees (in italics correlation coefficient and significance of linear correlation: --: p>0.5; -: p<0.5; +: p<0.1; ++: p<0.05; +++: p<0.01; ++++: p<0.001).

species (*C. avellana*, *B. pendula*, *P. sylvestris*) was completely non-sensitive to winter embolism. Figure 4b shows that PLC_{max} was higher than 60 % for low mountain species. The seasonal change was also contrasted between these species. The *Q. robur* PLC was total after the first freeze-thaw cycle, while for *A. cordata*, PLC increased in winter then decreased at budburst time. Finally, for lowland species (Figure 4c), PLC_{max} was also higher than

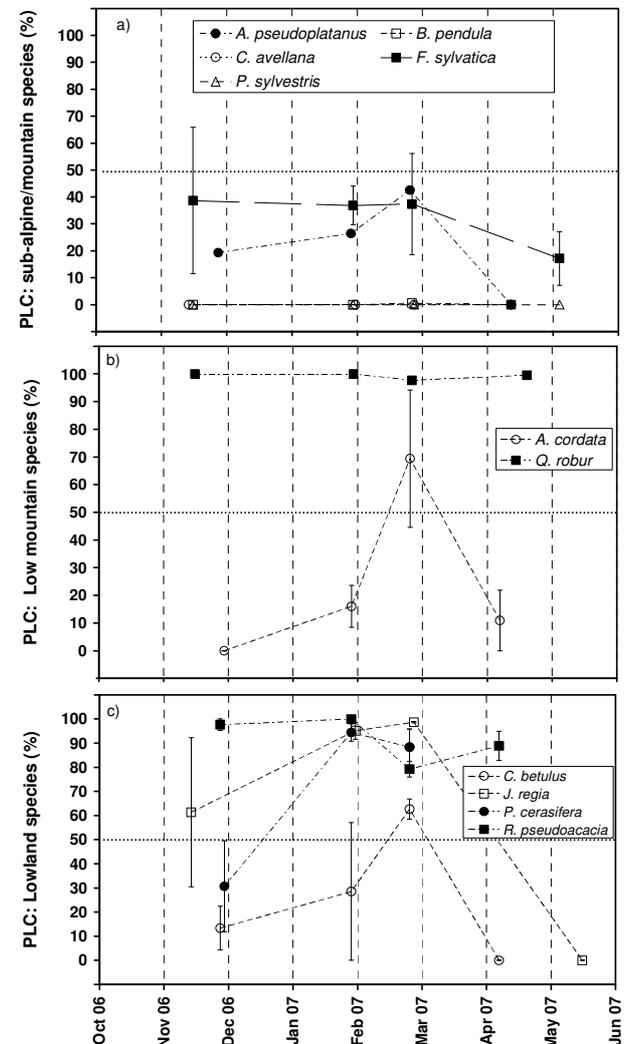


Figure 4: Time course of PLC for tree species according to their altitudinal distribution: high mountain and sub-mountain tree species (a), low mountain species (b) and lowland species (c). Symbols and bars represent mean and standard error of three replicates.

60 % for the four tree species. The pattern was similar with low mountain species with full embolism after the first freeze-thaw cycle or an increase of PLC during winter and after a decrease of PLC before budburst.

The levels of PLC in November (i.e. PLC after one freeze/thaw cycle (PLC_{AFC}) or the PLC_{max}.) were good indicators for the frost resistance of the nonliving water transport system. Thus, PLC_{AFC} and PLC_{max} values for all tree species were related with their altitudinal limit ($r=0.602$, $p<0.05$ and $r=0.853$ $p=0.001$ respectively; Fig. 5a). PLC_{max} was related with minimal water content (data not shown: $r=0.684$; $p=0.020$) and PLC_{AFC} was also related with wood anatomy especially the mean hydraulic diameter of the vessel ($r=0.576$; $p=0.0004$; Fig. 5b).

Similar relationship was observed between potential altitudinal limit and mean diameter of the vessel (data not shown: $r=0.693$; $p<0.0001$).

Three types of frost resistance were observed for the nonliving water transport system : (i) the complete resistance (*B. pendula*, *C. avellana*, *P. sylvestris*), (ii) the complete absence of resistance (*Q. robur* and *R. pseudoacacia*) and (iii) an increasing of embolism level during the winter with a partial or total repair of conductivity before the budburst (*A. cordata*, *A. pseudoplatanus*, *C. betulus*, *F. sylvatica*, *J. regia x nigra*). Moreover, osmolarity and sugar content of the xylem sap during the leafless period were measured for deciduous trees with a total or partial repair of winter embolism, As PLC pattern, sap osmolarity pattern differed according to species (Fig. 6a). Thus, only *F. sylvatica* and *J. regia x nigra* presented a significant increase in sap osmolarity during the winter in comparison to autumn and spring. For the others species, sap osmolarity increased only at budburst time. This increase of sap osmolarity before budburst was significant for *B. pendula* , *C. betulus*, *C. avellana* and

P. cerasifera. Finally for all samples of xylem sap, a highly significant correlation between osmolarity and osmotic pressure generated by soluble sugar content was observed (see fig. 6b; $r = 0.941$; $p<0.0001$) but only *B. pendula*, *F. sylvatica* and *J. regia x nigra* presented a significant increase of large amount of soluble sugars in xylem sap. Osmotic pressure observed by sap osmolarity measurement was explained at 70% by osmotic pressure generated by sugars content.

Budburst date, potential altitudinal limit and frost resistances

Table 3 shows the thermal time (TT) calculated with a threshold at +5°C from January 1th until budburst. Thus, *B. pendula*, *C. avellana*, *P. cerasifera*, and *Q. robur* presented an early budburst (150<TT<250 DD) while *P. sylvestris*, *F.*

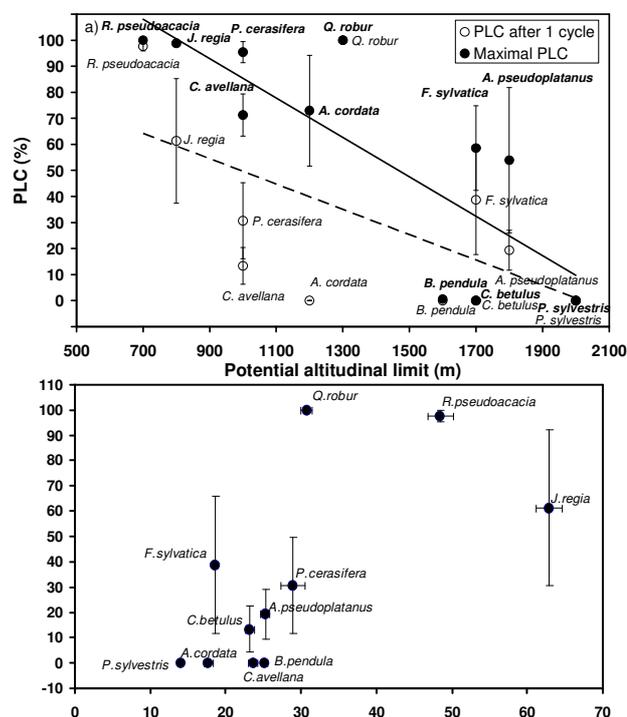


Figure 5: Relation between PLC and potential altitudinal limit for 11 species (a). Maximal PLCs observed during winter are in filled symbols and PLCs observed after only one freeze/thaw cycle are in open symbols. Relation between PLC after one Freeze/thaw cycle and mean diameter of vessels (b).

sylvatica, *C. betulus*, *R. pseudoacacia*, *A. cordata* and *A. pseudoplatanus* are late ($250 < TT < 350$ DD) and *J. regia x nigra* is very late ($TT > 350$ DD). Nevertheless, no significant correlation was observed with potential altitudinal limit ($p = 0.441$), PLC_{max} . ($p=0.217$) or LT_{50min} . ($p=0.466$). PLC_{max} . and LT_{50min} . were correlated (Fig. 7a: $r=0.803$; $p=0.003$).

These two quantitative variables can be used to build a model yielding the potential altitudinal limit for all studied species (Fig. 7b). This model explained a good percentage of the variance ($R^2_{ajus} = 0.661$) with a significant effect of each variables ($p = 0.005$) and a mean residual error of fitting (RMSE) of ± 245 m.

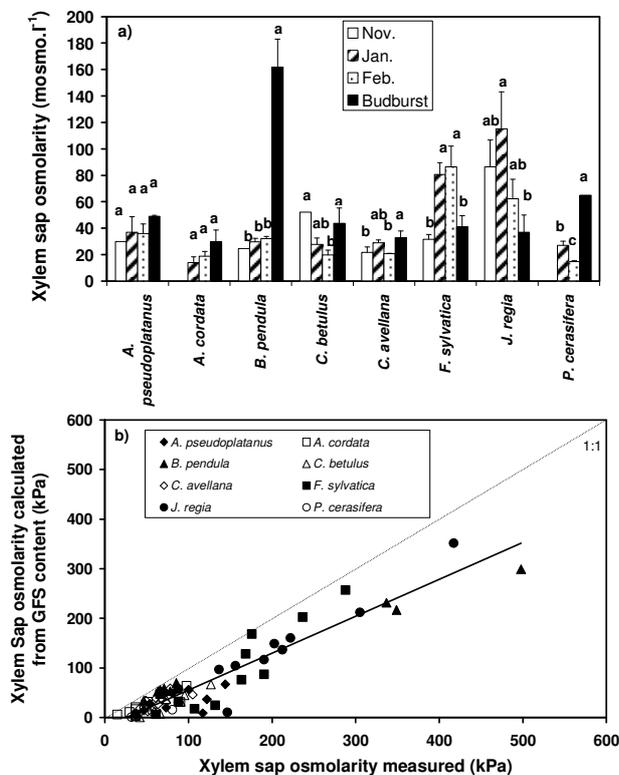


Figure 6: a) Sap osmolarity measured during winter for species when it was possible. Letters indicate significantly different groups within each species by ANOVA and Fisher's test (LSD) with an $\alpha = 5\%$. b) Relationships between sap osmolarity and soluble sugar concentration (GFS) measured from xylem sap for all species presented an increase pattern of PLC during winter and after a decreasing of PLC before budburst. Values of GFS are expressed in osmotic pressure units as calculated from total concentration of the three sugars (Glucose, Fructose and Sucrose: GFS). The coefficient of determination ($r^2 = 0.8714$, $P < 0.0001$) of the linear regression is presented.

Discussion

Frost resistance of living cells

In all tree species a hardening period in fall for a maximum resistance in January-February and a dehardening period before bud break were observed (Fig. 2). In most studies in which comparison of different environmental or genotypes were made, maximal frost resistance in deep winter was never different between environmental conditions (Larcher & Mair, 1968 ; Bower & Aitken, 2006 ; Poirier, 2010). Moreover, even if differences could have been established between ecotypes during acclimation or deacclimation, intraspecific variation were never observed as important as interspecific variations (Larcher & Mair, 1968; Nilsson & Walfridsson, 1995, Charrier et al., 201X).

Despite frost hardiness and carbohydrates content were measured on whole stems with all tissues mixed, the seasonal changes observed are synchronized among tissues (Sakai & Larcher, 1987; Andergassen & Bauer, 2002). Thus, living cells resistance was linked with NSC content in autumn (Fig. 3b) and with potential altitudinal limit for these species (Fig. 3a). NSCs are the main components of plant carbon balance (Chapin et al. 1990; Le Roux et al. 2001). They are frequently used in ecophysiological studies to access variation in carbon, balance among plant populations, especially for trees growing in timberline ecotones (Körner 1998; Hoch and Körner 2003; Shi et al. 2008; Bansal & Germino 2009). Thus, autumnal NSC contents appeared as an important trait for frost resistance of living cells in all studied species (Tab. 2). Morin et al. (2007) demonstrated that NSCs amount before hardening is well correlated with maximal frost hardiness during winter in *Quercus* species.

During winter there is modifications within NSC content, soluble sugars are

synthesized from starch mobilization and enhanced frost resistance (Sakai 1966; Sauter et al. 1996; Palonen et al. 2000; Améglio et al. 2004; Morin et al. 2007; Poirier et al. 2010). One exception is for *P. sylvestris*. For this coniferous, starch constitutes a substrate for synthesis of cryoprotective compounds but no relationship was established with soluble sugars. *P. sylvestris* should use its reserves in order to synthesize other compounds such as aminoacids, lipids or macromolecules (Lasheen & Chaplin 1971; Zwiazek et al. 2001; Wolfe et al. 2002). Soluble sugars increase osmolarity and, by the way, lower freezing temperature of cytosol (1.86°C per mole of solute dissolved per kg of water (Dereuddre & Gazeau, 1992; Cavender-Bares, 2005)) which triggers ice nucleation within the extracellular space (Levitt, 1980). Then, according to chemical potential difference between liquid water and ice (Mazur, 1963; Rajashekar et al., 1982; Rajashekar et al., 1983), water diffuses from cells to sites of ice formation, resulting in cell dehydration (Loris 1999; Zweifel & Hasler 2000; Améglio et al. 2001b), which is the primary cause of freezing injury in woody plants.

On the contrary, water content was a frost hardiness significant parameter only for few species (i.e. *C. betulus*, *J. regia x nigra*, and *P. sylvestris*). The relationship

Species	Thermal time for budburst (°C)
<i>A. pseudoplatanus</i>	342 ± 39
<i>A. cordata</i>	305 ± 26
<i>B. pendula</i>	155 ± 0
<i>C. betulus</i>	304 ± 14
<i>C. avellana</i>	155 ± 0
<i>F. sylvatica</i>	300 ± 0
<i>J. regia x nigra</i>	402 ± 2
<i>P. sylvestris</i>	300 ± 0
<i>P. cerasifera</i>	175 ± 5
<i>Q. robur</i>	222 ± 1
<i>R. pseudoacacia</i>	307 ± 12

Table 3: Thermal time ± SE (in DD base 5°C) calculated from 1st of January until budburst for different species (if T_{mean} > 5°C: TT = Σ (T_{mean} - 5)).

between frost hardiness and water content has been extensively proved (Chen et al. 1976, Chen & Gusta 1978, Tanino et al. 1990, Ögren 1999, Gusta et al. 2004, Charrier & Améglio, 2011). Indeed, water content decreases lower the freezing point of cytoplasm through increases in osmolarity. Another possible effect of low water content is an activation of cold acclimation metabolic pathway through ABA synthesis (Tahtiharju & Palva 2001; Li et al. 2003). Cold tolerance of wheat is enhanced by exogenous ABA application (Veisz et al. 1996) via carbohydrate metabolism (Kerepesi et al. 2004).

Frost resistance to embolism of nonliving water transport systems

In this study large differences were observed for frost resistance to embolism. Some species were particularly resistant

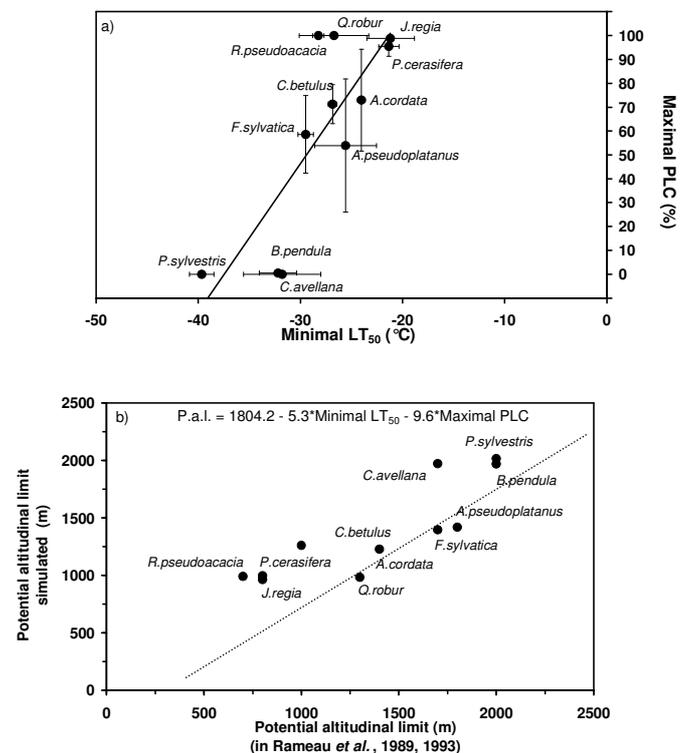


Figure 7: Relation between PLC_{max.} and LT_{50min.} observed during winter (a), relation between potential altitudinal limit (given in Rameau et al 1989, 1993) and potential altitudinal limit predicted by a linear model using LT_{50min.} and PLC_{max.} as input variables (b).

(*B. pendula*, *C. avellana*, *P. sylvestris*) while others were particularly sensitive (*Q. robur*, *R. pseudoacacia*). Vascular physiology is often presented as a key physiological process in the plant survival (Pratt et al. 2008; 2010) and sometimes related with the altitudinal distribution of plant species : altitudinal (Tyree and Cochard 1996; Langan et al. 1997; Pockman and Sperry 1997) or latitudinal (Stuart et al., 2007).

In our study, PLC observed after only one freeze/thaw event or PLC_{max} appeared correlated with potential altitudinal limit for each species. Cavitation caused by freezing and thawing may be considered as a purely physical process controlled by water potential (Mayr & Charra-Vaskou 2007), number of freeze-thaw cycles (Mayr et al. 2007) and the diameter of xylem vessels (Pratt et al. 2005). According to Davis et al. (1999), without water stress, woody plants with hydraulic vessel and tracheid diameters lower than 30 μm are relatively resistant to cavitation induced by freeze-thaw stresses, while hydraulic vessel and tracheid diameters higher than 30 μm are susceptible to such cavitation. This was observed in field conditions during this study, while previous data were only collected from laboratory experiments (Davis et al. 1999; Pittermann and Sperry 2003; Pratt et al. 2005; Stuart et al., 2007; Pittermann 2010).

PLC observed after only one freeze/thaw event appeared related with hydraulic diameter of vessel, whereas PLC_{max} after several freeze/thaw cycles appeared less correlated with hydraulic diameter of vessels. Indeed, PLC_{max} is a physiological parameter which could be saturated when 100% of PLC occurred. We can also observe partial refilling in vessels which depends on living cell survival. Thus, for some species, level of embolism varied greatly during winter and we often observed great heterogeneity in measurements as shown by standard errors on Figs. 3 and 4. This large variability was

explainable by the wide sampling delay and the efficiency of xylem pressure for vessels refilling.

In this study, it was difficult to distinguish between stem xylem pressure (Améglio et al. 2001a; 2004) and root xylem pressure (Ewers et al, 2001), but *A. pseudoplatanus*, *A. cordata*, *C. betulus*, *F. sylvatica*, and *J. regia x nigra* exhibited significant decrease of PLC before budburst (Fig 3: on the last sampling date). Some of these species are already identified as able to generate root pressure but it seems that this mechanism is more distributed among trees than it would be *a priori* expected.

The seasonal change of sap osmolarity (Fig. 6a) and also the relationship between sap osmolarity and sap soluble sugars content (mostly glucose, fructose and sucrose: Fig. 6b) was in agreement with stem pressure for *B. pendula*, *F. sylvatica* and *J. regia x nigra*, but also with a weaker relationship for *A. cordata*, *C. betulus*, *C. avellana* species. This relationship was not observed in our study for *A. pseudoplatanus* whereas this species is known to exude sugars in the xylem sap during winter (Milburn & Zimmerman, 1986; Tyree & Yang 1992; Cirelli et al. 2008).

Frost resistances and Altitudinal limit

Beside those two resistances, freezing avoidance due to phenological cycle was explored because, in bibliography, day of budburst is considered as a crucial parameter to escape spring freezing events (Leinonen & Hänninen 2002). But in our study, a large range of day of budburst was observed between tree species (3 months from 27 February until 27 May), and a TT for budburst was ranged from 155 DD (*Betula sp.* or *Corylus sp.*) while budburst occurred when freezing probability was still high until 359 DD (*Juglans sp.*) (see Table 3). Even if young stems in spring at budbreak time were very sensitive to

freezing events just below 0°C because of high hydration (Rodrigo 2000), no relationship was observed with potential altitudinal limit and TT. Correlation between day of budburst and provenance was only observed in intraspecific comparison as in *P.abies* for different latitudes (Leinonen & Hänninen 2002) or *A. pseudoplatanus*, *F. excelsior*, *Q. petraea* and *F. sylvatica* and altitude (Vitasse et al. 2009).. But as far as these results can tell, this did not appear as relevant in interspecific comparison. Even if dormancy release is a mechanism controlled by cold temperature, among species, different strategies are observed as a trade-off between maximization of the photosynthetic active period (for deciduous) and decrease in risks of freezing new buds. This could explain why some species are flushing earlier than others independently from their altitudinal limits.

These two different frost resistances reached different levels among species and On the contrary PLC_{max} and LT_{50min} were correlated with the potential altitudinal limit for these species, as cold is considered as a major abiotic constraint in distribution of species. We wanted to weight the impact of those two mechanisms on altitudinal limit. Thus, these two quantitative variables can be used to build a model yielding the potential altitudinal limit for all studied species (Fig. 7b). This type of relation would deserve to be tested on different species and for different geographical areas, but nevertheless it is interesting to note the relationship between the two types of frost resistance strategies. This model indicates that a really sensitive species for winter embolism (100% PLC_{max}) could be present at 800 m a.s.l maximum while a resistant one (0% PLC_{max}) at 1800 m a.s.l.. On the other hand, according to this model, frost hardiness of living cell contributes only for around 265m range (if we consider maximal frost hardiness between -10 and -60°C: $50 \times 5.3 = 265m$). This highlights

the weight of hydraulic system for survival of the whole tree, but also because xylem sensitivity depends also on living cells ability to refill it.

The main result of our study is this relationship observed between the frost resistances of living cells and nonliving water transport systems. This interspecies relationship seems to indicate that both processes were independent but selected under the same environmental pressure (impact of freezing events). To our knowledge, few studies until now monitored these two parameters at the same time. Medeiros & Pockman (2010) observed an increasing freezing tolerance of leaves and xylem under drought conditions. Feild & Brodribb (2001) studied 12 tree and shrub species from a treeline heath in Tasmania and gave an opposite conclusion. But, this study compared the resilience of stem water transport to freezing with frost tolerance of leaves, not stems, and the LT_{50} obtained with chlorophyll fluorescence method varied only from -6 to -13°C, indicating that these Australian species were more frost-sensitive than our northern hemisphere species studied in a small area in Auvergne.

This study gives some new insights in general principles of physiology of frost resistances at the leading edge edge of species distribution. In order to survive under extreme climatic conditions, perennial plants need to have both strong resistance for living cells and nonliving water transport systems. Some clear interactions were observed between two traits (embolism and refilling). These interactions could only occur with the contribution of frost undamaged living cells to develop mechanisms of pressurization (Ewers et al. 2001). Also, if refilling does not occur, buds are lacking water for flushing, and carbon balance would be disturbed, limiting frost acclimation potentiality for next winter. Finally, this study underlines some

important traits (i.e. NSC content, sap osmolarity or mean diameter of vessels) that should be taken into consideration for

description of the frost resistance strategies and, more generally, winter biology of trees.

Acknowledgments

This work was supported in part by INRA – department of Agronomy and Environment and by a MRES PhD grant for Guillaume Charrier. We are grateful to Christian Bodet and Christophe Serre for their help to the data collection of LT₅₀ and PLC and to Brigitte Girard, Brigitte Saint-Joanis and Marc Vandame for biochemical analysis contributions. We would also like to thank a native English researcher, D.G. Biron, for the correction of the manuscript.

References

- Ameglio, T., C. Bodet, A. Lacoïnte and H. Cochard 2002. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology*. 22:1211-1220.
- Ameglio, T., H. Cochard and F.W. Ewers 2001. Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. *Journal of Experimental Botany*. 52:2135-2142.
- Ameglio, T. and P. Cruiziat 1992. Tension Pressure Alternation in Walnut Xylem Sap During Winter - the Role of Winter Temperature. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences*. 315:429-435.
- Ameglio, T., P. Cruiziat and S. Beraud 1995. Alternance tension/pression de la sève dans le xylème chez le noyer pendant l'hiver. Conséquences sur la conductance hydraulique des rameaux. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série III: Sciences de la Vie*. 318:351-357.
- Ameglio, T., M. Decourteix, G. Alves, V. Valentin, S. Sakr, J.L. Julien, G. Petel, A. Guilliot and A. Lacoïnte 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees : evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology*. 24:785-793.
- Ameglio, T., F.W. Ewers, H. Cochard, M. Martignac, M. Vandame, C. Bodet and P. Cruiziat 2001. Winter stem xylem pressure in walnut trees: effects of carbohydrates, cooling and freezing. *Tree Physiology*. 21:387-394.
- Andergassen, S. and H. Bauer 2002. Frost hardiness in the juvenile and adult life phase of ivy (*Hedera helix* L.). *Plant Ecology*. 161:207-213.
- Arnold, C.Y. 1959. The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *Proceedings of the American Society for horticultural Science*. 74:430-445.
- Bansal, S. and M.J. Germino 2009. Temporal variation of nonstructural carbohydrates in montane conifers: similarities and differences among developmental stages, species and environmental conditions. *Tree Physiology*. 29:559-568.
- Borghetti, M., S. Leonardi, A. Raschi, D. Snyderman and R. Tognetti 1993. Ecotypic variation of xylem embolism, phenological traits, growth parameters and allozyme characteristics in *Fagus sylvatica*. *Functional Ecology*:713-720.
- Bower, A.D. and S.N. Aitken 2006. Geographic and seasonal variation in cold hardiness of whitebark pine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*. 36:1842-1850.
- Cavender-Bares, J., P. Cortes, S. Rambal, R. Joffre, B. Miles and A. Rocheteau 2005. Summer and winter sensitivity of leaves and xylem to minimum freezing temperatures: a comparison of co-occurring Mediterranean oaks that differ in leaf lifespan. *New Phytologist*. 168:597-611.
- Chapin, F.S., III, E.D. Schulze and H.A. Mooney 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21:423-447.
- Charrier, G. and Améglio, T. 2011. The timing of leaf fall affects cold acclimation by interactions with air temperature through water and carbohydrate contents. *Environmental and Experimental Botany*.72:351-357.
- Charrier, G., Bonhomme, M., Lacoïnte, A. and Améglio, T. in press. Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control? *International Journal of Biometeorology*. doi 10.1007/s00484-011-0470-1
- Chen, P. and P.H. Li 1976. Effect of photoperiod, temperature and certain growth regulators on frost hardiness of *Solanum* species. *Botanical Gazette*. 137:105-109.
- Chen, P.M. and L.V. Gusta 1978. Changes in membrane permeability of winter wheat cells following freeze-thaw injury as determined by nuclear magnetic resonance. *Plant Physiology*. 61:878-882.
- Cirelli, D., R. Jagels and M.T. Tyree 2008. Toward an improved model of maple sap exudation: the location and role of osmotic barriers in sugar maple, butternut and white birch. *Tree Physiology*. 28:1145-1155.
- Cochard, H., C. Bodet, T. Ameglio and P. Cruiziat 2000. Cryo-scanning electron microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiology*. 124:1191-1202.
- Cochard, H., D. Lemoine, T. Ameglio and A. Granier 2001. Mechanisms of xylem recovery from winter embolism in *Fagus sylvatica* L. *Tree Physiology*. 21:27-33.
- Cochard, H., M. Peiffer, K. Le Gall and A. Granier 1997. Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L. Impacts on water relations. *Journal of experimental Botany*. 48:655-663.

Annexe 1 : Limite altitudinale potentielle des arbres et résistances au gel

- Cochard, H. and M.T. Tyree 1990. Xylem dysfunction in *Quercus* : vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. *Tree Physiology*:393-407.
- Davis, S.D., J.S. Sperry and U.G. Hacke 1999. The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *American Journal of Botany*. 86:1367-1372.
- Dereuddre, J. and C. Gazeau 1992. Les végétaux et les basses températures. In *Les végétaux et le froid* Ed. D. Côme, Paris, p. 600.
- Ewers, F.W., T. Ameglio, H. Cochard, F. Beaujard, M. Martignac, M. Vandame, C. Bodet and P. Cruiziat 2001. Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree Physiology*. 21:1123-1132.
- Ewers, F.W., M.C. Lawson, T.J. Bowen and S.D. Davis 2003. Freeze/thaw stress in *Ceanothus* of southern California chaparral. *Oecologia*. 136:213-219.
- Feild, T.S. and T. Brodrribb 2001. Stem water transport and freeze-thaw xylem embolism in conifers and angiosperms in a Tasmanian treeline heath. *Oecologia*. 127:314-320.
- Gusta, L.V., M. Wisniewski, N.T. Nesbitt and M.L. Gusta 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology*. 135:1642-1653.
- Hacke, U. and J.J. Sauter 1996. Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. *Oecologia*. 105:435-439.
- Hoch, G. and C. Korner 2003. The carbon charging of pines at the climatic treeline: a global comparison. *Oecologia*. 135:10-21.
- Hoch, G., M. Popp and C. Korner 2002. Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggests sink limitation of growth at the Swiss treeline. *Oikos*. 98:361-374.
- Holbrook, N.M. and M.A. Zwieniecki 1999. Embolism repair and xylem tension. Do we need a miracle ? *Plant Physiology*. 120:7-10.
- Huner, N.P.A., Ö. G and F. Sarhan 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *trends in plant science*. 3:224-230.
- Just, J. and J.J. Sauter 1991. Changes in hydraulic conductivity upon freezing of the xylem of *Populus x canadensis* Moench "robusta". *Trees*:117-121.
- Kerepesi, I., E. Banyai-Stefanovits and G. Galiba 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 161:131-133.
- Korner, C. 1998. A re-assessment of high elevation treeline positions and their explanation. *Oecologia*. 115:445-459.
- Langan, S.J., F.W. Ewers and S.D. Davis 1997. Xylem dysfunction caused by water stress and freezing in two species of co-occurring chaparral shrubs. *Plant, Cell and Environment*. 20:425-437.
- Larcher, W. and B. Mair 1968. Das kälteresistenzverhalten von *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* und *Fraxinus ornus* auf drei thermisch unterschiedlichen standorten. *Oecologia Plantarum*. 3:255-270.
- Lasheen, A.M. and C.E. Chaplin 1971. Biochemical comparison of seasonal variations in three peach cultivars differing in cold hardiness. *Journal of the American Society for horticultural Sciences*. 96:154-159.
- Le Roux, X., A.S. Walcroft, F.A. Daudet, H. Sinoquet, M.M. Chaves, A. Rodrigues and L. Osorio 2001. Photosynthetic light acclimation in peach leaves: importance of changes in mass : area ratio, nitrogen concentration, and leaf nitrogen partitioning. *Tree Physiology*. 21:377-386.
- Leinonen, I. and H. Hänninen 2002. Adaptation of the Timing of Bud Burst of Norway Spruce to Temperate and Boreal Climates. *Silva Fennica*. 36:695-701.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing, and high temperature stress. In *Physiological Ecology series*. Academic Press, New York, p. 497 pp.
- Li, C., O. Junttila, A. Ernsten, P. Heino and E.T. Palva 2003. Photoperiodic control of growth, cold acclimation and dormancy development in silver birch (*Betula pendula*) ecotypes. *Physiologia Plantarum*. 117:206-212.
- Loris, K., W.M. Havranek and G. Wieser 1999. The ecological significance of thickness changes in stem, branches and twigs of *Pinus cembra* L. during winter. *Phyton - Annales Rei Botanicae*. 39:117-122.
- Mayr, S. and K. Charra-Vaskou 2007. Winter at the alpine timberline causes complex within-tree patterns of water potential and embolism in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum*. 131:131-139.
- Mayr, S., H. Cochard, T. Ameglio and S.B. Kikuta 2007. Embolism formation during freezing in the wood of *Picea abies*. *Plant Physiology*. 143:60-67.
- Mazur, P. 1963. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology*. 47:347-369.
- Medeiros, J.S. and W.T. Pockman. Carbon gain and hydraulic limits on water use differ between size classes of *Larrea tridentata*. *Journal of Arid Environments*. 74:1121-1129.
- Meier U. 2001. Stades phénologiques des mono-et dicotylédones cultivées. BBCH Monographie. Centre Fédéral de Recherche Biologiques pour l'Agriculture et les Forêts. http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_veroeff/bbch/BBCH-Skala_franz%C3%B6sisch.pdf. 166pp
- Milburn, J.A. and M.H. Zimmermann 1986. Sapflow in the sugar maple in the leafless state. *Journal of Plant Physiology*. 124:331-344.
- Morin, X., T. Ameglio, R. Ahas, C. Kurz-Besson, V. Lanta, F. Lebourgeois, F. Miglietta and I. Chuine 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*. 27:817-825.
- Nilsson, J.E. and E.A. Walfridsson 1995. Phenological variation among plus-tree clones of *Pinus sylvestris* (L.) in northern Sweden. *Silvae Genetica*. 44:20-28.
- Ogren, E. 1999. Fall frost resistance in willows used for biomass production. II. Predictive relationships with sugar concentration and dry matter content. *Tree Physiology*. 19:755-760.
- Palonen, P., D. Buszard and D. Donnelly 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum*. 110:393-401.
- Pittermann, J. 2010. The evolution of water transport in plants: an integrated approach. *Geobiology*. 8:112-139.

Annexe 1 : Limite altitudinale potentielle des arbres et résistances au gel

- Pittermann, J. and J. Sperry 2003. Tracheid diameter is the key trait determining the extent of freezing-induced embolism in conifers. *Tree Physiology*. 23:907-914.
- Pittermann, J. and J.S. Sperry 2006. Analysis of freeze-thaw embolism in conifers. The interaction between cavitation pressure and tracheid size. *Plant Physiology*. 140:374-382.
- Pockman, W.T. and J.S. Sperry 1997. Freezing-induced xylem cavitation and the northern limit of *Larrea tridentata*. *Oecologia*. 109:19-27.
- Pogosyan, K.S., Sakai, A., 1969, Freezing resistance in grape vines. *Low Temperature Science Series B* 27:125-142.
- Poirier M, Lacoïnte A, Améglio T. 201x A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiology*, in press
- Pratt, R.B., F.W. Ewers, M.C. Lawson, A.L. Jacobsen, M.M. Brediger and S.D. Davis 2005. Mechanisms for tolerating freeze-thaw stress of two evergreen chaparral species: *Rhus ovata* and *Malosma laurina* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*. 92:1102-1113.
- Pratt, R.B., A.L. Jacobsen, R. Mohla, F.W. Ewers and S.D. Davis 2008. Linkage between water stress tolerance and life history type in seedlings of nine chaparral species (Rhamnaceae). *Journal of Ecology*. 96:1252-1265.
- Pratt, R.B., G.B. North, A.L. Jacobsen, F.W. Ewers and S.D. Davis 2010. Xylem root and shoot hydraulics is linked to life history type in chaparral seedlings. *Functional Ecology*. 24:70-81.
- Rajashekar, C., M.N. Westwood and M.J. Burke 1982. Deep Supercooling and Cold Hardiness in Genus *Pyrus*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 107:968-972.
- Rajashekar, C.B., P.H. Li and J.V. Carter 1983. Frost Injury and Heterogeneous Ice Nucleation in Leaves of Tuber-Bearing *Solanum* Species - Ice Nucleation Activity of External Source of Nucleants. *Plant Physiology*. 71:749-755.
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Timbal J, Lecoïnte A, Dupont P, Keller R 1989 In: *Flore forestière française. I Plaines et Collines*, eds. Institut pour le développement forestier, Paris, pp. 1785
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Timbal J, Lecoïnte A, Dupont P, Keller R 1993 In: *Flore forestière française. II Montagnes*, eds. Institut pour le développement forestier, Paris, pp. 2421
- Repo, T. and J. Lappi 1989. Estimation of standard error of impedance-estimated frost resistance. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 4:67 - 74.
- Rodrigo, J. 2000. Spring frosts in deciduous fruit trees - morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*. 85:155-173.
- Sakai, A. 1966. Studies of frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. *Plant Physiology*. 41:353-359.
- Sakai, A. and W. Larcher 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. In *Ecological studies*. Springer Verlag, Berlin, p. 321 pp.
- Salleo, S., P. Trifilo and M.A. Lo Gullo 2006. Phloem as a possible major determinant of rapid cavitation reversal in stems of *Laurus nobilis* (laurel). *Functional Plant Biology*. 33:1063-1074.
- Sauter, J.J. and S. Kloth 1987. Changes in carbohydrates and ultrastructure in xylem ray cells of *Populus* in response to chilling. *Protoplasma*. 137:45-55.
- Sauter, J.J., M. Wisniewski and W. Witt 1996. Interrelationships between ultrastructure, sugar levels, and frost hardiness of ray parenchyma cells during frost acclimation and deacclimation in poplar (*Populus x canadensis* Moench Robusta) wood. *Journal of Plant Physiology*. 149:451-461.
- Shi, P., C. Korner and G. Hoch 2008. A test of the growth-limitation theory for alpine tree line formation in evergreen and deciduous taxa of the eastern Himalayas. *Functional Ecology*. 22:213-220.
- Siminovitch, D., C.M. Wilson and D.R. Briggs 1953. Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. V. Seasonal transformations and variations in the carbohydrates : starch-sucrose interconversions. *Plant Physiology*. 28:383-400.
- Sperry, J.S., J.R. Donnelly and M.T. Tyree 1988. Seasonal occurrence of xylem embolism in sugar maple (*Acer saccharum*). *American Journal of Botany*. 75:1212-1218.
- Sperry, J.S., N.M. Holbrook, M.H. Zimmermann and M.T. Tyree 1987. Spring filling of xylem vessels in wild grapevine. *Plant Physiology*. 83:414-417.
- Sperry, J.S. and J.E.M. Sullivan 1992. Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous and conifer species. *Plant Physiology*. 100:605-613.
- Sperry JS, Robson DG. (2001) Xylem cavitation and freezing in conifers. In: *Conifer Cold Hardiness*, eds. S. Colombo and F. Bigras. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 121-136
- Stuart S. A., Choat, B., Martin, K.C., Holbrook, N. M. and Ball, M.C. 2007 The role of freezing in setting the latitudinal limits of mangrove forests, *New Phytologist* 173: 576-583.
- Sutinen, M.L., J.P. Palta and P.B. Reich 1992. Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa*: evaluation of the electrolyte leakage method. *Tree Physiology*. 11:241-254.
- Tahtiharju, S. and T. Palva 2001. Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 26:461-470.
- Tanino, K., C.J. Weiser, L.H. Fuchigami and T.H.H. Chen 1990. Water-Content During Abscisic-Acid Induced Freezing Tolerance in Bromegrass Cells. *Plant Physiology*. 93:460-464.
- Tinus, R.W., K.E. Burr, N. Atzmon and J. Riov 2000. Relationship between carbohydrate concentration and root growth potential in coniferous seedlings from three climates during cold hardening and dehardening. *Tree Physiology*. 20:1097-1104.
- Tyree, M.T. and H. Cochard 1996. Summer and winter embolism in oak. Impact on water relations. *Annales des Sciences forestières*. 53:173-180.
- Tyree, M.T., S. Salleo, A. Nardini, M.A. Lo Gullo and R. Mosca 1999. Refilling of embolized vessels in young stems of laurel. Do we need a new paradigm ? *Plant Physiology*. 120:11-21.
- Tyree, M.T. and S. Yang 1992. Hydraulic conductivity recovery versus water pressure in xylem of *Acer saccharum*. *Plant Physiology*. 100:669-676.
- Veisz, O., G. Galiba and J. Sutka 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 149:439-443.
- Vitasse, Y., A.J. Porte, A. Kremer, R. Michalet and S. Delzon 2009. Responses of canopy duration to

Annexe 1 : Limite altitudinale potentielle des arbres et résistances au gel

temperature changes in four temperate tree species: relative contributions of spring and autumn leaf phenology. *Oecologia*. 161:187-198.

Wolfe, J., G. Bryant and K.L. Koster 2002. What is 'unfreezable water', how unfreezable is it and how much is there? *Cryoletters*. 23:157-166.

Xin, Z. and J. Browse 2000. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell and Environment*. 23:893-902.

Yang, S. and M.T. Tyree 1992. A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant, Cell and Environment*. 15:633-643.

Zhang, M.I.N. and J.H.M. Willison 1986. Ultrastructure of the Cell-Wall of Bromegrass (*Bromus-*

Inermis Leyss) Cell-Suspension Culture. *Plant Cell Reports*. 5:448-451.

Zimmermann, M.H. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. In *Springer Series in Wood Science* Ed. T.T. E. Springer Verlag, Berlin, p. 143 pp.

Zweifel, R. and R. Hasler 2000. Frost-induced reversible shrinkage of bark of mature subalpine conifers. *Agricultural and Forest Meteorology*. 102:213-222.

Zwiazek JJ, Renault S, Croser C, Hansen J Beck E (2001) Biochemical and biophysical changes in relation to cold hardiness In: *Conifer Cold Hardiness*, eds. S. Colombo and F. Bigras. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.165-186.

Annexe 2 : Mécanismes physiologiques de l'acclimatation au gel du noyer

Article en préparation



Mécanismes physiologiques de l'acclimatation au gel du noyer *Juglans regia* L. : comparaison inter organes.

Guillaume Charrier^{1,2}, Magalie Poirier³, Thierry Améglio^{1,2,*}

¹INRA, UMR547 PIAF, F-63100 CLERMONT-FERRAND, France

²Université Blaise Pascal, UMR547 PIAF, F-63 AUBIERE, France

³INRA, Unité d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères 86600 Lusignan- France

Introduction

Les végétaux pérennes montrent à l'approche de l'hiver une capacité à l'augmentation transitoire de leur résistance au gel (Salai & Larcher, 1987). On parle d'acclimatation au gel. Cette acclimatation au gel des plantes a fait l'objet de nombreuses études depuis les premières études de Molish (1945), Levitt (1956), Tumanov (1932, 1936) ou Sakai (1967).

Chez les plantes pérennes ligneuses, on observe généralement une tolérance à la congélation extra cellulaire et la différence de résistance fait généralement intervenir l'évitement de la congélation intra cellulaire qui est, sauf conditions expérimentales particulières, généralement létale ().

L'acclimatation au gel est sous le contrôle de la diminution de la photopériode, puis de la diminution des températures à l'automne (Weiser, 1970, Arronsson, 1975). La mise en évidence de la relation entre évolution de la résistance au gel et température a été effectuée par l'intermédiaire de conditionnements thermiques constants, montrant un effet des basses températures (gélives ou non) sur l'augmentation de la résistance. Les températures douces, elles, sont plutôt favorables à un désendurcissement. Ces relations directes entre température et résistance ont été utilisées pour la construction de modèle de prédiction de la résistance au gel (Greer & Warrington, 1984 ; Leinonen, 1996.).

Mais cette relation ne semble pas aussi directe qu'imaginée. En effet, récemment, deux études ont montré chez le noyer des niveaux de résistance au gel différents dans les mêmes conditions thermiques, ainsi qu'une capacité à s'acclimater indépendamment du régime thermique, mais sous la dépendance des variations de variables physiologiques (Poirier et al., 2010, Charrier & Améglio 2011). Ainsi, même en conditions thermiques douces, ces arbres étaient capables de s'endurcir, et ceci, pouvant s'expliquer par l'évolution de leur état physiologique (Charrier & Améglio, 2011).

Lors de l'acclimatation au gel, on observe chez les plantes une diminution de la quantité d'eau libre dans les tissus. La diminution de la température du sol diminuant la fluidité membranaire, l'alimentation en eau par l'appareil racinaire diminue progressivement alors que l'eau des parties aériennes continue à s'évaporer. Ceci permet d'abaisser en partie la température de congélation du cytosol. Par la suite, on observe la synthèse, à partir des réserves accumulées lors de la précédente saison de croissance, de composés solubles ayant un effet cryoprotectant. Ces composés exercent un rôle protecteur à travers plusieurs effets : effet osmotique, augmentation de la viscosité, abaissement du point de congélation du cytosol vis à vis de la sève apoplasmique, substrat potentiel lors de la reprise de croissance.

Les types de solutés retrouvés sont fortement dépendant des métabolismes

spécifiques : polyols (sorbitol) chez le sorbier, lipides, acides aminés (conifères), GFS (noyer).

La capacité à s'acclimater est également dépendante de l'âge ou de l'organe considéré. De nombreuses études ont lieu sur rameaux prélevés sur arbre adulte, ou sur jeune plant. Afin de déterminer en quelle mesure, les relations observées peuvent être comparables entre juvéniles et arbres adultes nous avons mesuré au cours de l'hiver l'évolution du contenu en sucres solubles, l'humidité pondérale et la résistance au gel en parallèle.

Nous avons également, afin de montrer la généralité à l'échelle individuelle des relations entre humidité pondérale et résistance au gel d'une part et contenu en sucres solubles et résistance au gel d'autre part, effectué des mesures en différenciant les organes ou les tissus concernés. Cette étude va également nous permettre d'explorer la capacité de prédire la résistance au gel à partir de ces deux variables physiologiques.

Matériels et Méthodes

Arbres en conteneurs

Différents lots d'arbres (*Juglans regia* Franquette), âgés de deux ans et cultivés en conteneurs, ont été suivis durant un hiver entier. Cette expérimentation s'est déroulée sur trois années différentes (2004-2005, 2005-2006 et 2007-2008).

Des prélèvements (n=3) ont été effectués à l'automne, en hiver et au printemps afin de comparer la résistance au gel, l'humidité pondérale et le contenu en sucres (sucres solubles et amidon).

A chaque date, les différents organes ont été traités indépendamment (racines fines, grosses racines, pivot, tronc et rameaux).

Arbres en verger

Un suivi des mêmes paramètres a également été effectué sur des rameaux d'arbres adultes (15 ans) cultivés en verger sur le site de Crouël. Les prélèvements ont été effectués aux mêmes périodes que pour

les arbres en conteneur (Octobre, Janvier Mars) et également au moment du débourrement (fin Avril) et en plein été (Août).

Les différents tissus composant les rameaux prélevés (n=5 par date) ont été traités séparément (écorce + cambium, bois et bourgeons), et les mêmes paramètres ont été mesurés.

Gradient longitudinal

Des rameaux longs (>1,5m) ont été prélevés à l'automne et la résistance au gel mesurée sur les parties apicale, médiane et basale. Des mesures d'humidité pondérale et de contenu en sucres ont également été effectuées sur les parties apicale, médiane supérieure, médiane inférieure et basale.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'ANOVA suivi de test post Hoc de Tukey (HSD). Des lettres différentes indiquant une différence significative entre groupes au seuil de 5%.

Résultats

Résistance au gel

Juveniles

Sur jeunes arbres, les expérimentations ont été effectuées lors de trois hivers différents (2004-2005, 2005-2006, 2007-2008). Malgré des dates de prélèvement légèrement différentes entre les trois années, on n'observe dans l'ensemble de différences significatives qu'à quelques reprises (Figure 1). Dans l'ensemble, lors des trois années de prélèvement, pour chaque organe et période de prélèvement le niveau de résistance au gel ne montrait dans l'ensemble pas de différence significative.

En revanche, la dynamique d'acclimatation au gel évolue différemment selon la position de l'organe dans l'arbre (aérien/souterrain). Ainsi, une évolution significative entre l'automne et l'hiver est observée dans les parties aériennes (rameaux et tronc), alors que, dans les

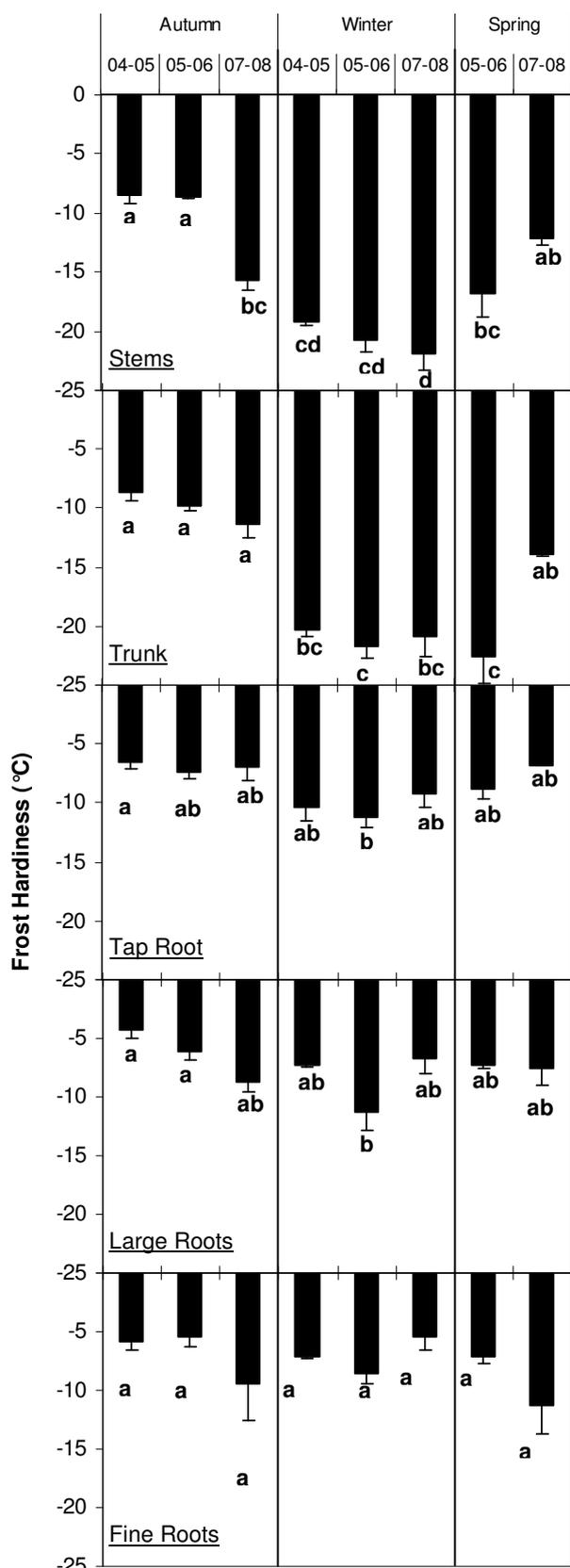


Figure 1 Résistance au gel dans les racines fines, les grosses racines, le pivot, le tronc et les rameaux, prélevés à l'automne, en hiver et au printemps lors de 3 années différentes. Les barres indiquent l'erreur standard, et des lettres différentes des différences significatives entre années pour un organe et une saison donnée par test post Hoc (HSD; $\alpha=0,95$).

parties souterraines (pivot, grosses racines et racines fines), aucune différence significative de l'état de résistance au gel n'a été observée quelque soit la période de prélèvement ($P=0.780$), à l'exception des grosses racines l'année 2005-06.

Dans les parties aériennes, le niveau de résistance et la capacité d'acclimatation, sont comparables entre rameaux et tronc, à l'automne (tronc : -9.96 ± 1.6 vs rameaux : $-11.28 \pm 3.8^\circ\text{C}$; $P=0.294$) et en hiver (tronc : -21.1 ± 2.0 vs rameaux : $-20.8 \pm 2.6^\circ\text{C}$; $P=0.745$). Au printemps, le tronc demeure plus longtemps résistant par rapport aux rameaux (tronc : -20.2 ± 2.2 vs rameaux : $-14.2 \pm 1.2^\circ\text{C}$; $P=0.024$).

Au niveau souterrain, le niveau de résistance au gel était similaire quelque soit l'organe ou la période considérée ; à l'exception du pivot en plein hiver ($LT_{50} = -10.4 \pm 0.6^\circ\text{C}$), par rapport aux racines fines ($LT_{50} = -7.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$; $P=0.018$) ou au pivot à l'automne ($P<0.03$).

Rameaux d'arbres adultes

Sur les rameaux, les différents tissus ont été analysés séparément (bourgeons, écorce + cambium et bois). On observe un parallélisme dans l'évolution de la résistance au gel à l'automne (acclimatation) et au printemps (dé-acclimatation) ; même si les niveaux de résistance maximale (en plein cœur de l'hiver) étaient significativement différents (Figure 2).

Alors qu'en octobre, le niveau de résistance est similaire quel que soit le tissu considéré ($\approx -10^\circ\text{C}$; $P=0.102$), en plein hiver, les bourgeons sont les organes les plus sensibles ($LT_{50} = -18.5 \pm 0.4^\circ\text{C}$) avec une écorce significativement plus résistante que le bois ($LT_{50} = -30.9 \pm 1.4^\circ\text{C}$ vs $-23.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$; $P<0.0001$) ; le rameau entier présentant une résistance au gel intermédiaire ($LT_{50} = -27.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$).

Au printemps, lors du désendurcissement, on observe un niveau de résistance similaire entre bourgeons et bois (-15.8 vs -15.6°C , respectivement) avec une écorce encore relativement résistante ($-20.1 \pm 1.0^\circ\text{C}$). Puis, au débourrement, la résistance de l'ensemble des tissus est

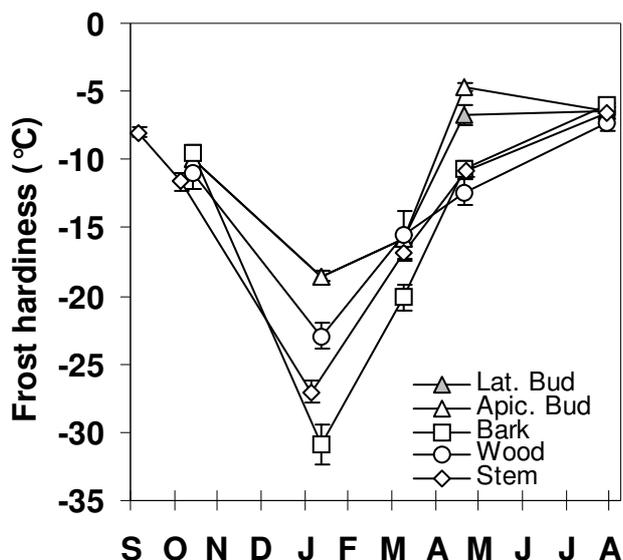


Figure 2 Evolution de la résistance au gel dans différents tissus de rameaux de l'année (Bois, Ecorce, rameau entier bourgeons (séparés en apicaux et latéraux au débourrement). Les symboles représentent la moyenne et les barres l'erreur standard de 5 répétitions.

revenue au niveau automnal, aux alentours de -10°C . En revanche, les bourgeons en plein débourrement montrent une sensibilité supérieure. Puis, à la fin de la saison de croissance, un état de résistance homogène est observé entre les différents tissus, proche du niveau du début de l'automne précédent.

de résistance maximale (en plein cœur de l'hiver) étaient significativement différents.

En effet, en octobre, le niveau de résistance est similaire ($\approx -10^{\circ}\text{C}$) quel que soit le tissu considéré ($P=0.102$). Mais en plein hiver, des différences ont été générées : les bourgeons sont les organes les plus sensibles ($LT_{50} = -18.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$), alors que l'écorce est le tissu présentant le plus fort niveau de résistance au gel ($LT_{50} = -30.9 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$) par rapport au bois ($LT_{50} = -23.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$; $P < 0.0001$) ; alors que la mesure sur rameau entier présente une résistance au gel intermédiaire ($LT_{50} = -27.0 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$).

Au printemps, lors du désendurcissement, le niveau de résistance est similaire entre bourgeons et bois (-15.8 vs -15.6°C respectivement) alors que l'écorce reste encore relativement résistante ($-20.1 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$).

Lors du débourrement, la résistance de l'ensemble des tissus est à nouveau similaire, autour de -10°C . Seuls les bourgeons en plein débourrement montrent une sensibilité supérieure. Enfin, à la fin de la saison de croissance, un état de résistance homogène est observé entre les différents tissus, proche du niveau du début de l'automne précédant.

Physiologie de l'acclimatation au gel :

Afin de comprendre comment ces différences se mettent en place, différents paramètres physiologiques ont été mesurés : l'humidité pondérale, la teneur en sucres solubles et en amidon.

Humidité pondérale

Juveniles

Pour les racines fines, l'humidité pondérale n'est pas mesurable sans perturber l'équilibre hydrique de ces tissus. En effet, les conditions expérimentales pour les extraire du sol nécessitent de laver longuement ces racines à l'eau.

Concernant l'humidité pondérale, pour la quasi-totalité des organes et des périodes de prélèvement, des différences interannuelles significatives sont observées (Figure 3). Ainsi, les grosses racines, durant l'hiver en 2006, sont significativement plus hydratées qu'en 2008 ($P=0.021$).

Pour le pivot, des différences interannuelles sont observées à l'automne 2005, par rapport à 2007 ($P=0.013$) ; entre les trois années pour la période hivernale ($P=0.001$), mais également au printemps ($P=0.009$).

Pour les parties aériennes (Tronc : $P < 0.015$ en automne, $P < 0.011$ en hiver ou Rameaux $P < 0.001$ en automne, $P < 0.006$ en hiver), les échantillons de l'année 2007-08 sont significativement différents à l'automne des deux autres années et en hiver pour l'année 2006 mais similaires au printemps (Tronc : $P=0.304$; Rameaux : $P=0.070$).

Malgré ces fortes différences interannuelles des tendances significatives

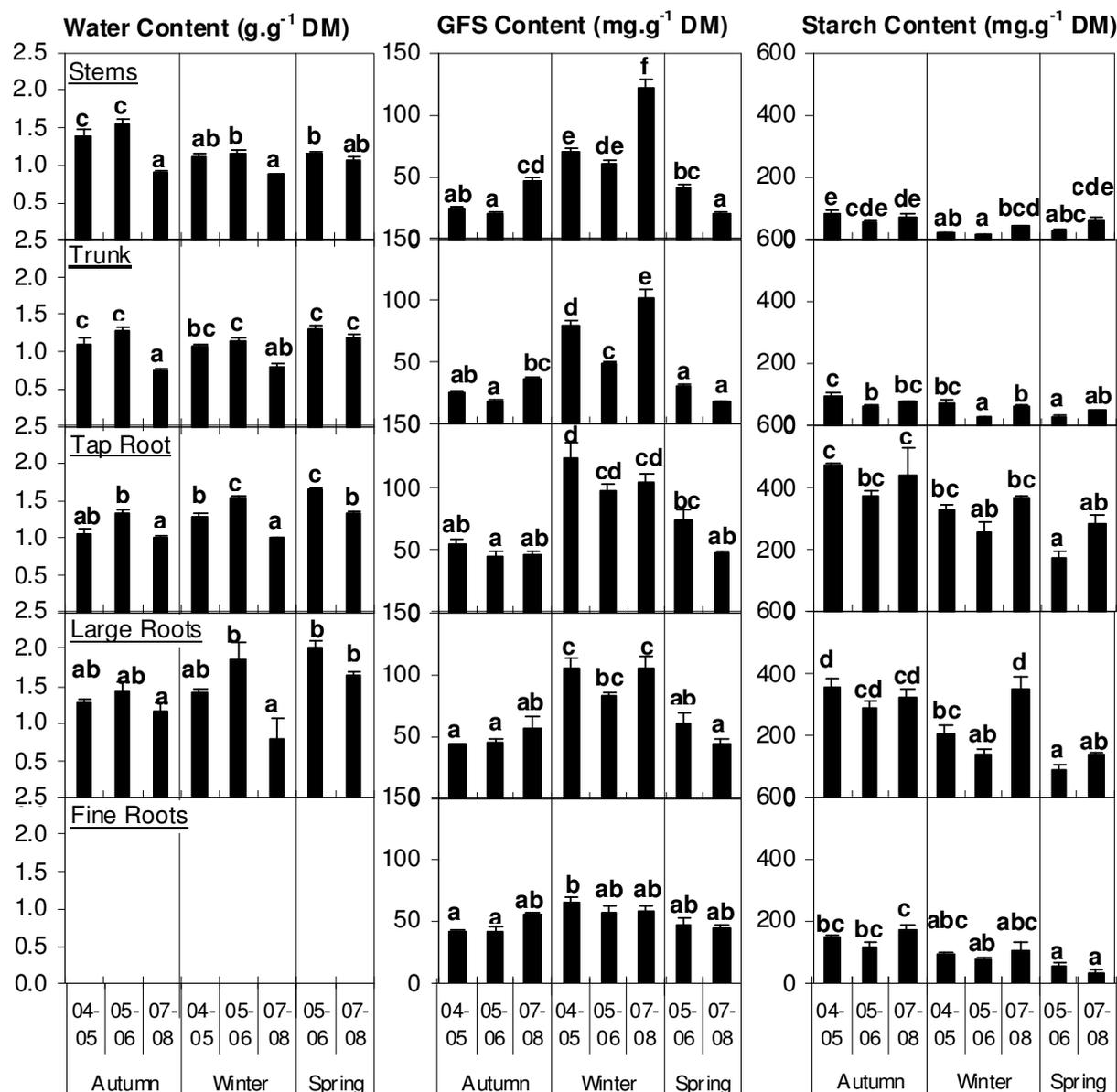


Figure 3 Contenu en eau (première colonne), en sucres solubles (deuxième colonne) et en amidon (troisième colonne) dans les racines fines, les grosses racines, le pivot, le tronc et les rameaux, prélevés à l'automne, en hiver et au printemps lors de 3 années différentes. Les barres indiquent l'erreur standard, et des lettres différentes des différences significatives entre années pour un organe et une saison donnée.

sont tout de même observées entre organes. Ainsi, en général, une décroissance du contenu en eau est observée des racines jusqu'au rameaux. A l'automne, seules les humidités pondérales des grosses racines et du tronc sont significativement différentes l'une de l'autre (1.31 vs 1.09 ; $P=0.039$). Durant l'hiver, les grosses racines et le pivot ne sont pas significativement différents (1.45 vs 1.32 ; $P=0.369$). Il en est de même pour le tronc et les rameaux (1.034 vs 1.035 ; $P=0.995$), mais l'humidité pondérale des organes aériens et souterrains est significativement différente ($P<0.05$). Enfin au printemps, un

accroissement de l'humidité pondérale est observé des grosses racines aux rameaux avec une différence significative entre tous les organes.

L'évolution de l'humidité pondérale au cours de période non feuillée va également dépendre des organes. Ainsi, aucune différence n'est observée entre les prélèvements d'automne et d'hiver pour les grosses racines ($P=0.448$) et pour le pivot ($P=0.075$) à l'exception de l'année 2005-2006. Au contraire, une augmentation significative de l'humidité pondérale est observée au printemps 2008 (grosses racines : $P<0.035$; pivot : $P<0.030$). Un

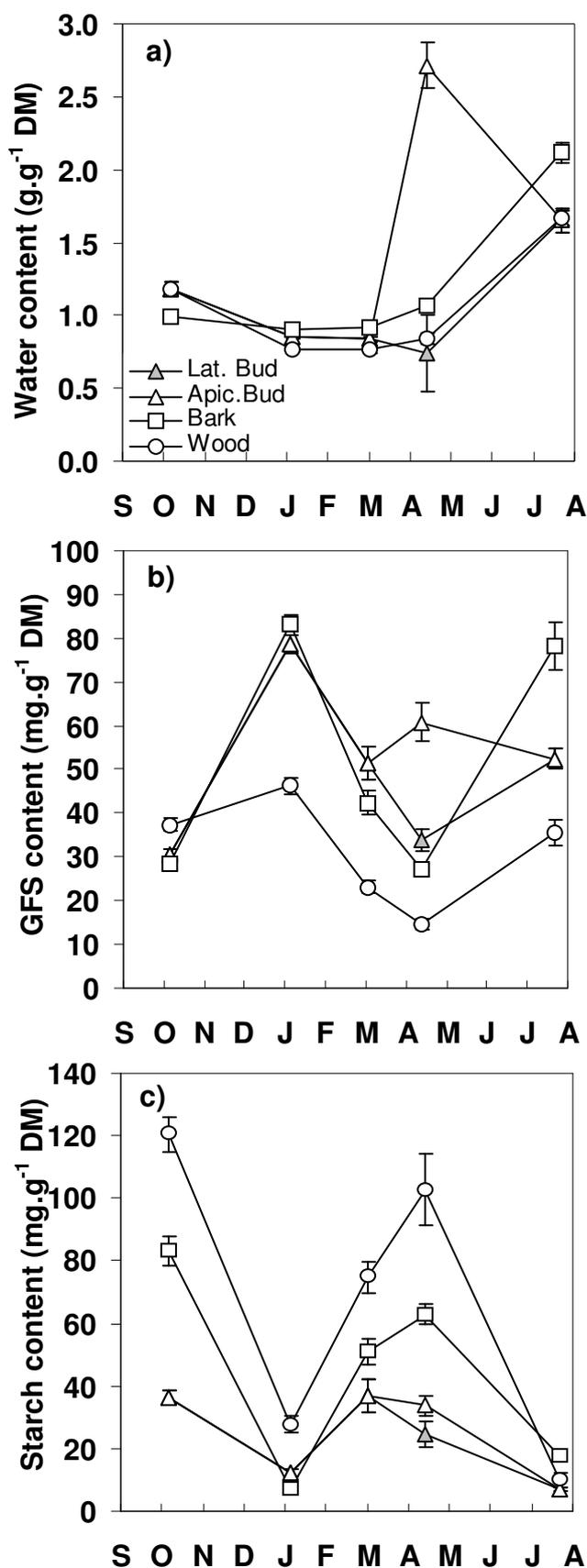


Figure 4 Evolution du contenu en eau (a), en sucres solubles (b) et en amidon (c) dans différents tissus de rameaux de l'année (Bois, Ecorce et Bourgeons). Les symboles représentent la moyenne et les barres l'erreur standard de 5 répétitions.

profil similaire est également observé pour le tronc en 2008 avec une humidité pondérale similaire entre automne et hiver ($P=0.529$), puis une réhydratation au printemps ($P=0.018$). Pour les rameaux, l'humidité pondérale diminue entre automne et hiver ($P=0.010$), puis, une augmentation est observée au printemps, mais reste non significative ($P=0.466$).

Rameaux d'arbres adultes

Si l'on observe les différents tissus constituant un rameau, l'humidité pondérale n'évolue pas significativement entre l'automne et l'hiver pour l'écorce (Figure 4) et ce n'est qu'au moment du débourrement que l'augmentation de l'humidité pondérale est significative. Pour le bois et les bourgeons, l'évolution est similaire. On observe, contrairement à l'écorce, une diminution significative entre l'automne et l'hiver et une réhydratation au débourrement. Cette réhydratation au débourrement présente une forte divergence entre les bourgeons apicaux et latéraux avec une humidité pondérale augmentant de près de 300% dans les apicaux alors que l'humidité pondérale des latéraux reste stable. Des humidités pondérales similaires sont observées dans le bois et les bourgeons néo formés durant la saison végétative, tandis que l'écorce présente un état d'hydratation plus important.

Contenu en glucides

Juveniles

Dans chacun des organes souterrains, aucune différence significative inter annuelle n'a été observée quelle que soit la période de prélèvement pour le contenu en sucres solubles (GFS : Glucose +Fructose +Saccharose ; Figure 3), à l'exception des grosses racines entre l'hiver 2008 et 2006. Les mêmes résultats ont été observés concernant le contenu en amidon, à l'exception des échantillons de grosses racines prélevés en hiver, pour lesquels une différence significative est observée entre les échantillons de 2008 et ceux de 2006 ($P=0.001$).

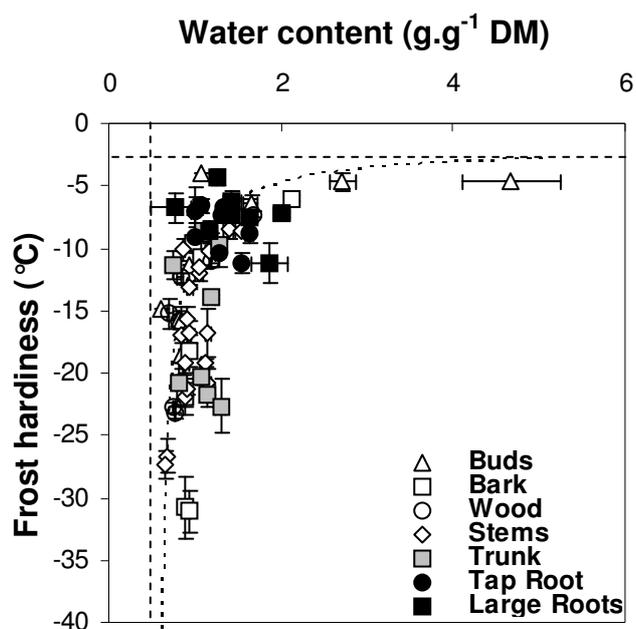


Figure 5. Relation entre contenu en eau et résistance au gel tout organe, tissu et période confondues.

Dans les parties aériennes, des différences significatives en GFS et en amidon ont été observées dans tous les échantillons de 2007 par rapport à ceux de 2004 et 2005, à l'exception du contenu en amidon dans les rameaux pour le prélèvement de printemps. Le contenu en amidon est significativement supérieur dans les organes souterrains, avec dans l'ordre pivot, grosses racines, racines fines, puis tronc et rameaux quelque soit la date de prélèvement. Durant la période entre l'automne et le printemps, une diminution de plus de 50% du contenu en amidon est observée dans tous les organes souterrains. Dans le tronc, une diminution du même ordre de grandeur mais non significative entre l'hiver et printemps ($P=0.231$) est observée. Dans les rameaux, après une forte diminution dans un premier temps entre l'automne et l'hiver ($P<0.0001$), une augmentation est observée entre l'hiver et le printemps, mais non significative ($P=0.168$).

Parallèlement à la dynamique d'amidon, le contenu en GFS augmente significativement entre l'automne et l'hiver dans tous les organes. Puis une diminution significative est observée entre l'hiver et le printemps, jusqu'à atteindre des niveaux similaires à ceux observés en automne dans tous les organes également.

Rameaux d'arbres adultes

Au sein du rameau, la dynamique de la teneur en GFS (Figure 4,b) est similaire entre l'écorce et le bourgeon jusqu'au débourrement. Dans le bois, après l'automne, la teneur en GFS est significativement inférieure pour toutes les dates de prélèvement. Pour la teneur en amidon (figure 4,c), elle diminue fortement dans tous les tissus du rameau entre l'automne et l'hiver, puis augmente fortement jusqu'au débourrement. Elle diminue par la suite dans tous les tissus et bourgeons en été, où le niveau observé est très faible, proche des valeurs minimales observées en plein hiver.

Relation entre humidité pondérale, sucres solubles et résistance au gel :

La relation entre résistance au gel et humidité pondérale suit une relation inverse qui s'inscrit entre deux limites asymptotiques (Figure 5). En effet, pour des valeurs fortes d'humidité pondérale, la résistance au gel évolue très faiblement. La première asymptote ($LT_{50} = -1,1^{\circ}C$) est donc définie par les valeurs minimales de résistance observées durant le cycle. De plus, lorsque l'on s'approche des valeurs de fortes résistances au gel, le contenu en eau ne diminue plus. Ainsi, la seconde asymptote (Humidité pondérale = 0.49) est quant à elle définie par les valeurs de contenu en eau minimal observées. Entre ces deux limites, la relation est inverse et significative ($R^2=0.521$) avec un coefficient de -5,6.

La résistance au gel évolue également en fonction du contenu en sucres solubles (Figure 6). Mais la relation n'apparaît pas aussi clairement qu'avec l'humidité pondérale. Si l'on enlève les points d'été qui perturbent la relation, avec des teneurs en sucres solubles d'origine photosynthétique, on observe des relations qui semblent dépendantes de l'organe ou du tissu. Toutes ces relations linéaires sont

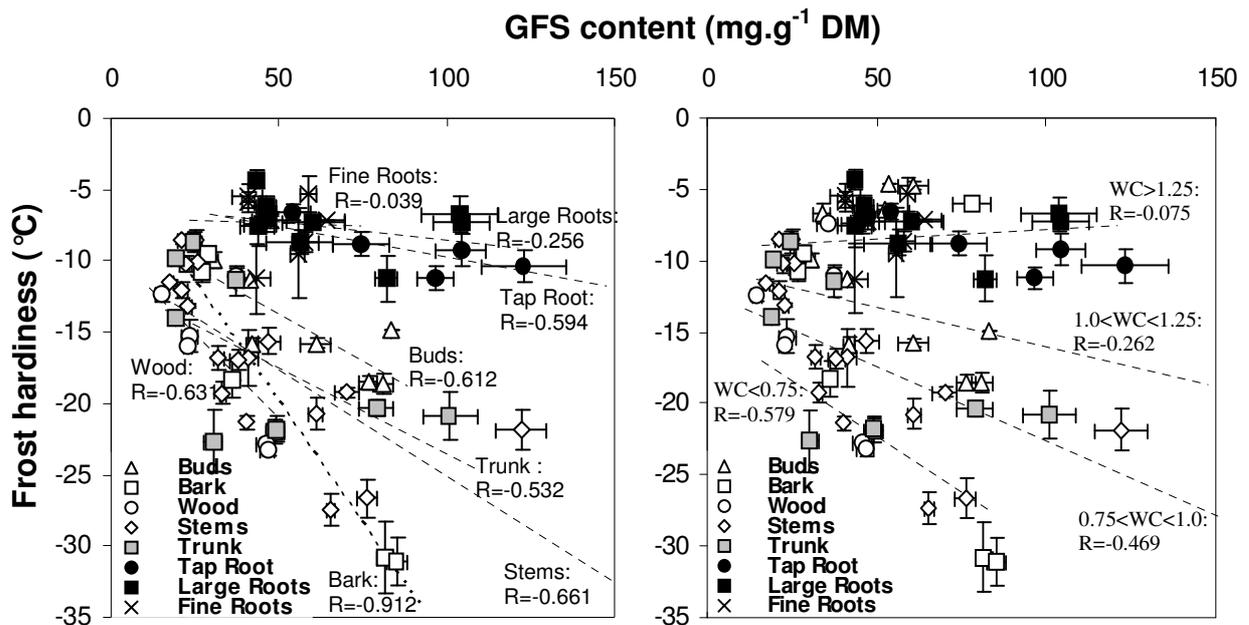


Figure 6 Relation entre contenu en sucres solubles et résistance au gel selon les organes et en excluant les échantillons prélevés en été (a) ou selon les différentes classes de contenu en eau incluant les échantillons prélevés en été (b).

significatives (à l'exception des racines fines dont la pente est quasi-nulle) et ont pour origine une zone comprise entre des valeurs de GFS de 0 à 25 mg.g⁻¹ DM et des valeurs de LT₅₀ entre -5 et -10°C. Par ailleurs, les pentes de ces droites de régression peuvent être regroupées en trois catégories selon la valeur du coefficient directeur : des pentes faibles dans les organes racinaires (racines fines : -0.01 ; grosses racines : -0.03 ; pivot : -0.04), des pentes intermédiaires dans le tronc (-0.12), les bourgeons (-0.13) et les rameaux (-0.15) et des fortes pentes dans le bois (-0.24) et l'écorce (-0.34).

Cette différence observée entre organes s'explique également par les valeurs d'humidité pondérale. En effet, si l'on regroupe les données en fonction de différentes classes d'humidité pondérale (Water content : WC < 0.75, 0.75 < WC < 1.00, 1.00 < WC < 1.25, WC > 1.25) on observe différentes corrélations linéaires qui permettent d'inclure l'ensemble des points y compris les points d'été précédemment retirés. On observe ainsi un ensemble de quatre droites concourantes en un point plus clairement défini (GFS = 0 mg.g⁻¹ DM, LT₅₀ ≈ -11°C). Ces droites ont une pente dont la valeur est d'autant plus faible que

l'humidité pondérale est faible (WC < 0.75 : 0,013 ; 0,75 < WC < 1,00 : -0,056 ; 1,00 < WC < 1,25 : -0,104, WC > 1,25 : -0,157).

Au sein de rameaux longs (>1m) échantillonnés longitudinalement, aucune différence de résistance au gel n'est observée entre partie basale médiane ou apicale (Tableau 1). Au contraire, des différences significatives en termes d'humidité pondérale ou de teneur en GFS sont observées. L'extrémité apicale est significativement plus hydratée et a une teneur en GFS plus importante que la partie basale. Les effets antagonistes de ses deux facteurs sur la résistance au froid peuvent alors expliquer la similarité dans la mesure de la résistance au gel le long du rameau.

Discussion

Distribution spatio-temporelle de la capacité d'acclimatation au gel à l'échelle individuelle

Les mesures effectuées lors de ces trois années ne révèlent pas de différences

	LT50 (°C)	GFS (mg.g ⁻¹ DM)	WC (g.g ⁻¹ DM)
Apex	-17.2 ± 0.6 ^a	52.4 ± 3.2 ^a	1.17 ± 0.05 ^a
Middle	-18.3 ± 1.7 ^a	39.9 ± 2.2 ^b 40.9 ± 5.9 ^b	1.01 ± 0.04 ^b 0.95 ± 0.04 ^{bc}
Base	-17.6 ± 0.7 ^a	34.3 ± 2.9 ^b	0.88 ± 0.04 ^c

Tableau 1 : Résistance au gel, contenu en sucres solubles et en eau le long de rameaux

globales importantes. On peut néanmoins noter qu'une partie de ces différences pour la partie aérienne semblent dépendantes des dates d'expérimentation. Ainsi, à l'automne, les arbres étaient plus avancés dans leur durcissement en 2007 (date d'expérimentation un peu plus tardive : le 30 Octobre) qu'en 2004 et 2005 (23 octobre et 17 octobre respectivement). Mais aussi, pour le prélèvement de printemps, la date d'expérimentation du 1 avril en 2006 est trois semaines plus précoce que celle de 2008 (21 avril) et là encore, explique les différences observées de résistance au froid (cf. figure 1).

A l'opposé, aucune différence significative n'est observée en plein hiver, pour des dates calendaires d'expérimentations très voisines (25 janvier 2005, 27 janvier 2006 et 8 janvier 2008). De plus, il est souvent observé, sauf conditions expérimentales particulières à l'automne (cf. Chapitre 3 ; Charrier & Améglio, 2011), que le niveau maximal de résistance au gel atteint au cours de l'hiver est peu dépendant des conditions environnementales (Aitken *et al.*, 1996 ; Morin *et al.*, 2007) ; alors que les vitesses d'endurcissement ou de désendurcissement sont fortement dépendantes de l'évolution des températures durant ces périodes (Dantuma & Andrews, 1960 ; Pogosyan & Sakai, 1969).

Pour le système racinaire, notre étude sur le noyer ne montre quasiment aucune capacité à s'endurcir au gel, à l'exception du pivot, partie la plus exposée aux variations thermiques alors que différentes études sur d'autres espèces décrivent des capacités d'endurcissement des parties racinaires, comme chez *Pseudotsuga menziesii* (Tinus *et al.*, 2000), *Picea abies*

(Stattin *et al.*, 2000), *Acer saccharum* (Bertrand *et al.*, 1997), ou encore *Quercus rubra* et *Betula alleghaniensis* (Calmé *et al.*, 1994). Néanmoins, des résultats contradictoires sont observés dans la littérature, avec l'absence d'endurcissement chez *Pinus radiata* ou *Pinus halepensis* (Tinus *et al.*, 2000). Le plus souvent ces études ont porté sur de jeunes plants et sur des racines en position superficielle dans le sol, donc relativement exposées aux variations thermiques. En conditions naturelles, ces organes sont peu exposés au gel, protégés par l'inertie thermique de leur substrat et, en règle générale, les racines montrent peu d'évolution de leur résistance au gel avec une amplitude annuelle relativement très faible comparée aux organes aériens (Sakai & Larcher, 1987).

Les parties aériennes montrent donc une capacité à s'endurcir de l'automne à l'hiver et à se dés-endurcir de l'hiver au printemps. Les niveaux de résistance au gel observés entre tronc et rameau sont similaires dans nos conditions expérimentales sur de jeunes arbres. Mais, au sein d'un rameau de l'année, des différences peuvent s'observer au cours du processus d'acclimatation entre les différents tissus composant le rameau. Ainsi, l'écorce et le cambium, tissus relativement sensibles durant la période végétative chez le Noyer, sont capables d'atteindre des niveaux de résistance plus importants que le parenchyme xylémien en plein hiver. On retrouve ici un résultat comparable à celui observé chez *Hedera helix* (Andergassen & Bauer, 2002). A l'opposé, les bourgeons qui avant de s'endurcir ont une résistance au gel similaire aux autres tissus, sont incapables

de s'endurcir fortement en plein hiver et restent les organes les plus sensibles au gel. Ils deviennent même extrêmement sensibles lors du débourrement. Une température faiblement négative suffit à les léser comme chez *Picea abies* (Neuner & Beikircher, 2010) ou dans cette étude, pour les bourgeons de *Juglans regia*. Andergassen & Bauer (2002) ont montré que les primordia foliaires constituaient les parties les plus sensibles du bourgeon tout au long de l'année, alors que le procambium et le parenchyme atteignaient des niveaux comparables à ceux des tissus différenciés et s'endurcissaient.

Rôle des paramètres physiologiques (eau et sucres) sur l'acclimatation au gel des tissus et organes.

L'état hydrique des feuillus, durant la période qui s'étend de la chute des feuilles au débourrement n'est pas simple à déterminer (Cottignies, 1990, Améglio *et al.* 2000) C'est particulièrement vrai pour le noyer, où la sève du xylème présente des alternances d'état de pression et de tension (Améglio *et al.* 1995). Ainsi chez cette espèce, les alternances de cycle de gel-dégel au cours d'une même journée provoquent la mise sous pression de la sève du xylème ; a contrario, pour un arbre placé en serre hors gel, la sève du xylème reste sous tension (Améglio & Cruiziat, 1992). Ce phénomène de pression s'explique par l'existence d'une différence de potentiel osmotique entre la sève du xylème et celle d'un autre compartiment, en relation avec l'appareil conducteur par l'intermédiaire de membranes hémiperméables (Braun, 1984 ; Essiamah & Eschrich, 1985 ; Améglio *et al.* 2001). Deux origines ont été identifiées pour cette mise sous pression, une origine locale dépendante du métabolisme glucidique (Sauter *et al.* 1973 ; Améglio *et al.* 2001 ; Cireli *et al.* 2008) et une origine racinaire, commune à de nombreuses espèces (Fisher *et al.* 1997) et dépendante de l'azote

disponible dans le sol (Ewers *et al.* 2001). A défaut de mesure d'état hydrique, de nombreux travaux suivent l'humidité pondérale des organes de l'arbre (Chen *et al.* 1976, Chen & Gusta 1978, Tanino *et al.* 1990, Ögren 1999, Sparks *et al.* 2001, Améglio *et al.* 2002, Gusta *et al.* 2004). En conditions naturelles, après la chute des feuilles, l'humidité pondérale décroît : plus d'eau est évaporée par l'écorce que les racines n'en absorbent. En effet, il est établi depuis fort longtemps que la diminution de la température du sol induit une diminution de l'absorption racinaire (Kramer, 1940). Celle-ci s'exerce à basse température par une diminution de la perméabilité membranaire des cellules racinaires (Levitt, 1980, Améglio *et al.* 1990). Ainsi, quand les températures diminuent à l'automne, l'humidité pondérale des rameaux décroît, produisant un durcissement de ces organes, ce que nous observons (figure 3 et 4). Alors que plus tard au printemps, avec des températures du sol augmentant, l'absorption redémarre et les organes se réhydratent (Figure 4 ; Ewers *et al.* 2001, Turcotte *et al.* 2009). Améglio *et al.* (2002) avaient démontré que cette réhydratation chez le noyer se produisait lorsque les températures du sol (50 cm de profondeur) devenaient supérieures à +8°C.

Ainsi, les bourgeons lorsqu'ils débourrent sont très fortement hydratés (*cf.* figure 4.a) car une pleine turgescence leur est nécessaire pour que les nouvelles feuilles se déploient.

Pour les glucides, leur évolution lors de la phase hivernale montrent une diminution des réserves en amidon entre l'automne et le printemps dans les racines (figure 3), diminution nettement moins visible pour les parties aériennes et seulement entre l'automne et l'hiver. De plus, pour tous les organes, cette diminution des réserves en amidon est associée à une augmentation des sucres solubles. Cette interconversion amidon/sucres solubles est très classique et observée dans de multiples études (Siminovitch *et al.*, 1953 ; Sakai, 1966c ; Witt & Sauter, 1994b).

Cette augmentation de sucres solubles est le plus souvent reliée à l'endurcissement au gel des ligneux (Siminovitch *et al.* 1953, Kramer & Kozlowski, 1979, Sauter & Ambrosius 1986, Sauter & van Cleve 1994, Améglio *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2004, Morin *et al.* 2007). La bibliographie rapporte que le degré de résistance au gel est invariablement accompagné de l'hydrolyse de l'amidon en saccharose (Parker 1962, Sakai & Yoshida 1968, Essiamah & Eschrich 1985, Ögren *et al.* 1997, Pearce 2001, Klotke *et al.* 2004). Une forte concentration en GFS diminue le point de congélation, mais seulement de 1 à 2°C pour les concentrations mesurées dans ces études (Hansen & Beck, 1988) : 1.86°C par mole de soluté dissous dans un kg d'eau (Dereuddre & Gazeau 1992, Cavender-Barès 2005). Ainsi les sucres solubles jouent un rôle indirect dans l'augmentation de la résistance. Ils permettent aux événements de congélation de se produire en extracellulaire (Levitt, 1980), là où la concentration est plus faible et donc où le point de congélation sera plus haut, ce qui produira une déshydratation cellulaire (Burke *et al.* 1976 ; Zweifel & Hasler 2000, Améglio *et al.* 2001b), puisque le potentiel hydrique total de la glace est plus négatif que celui de l'eau liquide à la même température (Mazur 1963, Rajashekar *et al.* 1982). Toutefois, il est aussi maintenant connu que les sucres solubles n'ont pas seulement un effet d'abaissement du point de congélation, mais aussi un effet protecteur vis-à-vis de cette déshydratation cellulaire (Wolfe & Bryant 1999, 2001, Bryant *et al.* 2001, Lenné *et al.* 2007, 2009) et de stabilisation des membranes biologiques (Crowe, 2002).

Ainsi le contenu en glucides et la capacité de produire des sucres solubles est un paramètre essentiel des capacités d'endurcissement des arbres et du noyer en particulier (Poirier *et al.* 2010).

A l'approche du débourrement, la resynthèse de l'amidon dans l'écorce et le xylème, déjà décrite par Sauter & Wellenkamp (1998) chez le peuplier, et

observée dans notre étude pour les rameaux de l'année des arbres en verger (Figure 4), explique également la sensibilité de tous les tissus et bourgeons composant le rameau d'un an.

Les deux paramètres physiologiques précédemment décrits (l'humidité pondérale et les teneurs en GFS) semblent donc bien interagir dans le niveau de résistance au gel d'un organe ou tissu. Ils ont déjà dans la littérature souvent été cités comme les deux facteurs explicatifs majeurs de l'acclimatation au gel (Sakai, 1966c ; Pogosyan & Sakai, 1969 ; Graham & Mullin, 1976 ; Levitt, 1980 ; Junttila *et al.*, 1983 ; Sauter & van Cleve, 1991). Chez le noyer, ils permettent de prédire l'état de résistance au gel (Poirier *et al.*, 2010). Notre étude généralise un peu ce concept à l'ensemble des organes et tissus d'un arbre. Ainsi, on a observé pour les racines, un fort contenu en GFS en hiver, qui ne produit pas un endurcissement à la hauteur de ce que l'on observe pour les parties aériennes. La partie racinaire est également la partie la plus hydratée (Figure 3) et cette hydratation limite très fortement la résistance au gel. On peut citer également les différences de contenu en GFS et humidité pondérale le long d'un rameau long (Tableau 1) qui conduisent à une certaine homéostasie de la résistance au gel pour toutes les parties du rameau.

La relation entre résistance au gel et humidité pondérale s'inscrit donc bien dans une relation inverse (cf. Figure 5). De plus, elle est limitée par deux asymptotes correspondant à la température de congélation d'une solution fortement diluée (entre 0 et -5°C, Levitt, 1980), l'autre asymptote correspondant à la fraction d'eau congelable (non liée) au sein des tissus (Wolfe *et al.*, 2002). Ainsi, plus la proportion d'eau congelable au sein d'un organisme est importante, plus la température de congélation est haute et, par conséquent, les dégâts cellulaires générés importants (Gusta *et al.*, 1975).

Entre ces deux limites physiques, on observe une influence importante du contenu en eau essentiellement pour des

états d'hydratation importants (Humidité pondérale : $WC > 1.0$). En deçà de cette valeur, la capacité de résistance diminue très rapidement et l'influence des solutés sur l'abaissement du point de congélation est sensible (Figure 6). En effet, la différence observée entre tissus dans la relation entre résistance au gel et contenu en sucres solubles est expliquée lorsque l'on prend en compte le contenu en eau. Plus la quantité d'eau est faible, plus la quantité de solutés est efficace pour abaisser le point de congélation. Les dégâts du gel sont réduits lorsque la quantité d'eau congelable est limitée à la fois en diminuant la quantité d'eau et en liant l'eau résiduelle par des solutés.

Pour conclure, la teneur en sucres solubles et l'humidité pondérale ont un impact prépondérant sur l'endurcissement des arbres. Leurs interactions selon le type d'organe permettent de comprendre les niveaux de résistance au gel mesurés selon les saisons et les organes ou tissus. Il nous semble maintenant intéressant de découpler ces deux paramètres en modulant le bilan de carbone à l'automne par des conditionnements d'arbre pendant la saison de végétation (*cf.* Poirier 2008) ou en modulant l'état hydrique à l'automne par des arrêts plus ou moins précoces de la transpiration, afin d'étudier plus finement les interactions entre ces deux paramètres et leurs conséquences sur la résistance au froid des différents organes de l'arbre.

Annexe 3 : Risques de dommages liés au gel : identification des périodes critiques.

Article en préparation



Risques liés aux gels pour les arbres : identification des périodes critiques

Guillaume Charrier^{1,2}, Mercè Guardia Bel³, Thierry Améglio^{1,2,*}

¹INRA, UMR547 PIAF, F-63100 CLERMONT-FERRAND, France

²Université Blaise Pascal, UMR547 PIAF, F-63 AUBIERE, France

³IRTA Torre Marimon E-08140 Caldes de Montbui (Barcelona), España

Introduction

Les objectifs de ce travail sont doubles. Le premier objectif est d'établir les risques de dommages liés au gel pour les rameaux et bourgeons du noyer. Ces risques seront donc évalués au cours des saisons et donc en fonction des capacités d'endurcissement de ces organes. Ils seront également évalués en fonction des conditions climatiques locales. Ainsi les risques aléatoires, liés à la probabilité d'avoir une température gélive inférieure à la température de résistance au gel de l'organe considéré sera comparée aux températures minimales de l'air mesurées pour les 25 dernières années pour nos sites expérimentaux.

Le second objectif est d'évaluer les mêmes risques en fonction de différentes variétés de noyers, afin de tester l'adaptabilité des variétés étudiés à nos sites expérimentaux et afin de proposer une démarche de choix de cultivars adaptés à un site donné pour ces risques de dommages liés au gel.

Matériels et méthodes

Seules les données nécessaires à la bonne compréhension de l'échantillonnage seront décrites dans cette partie.

Données climatiques

Au cours de cette étude, les données climatiques provenant de deux stations météorologiques proches de nos sites expérimentaux (plaine : Crouël : 03°08'50"E, 45°46'20"N, altitude 340m, moyenne montagne Theix : 03°01'00"E,

45°43'10"N, altitude : 880m) ont été utilisées.

Prélèvements

Sur rameaux

Chaque mois, cinq rameaux ont été prélevés par variété (Franquette, Lara, Hybrides précoces et Hybrides tardifs) et lieu (plaine et moyenne montagne) afin de déterminer la résistance au gel (Test LT₅₀ de la fuite des électrolytes : cf. chapitre 3).

Sur bourgeons

A la période du débourrement en conditions de plaine (4 Mai 2009), des rameaux de la variété Franquette (n=5) dont les bourgeons apicaux étaient totalement débourrés et les bourgeons en position basale encore fermés ont été prélevés. La résistance au gel (Test LT₅₀) des différents bourgeons en fonction de leur stade phénologique (A, B, C, D, E, nouveaux rameaux et nouvelles feuilles, définis selon l'échelle de Germain *et al.*, (1999)).

Sur différentes variétés (Chandler, Franquette et Hybrides précoces), les bourgeons terminaux ont été prélevés lorsqu'ils atteignaient les mêmes stades phénologiques (même échelle : A, B, C, D, E, nouveaux rameaux et nouvelles feuilles) du 21 Avril au 5 Mai 2010 et là encore, la détermination de la résistance au gel (LT₅₀) des différents bourgeons a été effectuée.

Analyses Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'ANOVA suivi de test post Hoc de Tukey (HSD). Des lettres différentes

indiquant une différence significatives entre groupes au seuil de 5%.

Résultats

La dynamique des températures minimales journalières enregistrées durant les 25 dernières années pour nos deux sites expérimentaux est présentée Figure 1a. Entre ces deux sites, on observe en moyenne +1,4°C pour la plaine sur les 25 dernières années, contre 2,8°C lors de l'hiver 2008-2009 (entre le 1^{er} septembre et le 30 juin). En plaine, l'arrivée du premier gel (<-2,5°C) se produit en moyenne autour du 14 Novembre (entre le 15 Octobre et le 29 Décembre selon les années). Pour notre année d'expérimentation, il a été observé le 28 Novembre 2008. Sur notre site de moyenne montagne, il intervient en moyenne plus tôt, le 3 Novembre (entre le 22 Septembre et le 15 Décembre) et en 2008, la date du premier gel, le 22 septembre est la date la plus précoce de ces 25 dernières années (Figure 1b).

On observe également des évènements de gels brusques à l'automne, succédant à des périodes de températures plus douces, comme en 1997, où la température de -9,2°C a été atteinte le 29 Octobre alors que la température moyenne des 15 jours précédent cet évènement, était de +10,8°C en plaine et +7,9°C en moyenne montagne. La figure 1c présente les températures produisant 50% de lyse cellulaire (LT₅₀) pour différentes variétés et localisations déterminées en 2008-09. Au début de l'automne, la résistance au gel n'est pas significativement différente entre variétés et lieux (P=0.144). Aucune différence n'est également observée entre rameaux et bourgeons au 16 Octobre (Rameaux : LT₅₀=-10,1 ± 0,88°C ; Bourgeons : LT₅₀=-10,0 ± 0,54°C ; P=0.870). Puis l'on observe une diminution de la LT₅₀ pour toutes les variétés dans les rameaux comme dans les bourgeons (Figure 1c) traduisant un endurcissement de ces organes.

Durant la période s'étalant du 15 Octobre

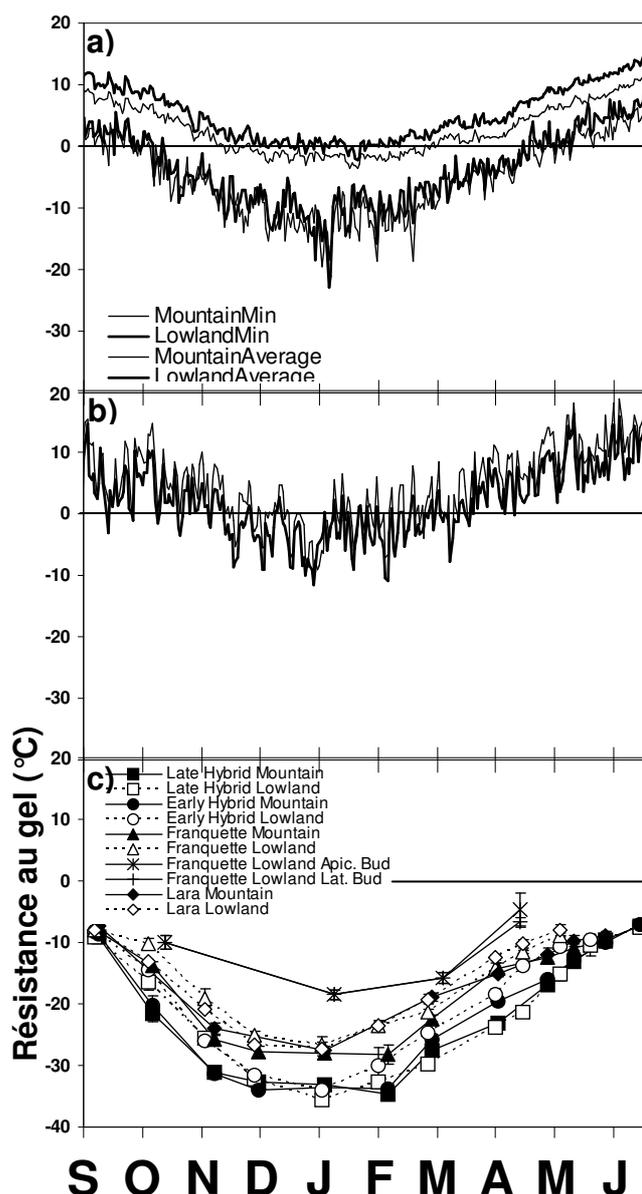


Figure 1. a) Températures moyennes et minimales observées durant la période 1982-2010 (Lowland : ligne fine) et 1985-2010 (Mountain : ligne épaisse) b) Températures minimales observées lors de l'hiver 2008-2009 c) résistance au gel observée chez différentes variétés (Hybrides tardifs : carrés, hybrides précoces : cercle, Franquette : triangle, et Lara : Losange) en plaine (lignes pointillées, symbole blanc) et en moyenne montagne (lignes pleines, symboles pleins) et dans les bourgeons de Franquette en plaine (Bourgeons apicaux : croix à 8 branches, bourgeons latéraux : croix à 4 branches). Au débourrement, les bourgeons apicaux et latéraux sont distingués. Chaque point représente la moyenne et les barres l'erreur-standard de n=5 échantillons.

au 31 Décembre, les températures minimales diminuent à la même vitesse entre les deux lieux (-0,12°C.j⁻¹ ; P= 0.819) mais sont significativement plus faibles en

moyenne montagne de 3,5°C. On observe également une diminution de la LT_{50} significativement différente ($P < 0.0001$) entre variétés (55,2% de la variance) et lieux (34,8%). Par contre, pour cette même période, aucune différence significative n'est observée entre les variétés fruitières, Lara et Franquette ($P = 0.994$) ou entre les hybrides pour la production de bois ($P = 0.512$).

Au cœur de l'hiver, les températures minimales moyennes en janvier pour les 25 dernières années sont plus basses en moyenne montagne (-4,5°C) qu'en plaine (-2,8°C). C'est durant cette période que les températures les plus faibles sont observées (en moyenne $-11,7 \pm 3,1^\circ\text{C}$ en plaine et $-13,5 \pm 2,8^\circ\text{C}$ en moyenne montagne) avec un record de froid de $-15,4^\circ\text{C}$ en plaine et de $-19,5^\circ\text{C}$ en moyenne montagne, l'année 1987. On peut voir également, que la durée de la période de froid est plus importante en moyenne montagne, avec une remontée significative des températures minimales observées en Mars contre Février pour la plaine.

Pour la résistance au gel des rameaux, le niveau maximal d'endurcissement est similaire entre noyers fruitiers (Lara et Franquette) quel que soit le lieu ($-27,4^\circ\text{C}$; $P = 0.555$). C'est également le cas pour les noyers hybrides à bois à l'exception des hybrides tardifs en plaine légèrement plus résistant que les hybrides précoces et les hybrides tardifs en moyenne montagne ($-35,7$ vs. $-33,6^\circ\text{C}$, $P < 0.008$). Au niveau des bourgeons, une sensibilité supérieure aux rameaux est observée ($LT_{50} = -18,5 \pm 0,4^\circ\text{C}$).

Lors de la fin de l'hiver et le début du printemps, les températures minimales observées sur les 25 dernières années remontent plus rapidement que le niveau de résistance dans l'ensemble des organes mesurés l'année 2008-09. Par contre, la vitesse de remontée des températures est identique en plaine et en moyenne montagne ($0,11^\circ\text{C} \cdot \text{j}^{-1}$), même si le phénomène est plus précoce en plaine (dès Février, contre Mars pour la moyenne montagne).

Durant la même période, les niveaux de résistance diminuent pour les rameaux ainsi que pour les bourgeons. Une analyse de covariance entre les différents lieux de prélèvement montre une différence significative pour Franquette ($P = 0.0002$) et les hybrides tardifs ($P = 0.021$), mais pas pour les Lara (0.998) et les hybrides précoces ($P = 0.787$). Les bourgeons de Franquette sont également devenus plus sensibles ($LT_{50} = -15,8$), mais résistent à des températures nettement plus basses que les températures observées à la même date ($-7,7^\circ\text{C}$ en moyenne montagne et $-5,9^\circ\text{C}$ en plaine le 21 Mars avec un minimum historique $-10,3^\circ\text{C}$, le 3 Mars 1988 et $-8,2^\circ\text{C}$, le 15 Mars 1987 respectivement pour la moyenne montagne et la plaine).

Au débourrement, les rameaux restent relativement résistants alors que les bourgeons deviennent extrêmement sensibles. Une divergence est observée entre les bourgeons terminaux qui débourrent les premiers et les latéraux, un peu plus tardifs ($-4,7$ vs $-6,7^\circ\text{C}$; $P = 0.030$). Ainsi au débourrement, un gel mesuré à cette température de $-4,7^\circ\text{C}$, s'est déjà produit par le passé et, pour 5% des années, il est inférieur à $-3,44^\circ\text{C}$, ce qui peut être dommageable pour les bourgeons apicaux, mais pas chez les latéraux ($LT_{50} = -6,7^\circ\text{C}$).

La différence entre bourgeons apicaux et latéraux a été caractérisée plus finement le long d'un rameau à partir d'une même date

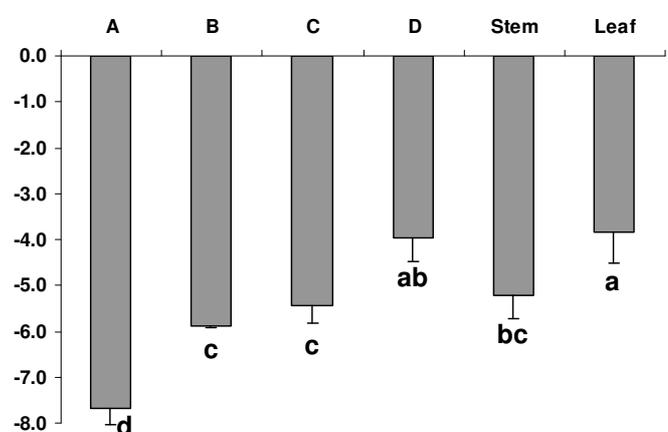


Figure 2. Résistance au gel des bourgeons en fonction de leur stade phénologique prélevés à la même date (04/05/2009) le long d'un rameau, les stades les plus avancés étant situés vers l'apex.

Annexe 3 : Risques de dommages liés au gel : identification des périodes critiques.

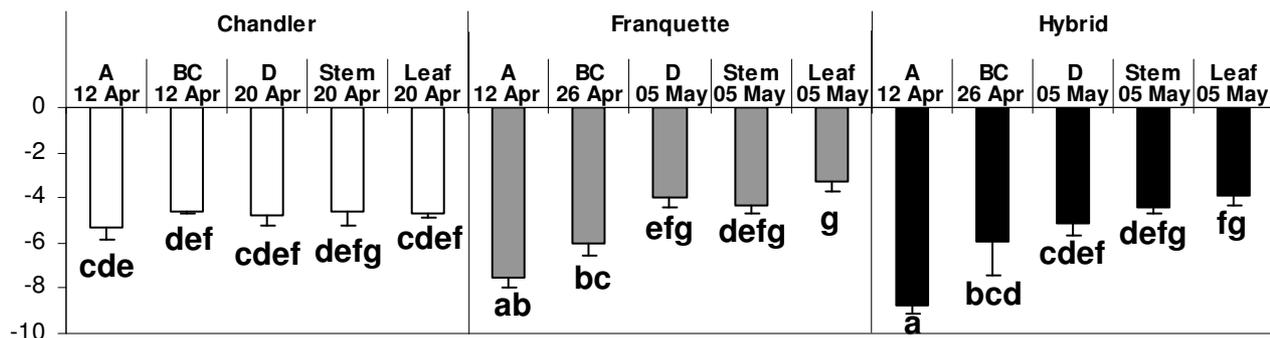


Figure 3. Résistance au gel des bourgeons terminaux en fonction de leur stade phénologique prélevés à différents moments selon l'avancée du cycle de développement chez 3 variétés Chandler, Franquette et des hybrides *J.regia x nigra*.

de prélèvement (05/05/2009). Ainsi, du bourgeon apical, entièrement débourré (feuilles en déploiement et tige en allongement) jusqu'aux bourgeons basaux, les écailles externes encore totalement serrées, les bourgeons ont été différenciés selon leur stade phénologique. Une évolution significative de la résistance au gel est observée selon ces stades : de $-7,7 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ (bourgeon basal, stade A) jusqu'à $-4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (bourgeon subapical stade D). La résistance des organes nouvellement déployés a été observée significativement différente ($P = 0.043$) entre feuilles ($LT_{50} = -3,9 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$) et tiges ($LT_{50} = -5,2 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Les températures minimales historiques sont donc très proches des niveaux de résistance observés montrant que les risques de dégâts dus au gel sont relativement élevés sur les bourgeons apicaux et les nouveaux organes végétatifs. On observe également chez d'autres variétés de noyer, des variations dans la date de débourrement : précoces (Chandler, débourrement des apicaux : le 12/04/2009, des latéraux le 20/04/2009) ou plus tardifs (Hybrides 30/04/2009 et 7/05/2009 cf. Chapitre4). Nous avons donc étudié la résistance au gel des bourgeons terminaux pour différentes variétés en fonction cette fois de la date à laquelle le stade phénologique est atteint. Pour la variété Chandler, aucune évolution significative de la résistance au gel des bourgeons apicaux n'a été observée du 12 au 20 Avril (en moyenne $LT_{50} = -4,8^{\circ}\text{C}$ tous stades confondus). Pour Franquette, des différences ont été observées entre

stades phénologiques, les stades les plus avancés étant significativement plus sensibles. Mais, dans ce cas, aucune différence significative n'est observée entre tiges et feuilles. Les valeurs observées ne sont pas significativement différentes de celles observées précédemment (figure 2), pour une même date et en fonction de chaque stade phénologique observé le long du rameau. Concernant les noyers hybrides, seule une différence significative a été observée entre le stade A et tous les autres.

Si l'on compare les niveaux de résistances pour les différentes variétés, on observe peu de différences, à l'exception d'une résistance supérieure chez Chandler par rapport à Franquette pour les feuilles et le stade BC, et inférieure pour le stade A par rapport aux deux autres variétés. Ainsi, si les stades les plus avancés s'avèrent les plus sensibles, et que la différence entre variétés est faible ou négligeable, les différences dans la date d'apparition du stade débourrement sont considérables. Les dates moyennes de débourrement sont ainsi réparties sur environ 50 jours en plaine (Tableau 1).

Le tableau 1 présente également les températures minimales observées durant les 25 dernières années dans un intervalle de plus ou moins 3 jours autour de la date de débourrement observé en 2009. On voit alors, que le risque de gel est faible mais non négligeable pour les trois variétés les plus précoces (Serr, Chandler, Lara). Les températures minimales observées se situent entre -4 et -5°C avec pour 5% des

Annexe 3 : Risques de dommages liés au gel : identification des périodes critiques.

Variety	Lowland				Mountain			
	Date of Budburst (Julian Days \pm SD)	Minimal Temperature at the same date \pm 3 days (1982-2010)	Minimal limit of confidence interval (95%)	Probability of frost (-2.5°C) after the DBB	Date of Budburst (Julian Days \pm SD)	Minimal Temperature at the same date \pm 3 days (1982-2010)	Minimal limit of Confidence Interval (95%)	Probability of frost (-2.5°C) after the DBB
Serr	94 \pm 0.64	-4.2	-2.1	28%	105	-7.4	-4.1	48%
Chandler	103 \pm 1.06	-5.1	-2.6	17%	114	-6.1	-2.8	8%
Lara	112 \pm 0.62	-4.7	-1.8	14%	123 \pm 0.66	-2.7	-1.4	4%
Franquette	121 \pm 1.88	-2.3	1.1	0%	129 \pm 1.66	-3.3	-0.3	8%
Early Hybrids	121 \pm 3.68	-2.3	1.1	0%	135 \pm 1.69	-2.7	0.2	4%
Late Hybrids	143 \pm 2.71	1.2	2.6	0%	145 \pm 3.60	-2.2	1.4	0%

Tableau 1. Dates observées de débourrement en 2009 en conditions de plaine et de moyenne montagne, température minimale observée dans les 7 jours encadrant cette date, avec la borne inférieure de l'intervalle de confiance (95%) et probabilité d'observation d'un gel inférieur à $-2,5^{\circ}\text{C}$ à cette date chez différentes variétés de noyer. Les données climatiques portent sur les années 1982-2010 en plaine ; 1985-2010 en moyenne montagne.

années des gels inférieurs à -2°C . Cette constatation est confirmée par le suivi (2007-08) où les bourgeons terminaux de Serr et Chandler, ont subi, en plein débourrement, un événement de gel à $-2,2^{\circ}\text{C}$ (16 avril 2008) qui a été suffisant pour endommager une grande partie des bourgeons terminaux déjà débourrés (données non présentées).

Sous nos conditions de plaine, le gel le plus tardif généralement observé se situe autour du 30 Mars (entre 4 Février et le 27 Avril pour les 25 dernières années). Dans ces conditions, et si on faisait l'hypothèse que les dates de débourrement sont approximativement constantes pour chaque variété, la variété la plus précoce Serr subirait dans 28% des cas un gel dans les plus ou moins trois jours encadrant sa date de débourrement. Les variétés Chandler et Lara, un peu plus tardives, ne subiraient des dommages qu'une année sur six (17% et 14%, respectivement). Enfin, les variétés Franquette et hybrides n'auraient, quant à elles, aucun risque de subir de dommages liés au gel.

Sous nos conditions de moyenne montagne, le gel le plus tardif généralement observé se situe autour du 9 Avril (entre le 5 Mars et le 15 Mai pour les 25 dernières années). Les dates de débourrement pour les mêmes variétés sont retardées de 2 (pour les hybrides tardifs) à 14 jours (pour les hybrides précoces). En

estimant un effet similaire sur les variétés Serr et Chandler, leurs dates de débourrement se situeraient entre le 6 et 18 avril (Serr) et le 15 et 27 Avril (Chandler). Concernant la variété Serr, à cette période, la fréquence des gels est très importante, un gel des bourgeons une année sur deux environ (48 %). Concernant les autres variétés, la probabilité de gel est relativement faible entre 0 : hybrides tardifs et 8% Chandler et Franquette).

Discussion

Mécanismes d'endurcissement et risques de dommages à l'Automne

Les risques de dommages liés au gel évoluent au cours du temps et selon le type d'organe. Ils évoluent également selon la variété. Néanmoins, au début de l'automne, la résistance au gel est globalement homogène entre variétés et lieux de prélèvement et les rameaux et bourgeons sont déjà capables de résister à des températures gélives, avant tout risque d'aléa climatique gélif pour nos deux sites d'expérimentations (Figure 1). En effet, le premier gel inférieur à $-2,5^{\circ}\text{C}$ est observé en moyenne, sur les 25 dernières années, le 14 Novembre pour notre site expérimental de plaine (du 16 Octobre pour l'année la

plus précoce au 29 Décembre pour l'année la plus tardive). Pour notre site expérimental de moyenne montagne, cette date moyenne est plus précoce. On l'observe le 3 Novembre avec une variabilité allant du 22 Septembre au 15 Décembre. Dans tous les cas, les arbres sont déjà endurcis pour supporter un tel niveau de gel.

En effet, le processus d'endurcissement est décrit dans la littérature, comme se déroulant en deux phases, une phase précoce, principalement sous le contrôle de la photopériode et une phase tardive sous le contrôle de la température (Larcher, 1981 ; Sakai & Larcher, 1987). Ainsi, durant la première phase, les arbres peuvent atteindre des niveaux de résistance de l'ordre de -10°C (Weiser, 1970) comme nous l'avons observé pour nos noyers. Dans l'étude de Schwarz (1970), la photopériode seule a été capable sur *Rhododendron ferrugineum* et *Pinus cembro* d'engendrer des niveaux de résistance équivalents. Ainsi, à cette période du début de l'automne, sur nos sites expérimentaux, la photopériode est descendu en dessous de 11h, considérée comme la photopériode critique pour déclencher l'endurcissement et l'entrée en dormance (Greer & Warrington, 1982 ; Welling *et al.*, 1997) et le degré de résistance semble suffisant au regard des températures observées sur les 25 dernières années.

Par la suite, on observe pour l'année 2008-09, un endurcissement plus rapide en conditions de moyenne montagne qu'en plaine, quelque soit la variété considérée (Figure 1). En effet, la deuxième phase de l'endurcissement en conditions de jours courts, est sous le contrôle des températures (Aronsson, 1975 ; Christersson, 1978), et l'endurcissement est d'autant plus rapide que les températures sont basses (Greer, 1983). Nos résultats sont cohérents avec de nombreuses études, néanmoins, Poirier *et al.* (2010) sur les mêmes arbres (Franquette et hybrides) et même site expérimental, observe un endurcissement plus rapide en

conditions de plaine pour une autre année d'expérimentation (2004-05). Une différence climatique est observée entre ces deux années d'expérimentation. Les mois de septembre et d'octobre en 2004 présentent des températures beaucoup plus douces que durant année 2008 en plaine ($10,9^{\circ}\text{C}$ vs. $8,0^{\circ}\text{C}$ pour les températures minimales moyennes de 2004 et 2008 respectivement), mais également en montagne ($7,8^{\circ}\text{C}$ vs. $4,9^{\circ}\text{C}$ en 2004 et 2008 respectivement). Ainsi, s'il apparaît normal que les dynamiques soient accélérées en 2008 par rapport à 2004, en conformité avec les travaux de Greer (1983), nous ne pouvons expliquer uniquement par un facteur thermique ces inversions de vitesse d'endurcissement entre la plaine et la moyenne montagne pour ces deux années d'expérimentations. Il faut donc faire intervenir d'autres variables, qui selon le modèle d'endurcissement au gel établi pour le noyer (Poirier *et al.* 2010), pourraient être soit le contenu en sucres solubles, soit l'humidité pondérale.

Début décembre, l'humidité pondérale est plus élevée en moyenne montagne en 2004 qu'en 2008 (1.14 ± 0.08 vs. 1.01 ± 0.02 ; $P = 0.057$) et pourrait expliquer ces différences de vitesse d'endurcissement. En effet, le contenu en eau est un des paramètres essentiels dans l'acquisition d'une résistance au gel (Levitt, 1980, Sakai & Larcher, 1987). Ainsi, une diminution de la quantité d'eau libre au début du processus d'acclimatation (Luoranen *et al.*, 2004) est généralement observée. Cette diminution permet la concentration du cytosol en solutés et abaisse le point de congélation (Li & Weiser, 1971 ; Chen & Li, 1977, Anisko & Lindstrom, 1996). Dans tous les cas, cette vitesse d'endurcissement variable selon le contenu en eau et les températures montre que pour modéliser correctement l'endurcissement, il faut soit utiliser l'approche développée par Poirier *et al.* (2010), ce qui nécessite de mesurer ces paramètres pour chaque date ; soit en alternative aux mesures d'humidité pondérale être capable de modéliser à

partir de données climatiques l'évolution du contenu en eau des rameaux de noyer.

Résistance maximale hivernale et évaluation des risques

Le niveau maximal de résistance au gel semble être un paramètre indépendant des conditions climatiques (cf. figure 1), comme le montre nos résultats pour la variété fruitière Franquette et l'hybride à bois NG38 pour nos deux sites expérimentaux. Cette résistance maximale est par contre, variable selon la variété, avec le croisement hybride (*J. regia* * *J. nigra* : Maximal $LT_{50} = -34,1 \pm 0,3$ °C) nettement plus résistant que *J. regia* var. Franquette (Maximal $LT_{50} = -27,3 \pm 0,7$ °C). Ainsi, contrairement à l'automne ou au printemps, la résistance maximale hivernale resterait peu variable d'une année à l'autre (Nilsson & Walfridsson, 1995 ; Bower & Aitken, 2006).

Des résultats comparables sont observés par Dantuma & Andrews, (1960) chez l'orge et le blé, Pogosyan & Sakai, (1969) chez la vigne, Larcher & Mair (1968) chez *Fraxinus ornus* et Morin *et al.* (2007) chez *Quercus sp.* L'effet le plus notable est la durée de la phase de résistance maximale, plus longue dans les conditions thermiques les plus froides.

Pour *Juglans sp.*, dans nos conditions expérimentales, le niveau de résistance apparaît donc suffisant pour supporter les gels les plus intenses dans la majorité des cas. En effet, les résistances aux gels observés durant cette phase pour nos cultivars sont supérieures au gel le plus intense historiquement observé (-19,5°C). Néanmoins, au cours d'évènements exceptionnellement froids, les bourgeons, organe aérien le plus sensible (cf. Figure 1 et Chapitre 2,a), peuvent être endommagés (Minimal $LT_{50} = -18,5$ °C), comme probablement au cours de l'hiver 1987-1988 en moyenne montagne.

Mécanismes de désendurcissement et

risques au débourrement.

Au printemps, une forte divergence apparaît entre les différentes variétés (fruitières ou à bois). Les variétés dont le débourrement est plus précoce se désendurcissent plus tôt au printemps. Néanmoins, la résistance des rameaux de l'année reste inférieure aux températures observées sur nos sites expérimentaux. A l'opposé, concernant les bourgeons, ceux-ci deviennent relativement sensibles à l'approche du débourrement et, cette période constitue pour eux le risque maximal vis-à-vis du gel. Ainsi, une LT_{50} de l'ordre de -4°C est observée, température qui correspond pour un organe végétal à la prise en glace de l'eau extracellulaire et/ou intracellulaire pour un organe non acclimaté au gel (Levitt, 1980). Ces dommages liés au gel autour de cette température peu négative, sont aussi le reflet de l'accroissement important des quantités d'eau dans les organes au printemps. En effet, sous l'effet de la remontée des températures et de la reprise d'activité de l'appareil racinaire (Améglio *et al.*, 2002 ; Turcotte *et al.*, 2009), la réhydratation de l'arbre se produit. Ces risques sont également à combiner à l'impact des températures sur le débourrement des bourgeons lui-même (Timmis *et al.*, 1994). En effet, en période d'écodormance, un accroissement des températures minimales au printemps, augmente la précocité du débourrement et, par conséquent, le risque de dommages du gel des bourgeons durant cette période.

Nous avons observé une sensibilité au gel des bourgeons qui évolue en fonction du stade phénologique du bourgeon, que ce soit le long d'un rameau (de l'apex jusqu'à la base du rameau, cf. Figure 2) ou au cours du développement (du gonflement du bourgeon jusqu'au déploiement des nouvelles feuilles, cf. Figure 3). Ainsi, lors du printemps 2007, nous avons observé, chez les variétés fruitières les plus précoces (Serr, Chandler) des dégâts sur les bourgeons terminaux alors qu'ils étaient au stade « débourrement » pour une

température de -2.2°C (16 avril 2007). Ceci est cohérent avec les hypothèses de Cannell & Smith (1984) qui considèrent que des températures inférieures à $-2,5^{\circ}\text{C}$ suffisent à générer des dégâts sur les bourgeons dans les sept jours encadrant le débourrement. En situation de refroidissement radiatif, les organes non protégés, comme les bourgeons terminaux, se trouvent communément à des températures inférieures de 1 à 3°C à la température de l'air (Sakai & Larcher, 1987), ce qui correspond aux valeurs de lyse cellulaire mesurées (LT_{50}).

Ces deux variétés dont la date de débourrement se situe généralement dans la première quinzaine d'Avril ont ainsi vu une partie de leurs bourgeons endommagés et les bourgeons n'ayant pas encore atteint le stade débourrement et encore vivants, n'ont débourré que vers le 20 Avril.

La précocité de débourrement constitue donc un facteur important dans l'augmentation des risques de gel printaniers, essentiellement lors de la sortie de la phase d'écodormance (Hänninen, 2006). Ainsi, la variété fruitière (Serr), la plus précoce sous nos climats (débourrement \approx 15 Avril), débourrerait avec une probabilité de rencontrer un gel inférieur à $-2,5^{\circ}\text{C}$ une année sur deux, ce qui est fortement pénalisant pour sa production fruitière, mais qui ne pénalise pas la survie de l'arbre, même si le carbone investi dans le développement des premiers bourgeons est perdu pour les besoins de croissance de l'arbre.

En revanche, pour les autres variétés, la probabilité de dommages liés au gel apparaît plus faible ($<10\%$), avec des risques plus importants pour la variété Chandler, qui ne survit pas sur notre site de moyenne montagne et présente un développement plus limité que les autres variétés à Crouël. De plus, c'est chez Chandler qu'aucune différence significative n'est observée entre tous les stades phénologiques étudiés, ce qui montre que la résistance au gel est relativement faible bien avant le

débourrement si on la compare à la variété Franquette, dont les stades phénologiques les plus précoces sont significativement plus résistants. Ainsi, les dommages sont probablement provoqués chez Chandler par des gels antérieurs au débourrement *stricto sensu*.

Conclusion

Pour conclure, nous avons identifié au cours de cette étude trois périodes critiques concernant les risques de dégâts vis-à-vis du gel chez le Noyer. Ainsi, en automne, si l'initiation de l'endurcissement par la photopériode permet d'anticiper la descente des températures, l'effet d'autres variables climatiques peut s'avérer cruciale dans le développement d'une sensibilité accrue. En effet, un niveau conséquent de résistance ne peut être atteint que sous l'effet des basses températures. Or les nombreuses études sur les changements climatiques convergent (IPCC, 2007) vers une augmentation des températures de $+4^{\circ}\text{C}$ en moyenne, durant l'automne en Europe (Christensen & Christensen, 2007), même si aucune tendance significative n'apparaît sur l'évolution de la date du premier gel automnal depuis 25 ans dans nos sites expérimentaux. Après cette phase initiale, une période de température douce peut ralentir (Repo *et al.*, 1996) et même provoquer un désendurcissement des arbres (Cannell *et al.*, 1985b) et, par conséquent, des dommages automnaux peuvent se développer (Redfern & Cannell, 1982). De plus, une faible force de déshydratation au cours de cette période va limiter la capacité d'endurcissement et nous avons vu le rôle prépondérant de l'humidité pondérale sur le niveau de résistance au froid. Ainsi cette période du cycle annuel du développement de l'arbre, nous semble particulièrement critique en particulier pour la survie de l'arbre.

Ensuite, en plein hiver, la capacité de résistance maximale semble être une variable inhérente à une espèce donnée, peu plastique en réponse aux conditions environnementales. Ainsi, cette valeur peut être utilisée pour déterminer la limite

Annexe 3 : Risques de dommages liés au gel : identification des périodes critiques.

septentrionale ou altitudinale de la distribution des espèces comme dans le modèle Phenofit (Chuine & Beaubien, 2001). Nous avons vu qu'en dehors des bourgeons, ces risques étaient faibles, tout particulièrement en terme de survie pour l'arbre dans sa niche climatique.

Enfin, au printemps, la précocité de débourrement est un facteur qui augmente fortement le risque d'exposition aux gels tardifs (Cannell & Smith, 1986). Par contre, à ce moment également, la survie du végétal ne semble pas engagée à l'exception peut-être des espèces en marge de leurs aires de répartition, où la

répétition des dommages dus au gel sur les bourgeons en plein débourrement peut conduire à un dépérissement à plus ou moins long terme. De plus, dans les comparaisons intra spécifiques, on observe un effet génotypique important permettant de sélectionner des variétés plus résistantes à cette période.

Dans tous les cas, pour prendre en compte ces risques dans un climat changeant, les périodes de transition, à l'automne ou au printemps seront des périodes de risques maximaux où des connaissances sur la physiologie de l'arbre restent encore à acquérir.

Annexe 4 : Impact de la chute des feuilles sur la capacité à s'acclimater au gel du noyer

Article publié dans Environmental and Experimental Botany pour la special Issue Responses,
Acclimations and Adaptations of Northern Plants to Global Change





The timing of leaf fall affects cold acclimation by interactions with air temperature through water and carbohydrate contents

Guillaume Charrier^{a,b}, Thierry Améglio^{a,b,*}

^a INRA UMR4 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

^b Clermont Université, Université Blaise Pascal, UMR4 547 PIAF, F-63100 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2010

Received in revised form

20 December 2010

Accepted 27 December 2010

Keywords:

Winter biology

Juglans regia

Water content

Carbohydrate

Photoperiod

Temperature

ABSTRACT

Three parameters (i.e. the water content, soluble sugar content and minimal air temperature) can be used to predict the cold acclimation process of walnut trees. In order to test this assumption, two-year-old walnuts were defoliated at two different dates, i.e. mechanical defoliation in early October (early leaf fall, EF) or natural defoliation in early November (natural leaf fall, NF) and conditioned in either outdoor freeze-deprived or cold-deprived ($T_{min} > 13^{\circ}\text{C}$) greenhouses over winter. Even if early defoliation date could have affected short day signal perception (SDSP), water balance and carbohydrate metabolism were more altered. EF treatment, by stopping transpiration, significantly increased tree's water content and at warm temperature high root activity stopped normal winter dehydration. Starch content decreased in all treatments, but there was only a significant increase in soluble sugar content when water content had sufficiently decreased. Thus, depending on date of defoliation, cold-deprived trees were or were not able to acclimate to frost (minimal frost hardness = -21.8°C vs. -22.1°C in controls (freeze-deprived) for NF and -13.7°C vs. -25.3°C in controls for EF). Different treatments showed the relationship between minimal water content observed during winter and maximal soluble sugars synthesized. Thus, the cold acclimation process appeared dependent on these physiological parameters (water and soluble sugar contents) through the interaction between air temperature and timing of leaf fall.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Winter biology of perennial plants is mainly driven by environmental factors, especially cold acclimation and dormancy release. Previous studies on cold acclimation showed that two successive and induced differently stages follow themselves to permit frost resistance. In a first stage, cold acclimation is induced only after budset, leaf senescence and buds dormancy by a photoperiod decrease (Leinonen, 1996; Welling and Palva, 2006). At this time, meristematic cells become dormant, leaves compounds are translocated in perennial parts and cold related proteins are synthesized. After this first stage, a relative resistance level is reached. For *Betula pendula* cv Roth, it has been demonstrated that phytochrome A in leaves is used for the short day perception (Olsen et al., 1997) and potentiates low temperature response in leaf tissue (Puhakainen et al., 2004).

Thereafter, during second stage, chilling temperatures are the main driving factor of acclimation (Sakai, 1966; Aronsson, 1975;

Christersson, 1978). Different metabolic synthesis are observed with different chemical compounds maintaining membrane fluidity (polyunsaturated fatty acids, sphingolipids), cryoprotectant (anti freeze protein, dehydrins) or lowering freezing point (carbohydrates, amino acids, organic acids) (Sakai and Larcher, 1987). Impact of chilling temperatures has been extensively studied. Thus warm temperatures should slow down cold acclimation during autumn and, as a consequence, generate less frost resistance at first freezing event time (Sakai and Larcher, 1987; Repo et al., 1990).

In autumn after leaf fall, water uptake decreased with soil temperature, related with root cell membrane fluidity (Ewers et al., 2001), meaning trees become dehydrated (Sparks et al., 2001). Moreover, osmotic content increased, as temperatures drop and starch accumulated during the previous summer was converted into soluble sugars (Sauter, 1988; Witt and Sauter, 1994). Thus, for walnut trees, Poirier et al. (2010) were able to predict cold acclimation in trees using water and soluble sugar contents, combined with minimal temperatures as inputs.

So, defoliation treatment during growing season has a significant repercussion on cold acclimation potential through decrease in carbohydrate amount (Thomas and Blank, 1996), but could have also a potential effect on short day signal perception (SDSP). In this survey, two different leaf fall dates (i.e. early and natural leaf fall) and three conditioning temperatures (i.e. outdoor, freeze-deprived,

* Corresponding author at: U.M.R. PIAF, Site INRA de Couéil, 234 av. du Brezet, F-63100 Clermont-Ferrand Cedex 2, France. Tel.: +33 (0)473624369; fax: +33(0)473624454.

E-mail address: Thierry.Ameglio@clermont.inra.fr (T. Améglio).

cold-deprived) on frost resistance pattern were used to test the SDSP-climate interaction on the physiology (i.e. water and carbohydrate contents) of cold acclimation process.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and treatment

Two-years-old walnuts (*Juglans regia* cv Franquette) were housed in a greenhouse for an entire winter after the same growing season in a natural summer climate. Treatments were started either in early October (08/10/2008, daylength = 11h09mn) with mechanical defoliation (early leaf fall: EF) or early November (1/11/2009, daylength = 10h00mn) after natural leaf senescence (natural leaf fall: NF). For each treatment, 15 trees were placed in a warm greenhouse with a minimal temperature higher than +13°C (cold-deprived trees) while 15 control trees with the same characteristics and history were housed in a freeze-proof greenhouse all winter-time. For NF treatments, 15 added potted trees were left in natural conditions (outdoor trees). For each treatment, one-year-old twigs were sampled every month over two winter periods (2007–2008 for EF and 2008–2009 for NF) on five different trees.

2.2. Frost hardness tests

The electrolyte leakage test is based on the principle that damage to cell membranes results in an enhanced leakage of electrolytes from the cell. Recording the amount of leakage will thus provide an estimate of tissue damage. The test is fairly simple and rapid, yields quantitative data and requires only small amounts of plant material. However, certain concerns limit the validity of the technique to determine the real temperature at 50% lethality (LT_{50}). For this, several authors indicated that the precision of freezing stress resistance could be estimated by simultaneously using two or more viability tests and by combining the results of these tests (Zhang and Willison, 1987; Lindén, 2002). Nevertheless, temperature of frost hardness obtain with this method represented a good approximation of this temperature at 50% lethality and permitted to assess frost hardness dynamics on same trees during whole winter with the same and comparable way for different treatments.

For every sample date, each one-year old twigs ($n=5$), they were cut into six 5-cm long segments without buds per dates to assess frost hardness. All fresh harvested segments were washed in distilled-deionised water and placed in a moistened tissue and wrapped in aluminum foil. Shoot segments were cooled to one of four sub-zero temperatures. In addition, there was an unfrozen control in a cold room at +5°C (control) and a lethal control in deep freezer at -80°C. In each case, sample temperatures were monitored using copper-constantan thermocouples inserted into the foil pouch. For control and lethal control, samples were cooled at the rate of $\approx 7^\circ\text{C h}^{-1}$ in pre-chilled vacuum flask. For temperature-controlled boxes, cooling and warming cycle were computer-controlled by a circulator bath (Ministat Huber, Offenbourg, Germany) with external Pt100 into the chamber. A steady rate of cooling and thawing of 5°C h^{-1} and with freeze-thaw cycle between +5°C to -5°C, -10°C, -20°C and -30°C was applied, respectively. Before thawing, the air temperature was maintained during 1 h to the freeze temperature. Temperature were recorded with data logger (Campbell, Logan, United States) as one-minute averages and averaged at 5 min intervals. After conditioning, segments were used to assess frost hardness with electrolyte leakage method (Zhang and Willison, 1987; Sutinen et al., 1992).

After this freezing treatment, the segments were cut into 5 mm-long sections and placed in glass vials with 15 ml of distilled-

deionized water. The vials were shaken for 24 h at +5°C (limiting non-frozen induced lysis) on a horizontal gravity shaker (ST5, CAT, Germany). The electrolytic conductivity of the water in which the stem segments were immersed (C_1) was measured at room temperature with a conductimeter (Held Meter IF340, TetraCon® 325, Germany).

Samples were then autoclaved at +120°C for 30 min, cooled to room temperature, and a second conductivity measure (C_2) was done. Relative electrolyte leakage (REL) was calculated as $(C_1/C_2) \times 100$ as described in Zhang and Willison (1987). We assumed the following relationship between REL and percentage of cellular lysis (L) for each sample:

Frost hardness of living cells in stems was estimated as the temperature where we observed inflection point (C) of the logistic sigmoid function (Repo and Lappi, 1989)

$$y = \frac{A}{1 + e^{B(C-x)} + D} \quad (1)$$

where y is relative electrolyte leakage (REL) and x is exposure temperature. The parameters A and D define the asymptotes of the function, and B is the slope at the inflection point C . The main disadvantage of the logistic sigmoid model is that the freeze-death probability curves are assumed to be symmetric. The results revealed that freeze-response may be inherently asymmetric and thus, fitting the data with a symmetric model may lead to biased lethality estimates (Lindén et al., 1996; Lindén, 2002). However, the bias was largest for point estimates near the asymptotes of the logistic function, while the inflection point estimates given by the symmetric and the asymmetric function were quite similar (Lindén, 2002).

The parameter estimation of Eq. (1) was performed by nonlinear regression using ExcelStat ver. 7.5.2. Mean frost hardness was calculated for each treatment from the individual frost hardness values.

2.3. Water content

Stem sample fresh weights (FW) were measured, then the stem samples were frozen with liquid nitrogen and lyophilized. After freeze-drying, dry weights (DW) were measured and water content was calculated as $(FW - DW)/DW$.

2.4. Extraction and quantification of carbohydrates

Lyophilized samples ($m > 2\text{g}$) were ground into a powder that was used (50 mg) for extraction of soluble carbohydrates. It was melted with 1 ml of mannitol (5g l^{-1}) in ethanol 80%, and shaken for 30 min at 80°C, then centrifuged for 10 min at $15,775 \times g$ (SR2000, Prolabo, France). The supernatant was filtered in a cartridge containing AGX-1 anion-exchange resin (150 μl), polyvinylpyrrolidone (100 μl) and activated carbon (200 μl). The solid was melted three more times with ethanol 80% (1 ml), ethanol 50% (0.5 ml) and ethanol 80% (0.5 ml), before the cartridge was rinsed with ethanol 80% (1 ml). The liquid fraction was SpeedVac-dried for carbohydrates analysis and the solid was SpeedVac-dried for starch analysis.

For carbohydrate analysis, dried samples were made soluble in 0.5 ml water and separated on an Aminex-HPX87C Column with a refractometer (R12000, Sopares).

To measure starch content, solid was melted with NaOH 0.02 N and autoclaved (2 h, 120°C, 1 bar). Samples were then incubated with amyloglucosidase (1h30mn, 52°C) in a microplate well, where each well contained 12 μl ATP ($5 \times 10^{-4}\text{ mol l}^{-1}$), 12 μl NADP ($1.4 \times 10^{-4}\text{ mol l}^{-1}$), 60 μl triethanolamine buffer (triethanolamine 0.48 mol l^{-1} , magnesium sulfate $1 \times 10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$, pH=7.6), 96 μl water and 12 μl of sample supernatant. A spec-

trophometric measurement was made at 340nm (Power Wave 200, BioTek instruments) as a blank before incubation with 10 μ l of hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) for 40 min under shaking after which another absorbance measurement was taken.

2.5. Statistical analysis

Statistical comparisons between treatments were performed with five replicates for each date and treatment by using an ANOVA test (i.e. Tukey's Honestly Significant Difference test) with an error $\alpha = 5\%$. Correlation tests were parametric (Pearson's test) with a 0.05 threshold.

3. Results

Fig. 1A and B shows minimal daily air temperatures for all treatments. Broad temperature differentials were recorded in the greenhouse treatments (average daily mean $\Delta T_{\text{cold-outdoor}} = 2.51^\circ\text{C}$ in NF; daily mean $\Delta T_{\text{warm-cold}} = 5.40^\circ\text{C}$ in NF and 7.40°C in EF).

Date of defoliation had a significant impact on water content (WC). In the early leaf fall (EF) experiment, just after defoliation, WC increased significantly in control and cold-deprived trees from 1.2 to 1.6 and 1.8, respectively. Later similar tendency was observed for both temperature treatments but with a stronger WC in cold deprived trees. On the contrary, in natural leaf fall (NF) experiment, only WC of cold-deprived trees increased during winter (1.35 \pm 0.2)

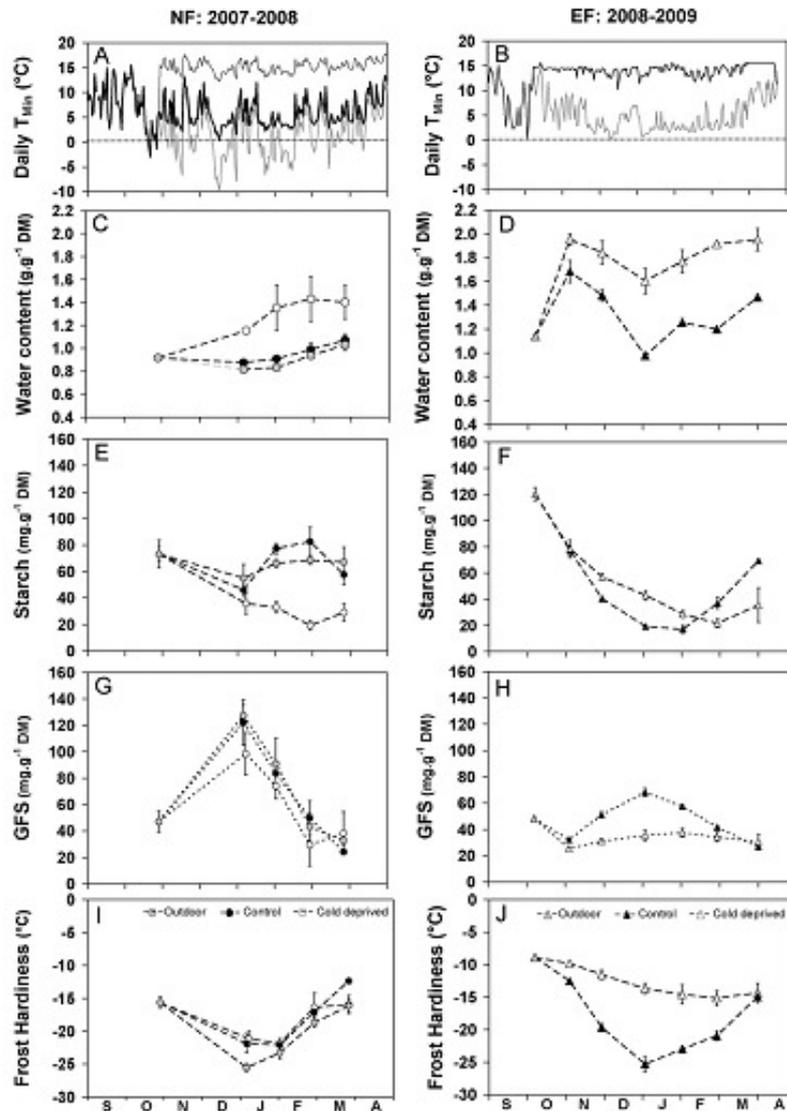


Fig. 1. Results in left panel for natural leaves fall (NF) experiments during 2007–2008 winter periods and in right panel for early leaves fall (EF) experiments during 2008–2009 winter periods. Time course of (A) and (B) minimum daily air temperature for control cold greenhouse (bold line), cold deprived greenhouse (fine line) and outdoor treatments (grey line). (C) and (D) water content in NF (circle) or EF (square) treatments for Control (black), Outdoor (grey) and cold deprived (white) treatments. (E) and (F) starch content. (G) and (H) soluble sugar content. (I) and (J) frost hardiness levels as determined by mean temperature causing 50% of increase in electrolyte leakage. For figures (C–J), mean \pm SE ($n = 5$) are given.

whereas no significant differences in WC appeared until March (WC around 1.0 ± 0.1) in control and outdoor trees (Fig. 1C).

Starch content pattern was not significantly different whatever the defoliation date. It decreased in all temperature treatments during autumn and remained stable in cold deprivation treatment (around $20 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$) while in control and outdoor trees a re-synthesis of starch before budburst was observed. For soluble sugar content (glucose+fructose+ sucrose: GFS), in the NF treatment (Fig. 1G), cold-deprived trees and control trees showed similar patterns throughout the winter period, with an increase in autumn until deep winter ($107 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ for cold-deprived trees and $134 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ for controls), decreasing thereafter.

Defoliation date obviously affected carbohydrate content in the EF treatment, GFS remained stable throughout the experiment and was significantly different of controls from December to February only (Fig. 1H). Even in control trees, carbohydrate content increased during winter but maximal level observed was significantly lower than in NF experiment.

Finally, for frost hardiness, in the NF experiment (Fig. 1I), all trees showed similar cold hardening (-21.8°C for cold-deprived trees and -22.1°C for controls, with $P=0.011$ at 02/04/2008). In outdoor trees, minimal values were significantly lower and occurred earlier (Frost hardiness: -25.55°C on 01/08/2008 at $P < 0.001$ for controls and $P=0.004$ for cold-deprived trees) but were non-significantly different at 02/04/2008. Thereafter, dehardening started in all temperature treatments, with no between-group differences. Conversely, under the EF treatments (Fig. 1J), there were strong differences between control and cold-deprived trees. Control trees followed a regular pattern, with no significant difference with NF treatments in terms of maximal hardiness in February ($P=0.69$) or dehardening in March. However, cold-deprived trees already demonstrated a significant decrease in cold hardening between October and December that was very different to controls, and frost hardiness remained stable until the end of the experiment.

Fig. 2 illustrates the relationships between frost hardiness and physiological parameters (water and soluble carbohydrate contents) or climatic parameter (minimal daily air temperature). Non-acclimated trees (frost hardiness higher than -20°C) contained low amounts of GFS (below $60 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$; Fig. 2A) and maximal frost resistance levels were observed for a clearly higher soluble carbohydrate content (around $100 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$). This relationship between cold acclimation and GFS content is non-linear, fitting a polynomial equation: frost hardiness = $-4.64 - 0.35 \cdot \text{GFS} + 1.6 \times 10^{-3} \cdot \text{GFS}^2$ ($r=0.81$), with weak changes in carbohydrate content for higher frost hardiness values and stronger changes when frost hardiness reached around -20°C .

Less acclimated trees were also significantly more hydrated, whereas more cold-acclimated ones had less than $1.0 \text{ g g}^{-1} \text{ DM}$ in water content (Fig. 2B). The relationship is not as strong as between frost hardiness and GFS content ($r=0.61$, $P < 0.001$). But less hydrated trees are obviously more frost-resistant.

In natural conditions (i.e. outdoor treatment), minimal air temperature seemed strongly correlated with frost hardiness level. However, a query arose regarding the best way to express minimal air temperature as an input factor to the frost resistance model. Given that the physiological processes directly altered such as carbohydrate metabolism, are unlikely to be instantaneous, the most relevant 'daily' temperature should not account for thermal profile on the individual day where frost hardiness was measured but should integrate temperatures over a several-day period. Consequently, we did a preliminary statistical analysis (data not shown) showing that frost hardiness was best correlated with the average minimal daily temperature over the 19 days before (and not including) the sampling day. Thus, Fig. 2C shows the relationship between frost hardiness and climate data. Frost hardiness and climate data were strongly correlated in the outdoor treatment

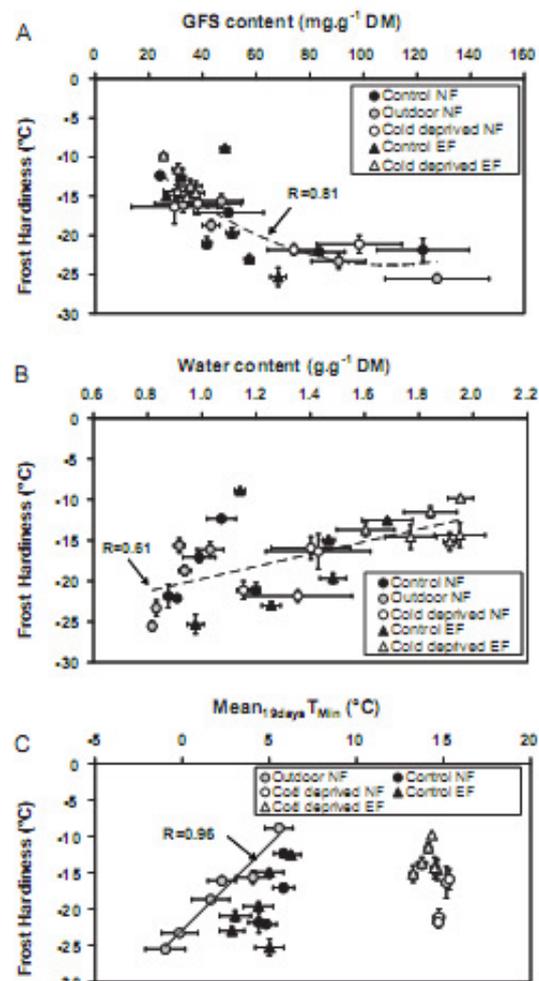


Fig. 2. Relationship between frost hardiness levels and (A) soluble sugar content (glucose+fructose+ sucrose: GFS), (B) water content, (C) the average of minimal daily temperatures of the last 19 days before (and not including) the sampling day for all thermal and leaves fall treatments (mean \pm SE; $n=5$). Linear regression for outdoor treatment is given.

($r=0.96$; $P=0.010$), but with warmer temperatures no relationship were observed.

Finally, Fig. 3 showed that the two physiological parameters GFS and WC were related. Thus, on five different treatment (defoliation timing \times temperature treatments), maximal GFS observed in trees during winter appeared strongly related to minimal WC observed with the same trees during winter ($R=-0.8481$).

4. Discussion

4.1. Effect of water content on cold hardiness

Our results show a significant correlation ($r=0.608$; $P < 0.001$) between WC and frost hardiness which is not specific to walnut (Chen et al., 1976; Chen and Gusta, 1978; Tanino et al., 1990; Ogren, 1999; Gusta et al., 2004). Indeed, when liquid water turns into ice, there is a volume increase of about 9% that requires enough room free of water in the tissue structure to accommodate the mechan-

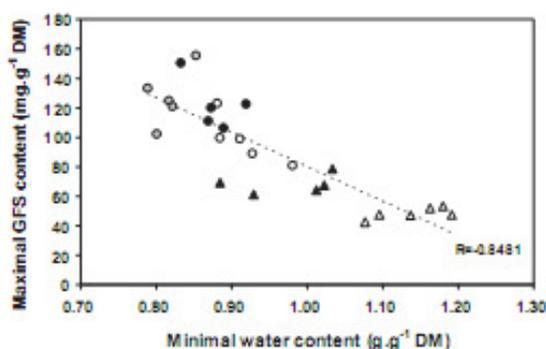


Fig. 3. Relationship between minimal water content and maximal soluble sugar content (glucose+fructose+sucrose: GFS) for all treatments (defoliation timing \times temperature treatments). Mean \pm SE ($n=5$) are given.

ical effects of this volume change. A decrease in water also means that cell sap concentration increases, lowering the freezing point of cytosol.

In natural conditions, after leaf fall, WC decreases: more water was evaporated by bark than was absorbed by roots. It has long been established (Kramer, 1940) that decreasing soil temperatures results in decreasing water absorption as cold temperature reduces root cell membrane permeability (Levitt, 1980). Thus, when temperatures drop in autumn, stem water content decreases allowing efficient frost hardening. Later in spring, as soil temperatures increase, water absorption picks up again resulting in plant rehydration (Ewers et al., 2001; Turcotte et al., 2009). Améglio et al. (2002) demonstrated that this rehydration in walnut trees occurred when soil temperature is above +8 °C at 50 cm belowground.

In cold-deprived conditions, soil temperature remained high enough to maintain root activity. If the soil is moist enough, water supply is maintained, and we could observe rehydrating of trees, as it is usually occurring in spring (Turcotte et al., 2009). This was particularly evident when trees were defoliated in early October (Fig. 1D), when soil temperatures were still high. At this date, removing the leaves led to a loss in the balance between absorption and evaporation. Transpiration was stopped while water uptake was still strong resulting in a sharp rising in water content. Thus, control trees experienced high hydration before "normal" dehydration. Furthermore, for cold-deprived trees (both EF and NF treatments), this water uptake explains why water content increased and remained exceptionally high all winter long, whereas under natural defoliation and "normal" autumn temperatures, soil temperature was already low and the trees did not have the possibility to recover water lost by transpiration.

4.2. Role of carbohydrates in cold hardiness

Cold hardiness was positively related to soluble sugar content (Figs. 1G and 2A) in all treatments, which is consistent with numerous studies (Siminovitch et al., 1953; Kramer and Kozlowski, 1979; Sauter and Ambrosius, 1986; Sauter and Van Cleve, 1994; Améglio et al., 2004; Thomas et al., 2004; Morin et al., 2007). In this study, GFS were pooled and represented more than 90% of total soluble sugars in walnut trees during winter. Literature reports state that the development of freezing tolerance is invariably accompanied by the conversion of starch to sucrose (Parker, 1962; Sakai and Yoshida, 1968; Essiamah and Eschrich, 1985; Ögren et al., 1997; Pearce, 2001; Klotke et al., 2004). A higher soluble sugar content lowers the freezing point of the intracellular solution, but the measured differences in concentration between hardened and de-hardened tissues can only explain 1 or 2 °C of the difference in

frost resistance (Hansen and Beck, 1988): 1.86 °C per mole of solute dissolved per kg of water (Dereuddre and Gazeau, 1992; Cavender-Bares, 2005). Thus, soluble sugars may also play an indirect role in cold hardiness development. Frost triggers ice nucleation within the extracellular space (Levitt, 1980), which has a lower solute concentration and therefore a slightly higher freezing point than intracellular vacuolar and cytoplasmic water (where soluble sugar content has increased). At the same temperature, the ice will have a lower chemical potential than the super cooled water in the cell (Mazur, 1963; Rajashekar et al., 1982, 1983). This extracellular ice formation prevents concurrent intracellular ice (Burke et al., 1976). This is why water diffuses from the cells to the ice-growing zone, resulting in cell dehydration (Loris et al., 1999; Zweifel and Hasler, 2000; Améglio et al., 2001), which is the primary cause of freezing injury in woody plants. However, it is now understood that sugars not only have a freezing-point depression effect but also depress the effects associated with dehydration (osmotic effect and a volumetric effect: Wolfe and Bryant, 1999, 2001; Bryant et al., 2001; Lenne et al., 2007, 2009). Moreover, sucrose has the ability to stabilize biological membranes via direct interaction with lipids during dehydration when most of the free water is outside the cell (glassy state: Crowe, 2002). Thus, the in-tree amount of carbohydrate reserves appears to be one crucial parameter in cold acclimation and summer stresses which could hugely impact amount of reserves could have a non-negligible effect on sensitivity to frost damages. A severe defoliation during summer not only reduces the photosynthetic activity of leaves and total carbohydrate reserves but also limits cold hardiness during winter (Poirier et al., 2010; Poirier, 2008; Poirier and Améglio, 2006).

In addition, as shown in Sakai (1966), low temperature (<5 °C) or warm temperature (>15 °C) can generate starch hydrolysis, as was observed in our study. This was explained as an increasing of the catalytic activity of amylase at warm temperature or through the precipitation of endoamylase on starch granules with low catalytic activity but a doser relationship between enzymes and substrates at low temperatures (Ehle and Sauter, 2000). Finally, according to soluble sugar content, whatever the temperature is below +5 °C or above +15 °C, cold hardiness seems possible.

4.3. Impact of climate on cold hardiness

Low temperatures are more often recognized as a key constraint in tree distribution (Shreve, 1914; Sakai and Weisner, 1973; George et al., 1974), especially at the higher latitudinal limit of a species (Gusta et al., 1983; Arris and Eagleson, 1989) or at treeline limit (Cavieres et al., 2000), and there are numerous reports of the effect of low temperatures on frost hardening (Mac Irving and Lanphear, 1967; Howell and Weiser, 1970; Levitt, 1980; Sakai and Larcher, 1987). In our study, cold acclimation is observed for trees submitted to low temperatures, but also cold-deprived trees and air temperature appeared not directly related to hardiness (cf. Fig. 2).

Schwarz (1970) in *Pinus oembra* or Taulavuori et al. (2000) in *P. sylvestris* showed also more complex relationship between cold hardiness and temperature. Thus, in this last species, reducing the day length appeared sufficient to obtain significant hardiness in warm temperature (+20 °C). Moreover, some authors considered photoperiod as the key driver to cold acclimation.

In our study, a lower photoperiod for EF treatment (i.e. 10h00mn vs. 11h09mn for NF treatment) had a strong effect on maximal frost hardiness for cold-deprived treatment (Fig. 1I and J) whereas no significant difference was observed for control and outdoor temperature treatments. Welling et al. (1997) showed in *Betula pubescens*, that cold acclimation was initiated with a 3 weeks exposure to a photoperiod less than 12h which was the case in our experiment as well for NF than for EF conditions. Differences observed in cold acclimation pattern between treatments were

probably triggered through physiological impact and not only on the inability of the EF trees to capture without leaves the short day signal perception (SDSP).

4.4. Interaction between timing of defoliation, temperature and physiological parameters

For WC, in the EF treatment, warm temperatures inhibited dehydration, while in the NF treatment, dehydration had already occurred. This difference could explain why in one case, at warmer temperatures, GFS content increased in one treatment (NF) but not in the other (EF). A previous study in poplar trees (Ruttink et al., 2007) reported that similar dehydration induced dormancy mediated by ABA content in buds. Li et al. (2003), studying birch, reported that ABA content increased in autumn simultaneously with cold acclimation and dormancy release. Thus, ABA content is often associated with abiotic stress (Popko et al., 2010). Applying exogenous ABA has an effect on cold tolerance in wheat (Veisz et al., 1996) and cultured cells (Galiba et al., 1993) via carbohydrate metabolism (Kerepesi et al., 2004). Also, ABA has an impact on cold signal transduction (Tahtiharju and Palva, 2001). Hence, in the EF treatment, it is possible that the higher WC altered carbohydrate metabolism due to low ABA levels. Furthermore, previous literature on the role of ABA suggests an interaction between WC and GFS content, as shown in Fig. 3.

In the EF treatment, in cold-deprived trees, starch content decreased at a similar rate of controls but without a significant increase in GFS content, whereas in NF treatments, GFS dynamics were similar in cold-deprived and control trees, with starch hydrolysis occurring at two temperature levels (below +5°C or above +13°C). Thereafter, soluble sugars were resynthesized into starch in controls but not cold-deprived trees. As a consequence, dehydration signal transduction via ABA modulation is probably not initiated in EF treatments. This could explain why soluble carbohydrate did not increase while trees stayed fully hydrated, whereas the decrease in starch content could be explained by high respiration levels.

To conclude, the timing of leaf fall could have a huge impact on the cold acclimation of trees depending on tree history and through their effect on water balance and soluble sugar content, and on the interaction of these two parameters. In the event of natural leaf fall, when dehydration has started, temperatures below +5°C or above +15°C enable cold hardening via starch hydrolysis and soluble sugar synthesis. However, if temperatures at leaf fall stay warm (e.g. early defoliation due to hard summer drought or phytophagous attack), trees stay highly hydrated if water is available in soil, and consequently disturbances in carbohydrate metabolism could lead to high frost sensitivity at the first winter freezing event. In all cases, the level of these two parameters (WC and GFS) appeared related with cold hardiness in walnut.

Acknowledgments

This work was supported in part by INRA–department of Agronomy and Environment and by a MRES PhD grant to G. Charrier. We are grateful to Christian Bodet and Christophe Sèrre for frost hardiness measurement contributions and Brigitte Girard, Brigitte Saint-Joanis and Marc Vandame for biochemical analysis contributions. We would like to thank Dr. Kari Taulavuori, editor-in-chief and the two anonymous reviewers for the long comments on the first draft that greatly improved this manuscript and Dr. D.G. Biron for the improvement of the English throughout the paper.

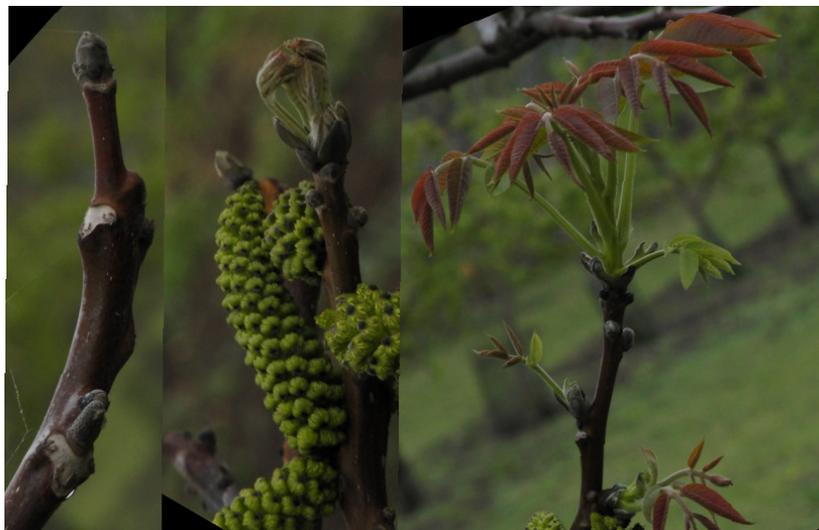
References

- Améglio, T., Bodet, C., Lacombe, A., Cochard, H., 2002. Winter embolism, mechanisms of xylem hydraulic conductivity recovery and springtime growth patterns in walnut and peach trees. *Tree Physiology* 22, 1211–1220.
- Améglio, T., Cochard, H., Bwers, F.W., 2001. Stem diameter variations and cold hardiness in walnut trees. *Journal of Experimental Botany* 52, 2135–2142.
- Améglio, T., Decourteix, M., Alves, G., Valentin, V., Sakr, S., Julien, J.L., Petel, G., Guillion, A., Lacombe, A., 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees: evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology* 24, 785–793.
- Aronsson, A., 1975. Influence of photo- and thermoperiod on the initial stages of frost hardening and dehardening of phytotron-grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Studia for. Suecica*, 20 pp.
- Arts, L.L., Eagleson, P.S., 1989. Evidence of a physiological-basis for the boreal-deciduous forest ecotone in North-America. *Vegetatio* 82, 55–58.
- Bryant, G., Koster, K.L., Wolfe, J., 2001. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Science Research* 11, 17–25.
- Burke, M.J., Gusta, L.V., Quamme, H.A., Weiser, C.J., Li, P.H., 1976. Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 27, 507–528.
- Gavender-Bares, J., 2005. Impacts of freezing on long-distance transport in woody plants. In: Holbrook, N.M., Zwieniecki, M., Melcher, P. (Eds.), *Vascular Transport in Plants*. Elsevier, Oxford, pp. 401–424.
- Gavleres, L.A., Rada, F., Azocar, A., Garcia-Nufiez, C., Cabrera, H.M., 2000. Gas exchange and low temperature resistance in two tropical high mountain tree species from the Venezuelan Andes. *Acta Oecologica* 21, 203–211.
- Chen, P.M., Gusta, L.V., 1978. Role of water in cold hardiness of winter cereals. In: Li, P.H., Sakai, A. (Eds.), *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*. Academic Press, New York, pp. 165–174.
- Chen, P.M., Burke, M.J., Li, P.H., 1976. The frost hardiness of several *Solanum* species in relation to the freezing of water, melting point depression, and tissue water content. *Botanical Gazette* 137, 313–317.
- Christersson, L., 1978. The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 44, 288–294.
- Crowe, L.M., 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A—Molecular and Integrative Physiology*, 131, pp. 505–513.
- Dereuddre, J., Gazeau, C., 1992. Les végétaux et les très basses températures. In: Hermann, C.D. (Ed.), *Les végétaux et le froid*. Paris, pp. 107–175.
- Ell, D., Sauter, J.J., 2000. Seasonal changes of activity of a starch granule bound endomylase and of a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench robusta) and their possible regulation by temperature and phytohormones. *Journal of Plant Physiology* 156, 731–740.
- Eslamali, S., Eschrich, W., 1985. Changes of starch content in the storage tissues of deciduous trees during winter and spring. *IAWA Bulletin*, 97–106.
- Bwers, F.W., Améglio, T., Cochard, H., Beaujard, F., Martignac, M., Vandame, M., Bodet, C., Cruziat, P., 2001. Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree Physiology* 21, 1123–1132.
- Galiba, G., Tuberosa, R., Kocsy, G., Sutka, J., 1993. Involvement of chromosome-5a and chromosome-5d in cold-induced abscisic-acid accumulation in and frost tolerance of wheat calli. *Plant Breeding* 110, 237–242.
- George, M.F., Burke, M.J., Pellet, H.M., Johnson, A.G., 1974. Low temperature exotherms and woody plant distribution. *Hortscience* 9, 519–522.
- Gusta, L.V., Tyler, N.J., Chen, T.H.H., 1983. Deep undercooling in woody taxa growing North of the –40°C isotherm. *Plant Physiology* 72, 122–128.
- Gusta, L.V., Wisniewski, M., Nesbitt, N.T., Gusta, M.L., 2004. The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and nonacclimated canola leaves. *Plant Physiology* 135, 1642–1653.
- Hansen, J., Beck, E., 1988. Evidence for ideal and non-ideal equilibrium freezing of leaf water in frost-hardy ivy (*Hedera-helix*) and winter barley (*Hordeum-vulgare*). *Botanica Acta* 101, 76–82.
- Howell, G.S., Weiser, C.J., 1970. The environmental control of cold acclimation in apple. *Plant Physiology* 45, 390–394.
- Kerepesi, I., Banyal-Stefanovits, E., Galiba, G., 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Journal of Plant Physiology* 161, 131–133.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N., Heyer, A.G., 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 27, 1395–1404.
- Kramer, P.J., 1940. Root resistance as a cause of decreased water absorption by plants at low temperatures. *Plant Physiology* 15, 63–79.
- Kramer, P.J., Kozlowski, T.T., 1979. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, New York, p. 811.
- Leinonen, I., 1996. A simulation model for the annual frost hardiness and freezing damage of Scots pine. *Annals of Botany* 78, 687–693.
- Lenne, T., Bryant, G., Holcomb, R., Koster, K.L., 2007. How much solute is needed to inhibit the fluid to gel membrane phase transition at low hydration? *Biochimica Et Biophysica Acta—Biomembranes* 1768, 1019–1022.
- Lenne, T., Carvey, C.J., Koster, K.L., Bryant, G., 2009. Effects of sugars on lipid bilayers during dehydration – SAXS/WAXS measurements and quantitative model. *Journal of Physical Chemistry B* 113, 2486–2491.

- Levitt, J., 1980. 3. Chilling injury and resistance. In: Responses of Plants to Environmental Stresses, vol. 1: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Academic Press, New York, pp. 23–64.
- Li, C.Y., Vihes-Aarnio, A., Puhakainen, T., Junttila, O., Helino, P., Palva, E.T., 2003. Ecotype-dependent control of growth, dormancy and freezing tolerance under seasonal changes in *Betula pendula* Roth. Trees—Structure and Function 17, 127–132.
- Lindén, L., 2002. Measuring cold hardiness in woody plants. University of Helsinki, Department of Applied Biology, Publication no. 10. Helsinki 57 p+appendices.
- Lindén, L., Rita, H., Suojala, T., 1996. Logit models for estimating lethal temperatures in apple. HortScience 31, 91–93.
- Loris, K., Havranek, W.M., Wieser, G., 1999. The ecological significance of thickness changes in stem, branches and twigs of *Pinus cembra* L. during winter. Phytion-Annales Rei Botanicae 39, 117–122.
- Mac Irving, R., Lanphear, F.O., 1967. The long day leaf as a source of cold hardiness in hibiscus. Plant Physiology 42, 1384–1388.
- Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. Journal of General Physiology 47, 347–369.
- Morin, X., Améglio, T., Ahas, R., Kurz-Besson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F., Chaline, J., 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. Tree Physiology 27, 817–825.
- Ogren, E., 1999. Fall frost resistance in willows used for biomass production II. Predictive relationships with sugar concentration and dry matter content. Tree Physiology 19, 755–760.
- Ogren, E., Nilsson, T., Sundblad, L.G., 1997. Relations hips between respiratory depletion of sugars and loss of cold hardiness in coniferous seedlings over-wintering at raised temperatures: Indications of different sensitivities of spruce and pine. Plant, Cell and Environment 20, 247–253.
- Olsen, J.E., Junttila, O., Nilsen, J., Eriksson, M.E., Martinussen, I., Olsson, O., Sandberg, G., Moritz, T., 1997. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. Plant Journal 12, 1339–1350.
- Parker, J., 1962. Relationships among cold hardiness, water-soluble protein, anthocyanins, and free sugars in *Hedera helix* L. Plant Physiology 37, 809–813.
- Pearce, R.S., 2001. Plant freezing and damage. Annals of Botany 87, 417–424.
- Poinier, M., Améglio, T., 2006. Impact of summer conditions of growth (drought, defoliation) on freezing tolerance of trees. Cryobiology 53, 425.
- Poinier, M., 2008. Etude écophysologique de l'endurissement au gel des arbres: Impact des conditions estivales de croissance sur la résistance au gel des arbres. Ph.D. Thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 314 pp.
- Poinier, M., Lacombe, A., Améglio, T., 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. Tree Physiology 30 (12), 1555–1569.
- Popko, J., Hansch, R., Mendel, R.R., Polle, A., Teichmann, T., 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. Plant Biology 12, 242–258.
- Puhakainen, T., Li, C.Y., Bojje-Malm, M., Kangasjärvi, J., Helino, P., Palva, E.T., 2004. Short-day potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch. Plant Physiology 136, 4299–4307.
- Rajashakar, C., Westwood, M.N., Burke, M.J., 1982. Deep supercooling and cold hardiness in *genus populus*. Journal of the American Society for Horticultural Science 107, 968–972.
- Rajashakar, C.B., Li, P.H., Carter, J.V., 1983. Frost injury and heterogeneous ice nucleation in leaves of tuber-bearing solanum species – Ice nucleation activity of external source of nucleants. Plant Physiology 71, 749–755.
- Repo, T., Lappi, J., 1989. Estimation of standard error of impedance-estimated frost resistance. Scandinavian Journal of Forest Research 4, 67–74.
- Repo, T., Nakela, A., Hanninen, H., 1990. Modeling frost resistance of trees. Silva Carelica 15, 61–74.
- Ruttink, T., Arend, M., Morree, K., Storme, V., Bombauts, S., Fromm, J., Bhalerao, R.P., Boerjan, W., Rohde, A., 2007. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. Plant Cell 19, 2370–2390.
- Sakai, A., 1966. Studies of frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. Plant Physiology 41, 353–359.
- Sakai, A., Yoshida, S., 1968. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology 5, 160–174.
- Sakai, A., Weisner, C.J., 1973. Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions. Ecology 54, 118–126.
- Sakai, A., Larcher, W., 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. Ecological Studies, 321. Springer-Verlag, Berlin.
- Sauter, J.J., 1988. Temperature induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis* "robusta". Journal of Plant Physiology 132, 608–612.
- Sauter, J.J., Ambrosius, T., 1986. Changes in the partitioning of carbohydrates in the wood during bud break in *Betula pendula* Roth. Journal of Plant Physiology 124, 31–43.
- Sauter, J.J., Van Cleve, B., 1994. Storage, mobilization and interrelations of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. Trees 297–304.
- Schwarz, W.V., 1970. Der einfluss der photoperiode auf das austreiben, die frosthärte und die hitzeresistenz von zirben und alpenrosen. Flora 159, 258–285.
- Shreve, F., 1914. The role of winter temperatures in determining the distribution of plants. American Journal of Botany 1, 194–202.
- Simionovitch, D., Wilson, C.M., Briggs, D.R., 1953. Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness vs. seasonal transformations and variations in the carbohydrates: starch-sucrose interconversions. Plant Physiology 28, 383–400.
- Sparks, J.P., Campbell, G.S., Black, R.A., 2001. Water content, hydraulic conductivity, and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: a TDR case study. Oecologia 127, 468–475.
- Sutinen, M.L., Raita, J.P., Reich, P.B., 1992. Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa*: evaluation of the electrolyte leakage method. Tree Physiology 11, 241–254.
- Tahtiharju, S., Palva, T., 2001. Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 26, 461–470.
- Tanino, K., Weiser, C.J., Fuchigami, L.H., Chen, T.H.H., 1990. Water-content during abscisic-acid induced freezing tolerance in biomegrass cells. Plant Physiology 93, 460–464.
- Taulavuori, K., Taulavuori, E., Sarjala, T., Savonen, E.M., Pietiläinen, P., Lahdesmäki, P., Laine, K., 2000. In vivo chlorophyll fluorescence is not always a good indicator of cold hardiness. Journal of Plant Physiology 157, 227–229.
- Thomas, E.M., Blank, R., 1996. The effect of excess nitrogen and of insect defoliation on the frost hardiness of bark tissue of adult oaks. Annales Des Sciences Forestières 53, 395–406.
- Thomas, E.M., Meyer, G., Popp, M., 2004. Effects of defoliation on the frost hardiness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Annals of Forest Science 61, 455–463.
- Turcotte, A., Morin, H., Krause, C., Deslauriers, A., Thibeault-Martel, M., 2009. The timing of spring rehydration and its relation with the onset of bud formation in black spruce. Agricultural and Forest Meteorology 149, 1403–1409.
- Veliz, O., Galiba, G., Surka, J., 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. Journal of Plant Physiology 149, 439–443.
- Welling, A., Nikkuranta, P., Rinne, P., 1997. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens* involvement of ABA and dehydrins. Physiologia Plantarum 100, 119–125.
- Welling, A., Palva, E.T., 2006. Molecular control of cold acclimation in trees. Physiologia Plantarum 127, 167–181.
- Witt, W., Sauter, J.J., 1994. Enzymes of starch metabolism in poplar wood during fall and winter. Journal of Plant Physiology 143, 625–631.
- Wolfe, J., Bryant, G., 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology 39, 103–129.
- Wolfe, J., Bryant, G., 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. International Journal of Refrigeration-Revue Internationale Du Froid 24, 438–450.
- Zhang, M.L.N., Willison, J.H.M., 1987. An improved conductivity method for the measurement of frost hardiness. Canadian Journal of Botany 65, 710–715.
- Zweifel, R., Hasler, R., 2000. Frost-induced reversible shrinkage of bark of mature subalpine conifers. Agricultural and Forest Meteorology 102, 213–222.

Annexe 5 : La sortie de dormance et l'acclimatation au gel chez le noyer sont-elles sous contrôle environnemental et/ou génotypique ?

Article publié dans International Journal of Biometeorology pour la Special Issue du congrès Phenology 2010 à Dublin (14-16 Juin 2010)



Les bourgeons terminaux se développent toujours aux dépens des autres, jusqu'à les atrophier complètement. (André Gide).

Are budburst dates, dormancy and cold acclimation in walnut trees (*Juglans regia* L.) under mainly genotypic or environmental control?

Guillaume Charrier · Marc Bonhomme ·
André Lacoïnte · Thierry Améglio

Received: 15 November 2010 / Revised: 13 June 2011 / Accepted: 22 June 2011
© ISB 2011

Abstract As observed for most stresses, tree frost resistance can be split into two main processes: avoidance and tolerance. Avoidance of freezing is achieved by introducing species only in the climatic context in which the probability of freezing events is very low for the sensitive stages of buds or stems; i.e., when good synchronism exists between the annual cycle and the critical climatic periods. Buds become able to grow only after chilling requirements have been satisfied (endodormancy released) during winter; they subsequently break after heat requirements have been completed (end of ecodormancy) in early spring. Actually, this period is often subject to more or less severe freezing events. Trees are also able to adjust their freezing tolerance by increasing their capacity of extracellular freezing and decreasing the possibility of intracellular freezing through the process of frost acclimation. Both freezing resistance processes (avoidance and tolerance) are environmentally driven (by photoperiod and temperature), but there are also genotypic effects among species or cultivars. Here, we evaluated the degree to which differences in dormancy release and frost acclimation were related to environmental and genetic influences by comparing trees growing in common garden conditions. This investigation was carried out for two winters in lowland and

mountain locations on different walnut genotypes differing significantly for budburst dates. Chilling requirement for endodormancy release and heat requirement during ecodormancy were evaluated in all situations. In addition, frost acclimation was assessed by the electrolyte leakage method on stems from the same trees before leaf fall through budburst. No significant differences were observed in chilling requirements among genotypes. Moreover, frost acclimation dynamics were similar between genotypes or locations when expressed depending on chilling units accumulated since 15 September as a time basis instead of Julian day. The only exception was for maximal frost hardiness observed during winter with the timber-oriented being significantly more resistant than fruit-oriented genotypes. Heat requirement was significantly different among genotypes. Thus, growth was significantly faster in fruit-oriented than in wood-oriented genotypes. Furthermore, among wood-oriented genotypes, differences in growth rate were observed only at cold temperatures. Frost acclimation changes differed significantly between fruit- and wood- walnuts from January through budburst. In conclusion, from September through January, the acclimation dynamic was driven mainly by environmental factors whereas from January through budburst a significant genotype effect was identified in both frost tolerance and avoidance processes.

G. Charrier · M. Bonhomme · A. Lacoïnte · T. Améglio (✉)
INRA,
UMRA547 PIAF,
F-63100 Clermont-Ferrand, France
e-mail: Thierry.Ameglio@clermont.inra.fr

G. Charrier · M. Bonhomme · A. Lacoïnte · T. Améglio
Clermont Université, Université Blaise Pascal,
UMRA547 PIAF,
F-63000 Clermont-Ferrand, France

Keywords Phenology · Frost hardiness · Endodormancy · Ecodormancy · Winter biology · *Juglans regia* L.

Abbreviations

CU Chilling units
LT₅₀ Lethal temperature for 50% of cells
MTB Mean time until bud break

nigra cv NG38 from the same breeding were split into early hybrids (E-Hybrid; $n=5$) and late hybrids (L-Hybrid; $n=5$) and also sampled. In the mountain orchard, only Franquette ($n=5$), Lara ($n=5$), early hybrids ($n=5$) and late hybrids ($n=5$) could be sampled because low temperatures did not allow Serr and Chandler survival.

Phenological data

Phenological data were measured in the spring of 2008 and 2009 on individual trees. For each tree, the average proportion of apical and lateral buds that were broken was estimated every 2 days. Day of budburst was estimated for each tree as the day when 50% of lateral buds reached the threshold of unfolding new leaves (stage 15 of BBCH scale; Meier, 2001, last picture on Fig. 1).

Temperature requirements

Chilling and heat requirements were evaluated in climatic chambers on single-bud cuttings. On each tree, stems were sampled on 29 November when endodormancy was usually close to its maximal value [as determined on walnuts (Mauget and Germain 1980; M. B., unpublished results), and cut in 7-cm-long pieces with only one bud left on each piece of stem. Then, for non apical buds, the top of the stem segments were covered with wax and the bottom was dipped in water. For chilling requirement assessments, buds were placed at 4°C with light for 8 h/day for a between 0 and 1600 hours. After chilling exposure, buds were placed in climatic chambers with long-day treatment (16 h) and warm temperature (25°C). Every 2 days, each bud was observed for bud bursting status: bud closed, becoming green, or leaf unfolding. For each chilling exposure duration, the mean individual time spent at 25°C was calculated and referred to as mean time until budburst (MTB). Endodormancy was considered released and chilling exposure satisfied when no further significant decrease in MTB was observed with increased chilling exposure.



Fig. 1 Different phenological stages of buds in walnut trees (*Juglans regia* L.) from winter dormancy until budburst (from Germain et al. 1999)

Bud growth during ecodormancy

Bud growth rates were evaluated after endodormancy was broken under natural conditions (29 January). Single-bud cuttings (see above) were placed under long-day conditions at different temperatures (5, 10, 15, 20 and 25°C) and checked for burst every 2 days. MTB was calculated for each genotype and temperature.

Chilling model

Since the last century, studies on chilling requirements have generated lots of different models for chilling accumulation. In order to compare between both locations, thermal models were selected from the literature (Bidabe 1967; Fishman et al. 1987a, 1987b for the Dynamic model; Hanninen 1990; Landsberg 1974; Richardson et al. 1974 for the Utah model; Sarvas 1974; Weinberger 1950). For details on chilling effect calculations, refer to the original papers. Sums of chilling units were computed on an hourly basis starting on 15 September during the frost acclimation stage.

Forcing Models

During the ecodormancy stage, warm temperatures were used to compare between locations and genotypes. A preliminary statistical analysis was performed using different usual models (counts of hours above a given threshold; growth-compatible degree days, parameterized with different thresholds; Pouget 1964; Bidabe 1967; Landsberg 1974; Sarvas 1974; Anderson et al. 1986; Hanninen 1990).

Frost hardiness tests

Different segments from 1-year-old twigs were used at each sampling date to assess frost hardiness by the electrolyte leakage method (Zhang and Willison 1987; Sutinen et al. 1992). In 2007–2008, stems were sampled every month from 5 December through budburst in lowland location. On 2008–2009, sampling started 15 September through budburst on mountain and lowland locations. From February through budburst, sample dates were closer (between 15 and 20 days). Each 1-year-old twig was cut into six 5-cm long segments without buds per date. All segments were washed quickly in distilled-deionised water, wrapped in a moistened tissue that was then wrapped in aluminum foil. Shoot segments were cooled down to one of four sub-zero temperatures. For temperature-controlled boxes, cooling and warming cycles were computer-controlled by a circulator bath (Ministat Huber, Offenburg, Germany) with external

Pt100 into the chamber. A steady rate of cooling and thawing of 5°C h^{-1} and with freeze-thaw cycle between $+5^{\circ}\text{C}$ to -5°C , -10°C ; -20°C and -30°C , respectively, was applied. Before thawing, the air temperature was maintained for 1 h at the freeze temperature. Temperatures were recorded with a data logger (Campbell, Logan, UT) as 1-min averages. In addition, there was an unfrozen control in a cold room at $+5^{\circ}\text{C}$ (control) and a lethal control in a deep freezer at -80°C . In this case, sample temperatures were monitored using copper-constantan thermocouples inserted into the foil pouch, and the rate of cooling was $\approx -7^{\circ}\text{C h}^{-1}$ in pre-chilled vacuum flasks.

After this freezing treatment, the segments were cut into 5 mm-long sections and placed in glass vials with 15 ml distilled-deionized water. The vials were shaken for 24 h at $+5^{\circ}\text{C}$ (to limit non-frost-induced lysis) on a horizontal gravity shaker (ST5, CAT, Germany). The electrolytic conductivity of the bathing solution (C_1) was measured at room temperature with a conductimeter (Held Meter LF340, TetraCon[®] 325, Germany).

Samples were then autoclaved at $+120^{\circ}\text{C}$ for 30 min, cooled down to room temperature, and a second conductivity measurement (C_2) was taken. Relative electrolytic leakage (REL) was calculated as $(C_1/C_2) \times 100$ as described in Zhang and Willison (1987). We assumed the following relationship between REL and percentage of cellular lyses (L) for each sample:

$$REL = A / (1 + e^{B(C-x)}) + D \quad (1)$$

where x is the test temperature. The parameters A and D define the asymptotes of the function, and B is the slope at the inflection point C . The frost hardness level (LT_{50}) was estimated as the temperature abscises of the inflection point (C) of the adjusted logistic sigmoid function in Eq. 1 (Repo and Lappi 1989). Parameter estimation was performed by nonlinear regression using ExcelStat ver. 7.5.2. Mean LT_{50} was calculated for each treatment from the individual LT_{50} values.

Statistical analysis

Mean comparison was performed by variance analysis (ANOVA) with subsequent post-hoc multiple comparison test of Tukey-HSD (honestly significant difference) at the significance threshold of $P=0.05$ using ExcelStat ver. 7.5.2. The respective significance of environmental vs genotypic effects was evaluated by covariance analyses (ANCOVA). The quantitative co-variable was Julian day or chilling units, and qualitative factors were genotype or location. In the results, the proportion of total variance explained by each factor was calculated from sums of squares.

Results

Phenology and thermal requirements of buds

Phenological difference between genotypes

As shown in Table 1, differences in date of budburst reached up to 50 days, among genotypes for Lowland in 2009: from April through June. For each genotype, the different replicates are bud bursting within a few days in the same location: from a 3–4 day spread for wood walnuts to less than 2 or even 1 day for fruit walnuts. We observed significant differences between apical and lateral buds (between 4 and 8 days delay; $P=0.007$) observed in both years.

In the mountain location, Serr and Chandler were not able to survive winter conditions. All other genotypes showed delayed budburst in comparison with Lowland (around 20 days) except L-Hybrid which showed a similar day of budbreak in both climatic conditions.

Day of budburst was similar for most genotypes in both years. Earliest genotypes, however, exhibited a difference between the two years, especially Serr in which buds burst 2 weeks later in 2008 than in 2009. A severe freezing event that occurred just before budburst may explain this between-year difference. Also, after this late frost in 2008, Chandler, Lara and Serr were not significantly different ($P>0.791$) whereas in the freeze safe year (2009), differences were significant between Lara and Serr ($P=0.036$).

Temperature requirements

Chilling requirements were measured as the chill exposure duration after which no significant difference was observed in the time spent at 25°C until budbreak. Between genotypes, no differences in chilling requirement, calculated as a count of hours cooler than 7.2°C (Weinberger 1950), were observed (less than 36 h: Table 1); between 900 and 950 hours of chilling are required for endodormancy release. Similar results are observed using other models.

Nevertheless, after the chilling requirement was satisfied, the MTB at 25°C was clearly different between genotypes (Table 1); earlier genotypes required only 470 h whereas later ones required 728 h. This suggests that most of the difference in the observed day of budburst was generated during the ecodormancy stage. The temperature response on those genotypes was monitored during this stage at between 5 and 25°C (Fig. 2).

The relationship between temperature and delay to bud break is non linear, with a clearly higher efficiency of

Annexe 5 : La sortie de dormance et l'acclimatation au gel chez le noyer sont-elles sous contrôle environnemental et/ou génotypique ?

Int J Biometeorol

Table 1 Day of budbreak in walnut tree (*Juglans* sp.) genotypes in two locations in central France for lateral buds, in Julian day±standard deviation; different lower case letters indicate significant groups ($\alpha=0.05$) within year/location by Tukey test. MTB Mean time until budbreak

Genotype	Day of Budbreak (average± Standard Deviation)			Chilling hours until endodormancy release	MTB after chilling requirements satisfied (hours at 25°C)
	Lowland		Mountain		
	2008	2009	2009		
Serr	117±1.43 c	102±0.58 d		924	470 c
Chandler	115±0.70 c	111±0.39 cd		924	477 c
Lara	116±0.16 c	117±1.72 bc	139±3.97 b	905	559 c
Franquette	126±1.40 b	125±1.31 b	142±0.44 b	905	543 c
E-Hybrid	129±2.41 b	128±4.36 b	141±2.26 b	941	662 b
L-Hybrid	163±4.54 a	155±3.80 a	154±3.64 a	940	791 a

warmer temperature. These results fitted a power function ($\text{Rate}=a.0^b$), with R^2 ranging from 0.903 (Chandler) to 0.982 (L-Hybrid) (Table 2).

Depending on genotype, the relationship between temperature and growth rate of buds is not as obvious as suggested by the observed phenological differences. Highly significant differences are observed between wood-oriented and fruit-oriented genotypes, with higher growth rates in fruit-oriented genotypes at warm temperatures (15°C and more). Within fruit-oriented genotypes, no significant differences were observed at all temperatures tested (except Lara vs Serr, at most temperatures). On the other hand, wood walnuts appeared to grow at a similar rate at warm temperatures and differences between them occurred only at cold temperature (5 and 10°C).

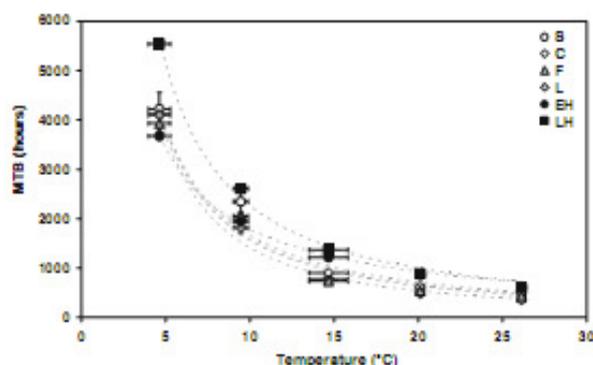


Fig. 2 Mean time until budbreak (MTB) after endodormancy release in six different walnut tree genotypes depending on temperature. Dashed lines Fitted power function: Late-Hybrid (LH): $R^2=0.982$; E-Hybrid (EH): $R^2=0.928$; Chandler (C): $R^2=0.903$; Franquette (F): $R^2=0.914$; Lara (L): $R^2=0.940$; Serr (S): $R^2=0.916$. Error bars Standard error

Cold acclimation/deacclimation

From autumn to full acclimation Frost acclimation changes were evaluated in parallel on twigs from the same trees. Throughout the acclimation process (between September and January), no significant difference was observed between either Lara and Franquette ($P=0.994$) or E-Hybrid and L-Hybrid ($P=0.512$) (Fig. 3a), so Lara and Franquette, and E-Hybrid and L-Hybrid, were bulked as fruit-oriented and wood-oriented genotypes, respectively, in all subsequent statistical analysis. Fruit- and wood- walnuts were significantly different ($P<0.0001$).

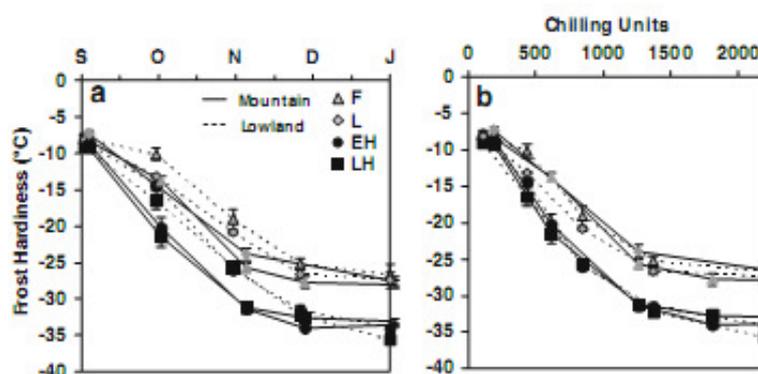
The level of frost hardiness between genotypes and locations prior to acclimation (15 September) was not significantly different ($P=0.144$). During hardening, large differences were observed ($P<0.0001$), explained by both genotype (55.2% of variance) and location (34.8%). Moreover, at maximum hardiness level (beginning of January), differences were still observed between wood and fruit walnuts (-35°C vs -28°C) but much less between locations ($LT_{50}=-34.9^\circ\text{C}$ in lowland and -34.3°C in

Table 2 Relation between temperature (θ) and MTB after endodormancy release in six different walnut tree genotypes (two wood walnuts *J. regia* x *nigra* (E-Hybrid: Early Hybrid and L-Hybrid: Late Hybrid) and four fruit walnuts *J. regia* (Chandler; Franquette; Lara and Serr))

Genotypes	Relation	R^2	
Wood walnuts	L-Hybrid	$34,263.\theta^{-4.180}$	0.982
	E-Hybrid	$15,622.\theta^{-0.941}$	0.928
Fruit walnuts	Chandler	$29,248.\theta^{-4.264}$	0.903
	Franquette	$30,748.\theta^{-4.293}$	0.914
	Lara	$34,636.\theta^{-4.388}$	0.940
	Serr	$27,431.\theta^{-4.217}$	0.916

Springer

Fig. 3 Frost resistance variation of different walnut genotypes (Franquette: F; Lara: L, Early hybrid: EH and Late hybrid: LH) in two locations in central France: Crouël (alt: 340 m a.s.l., dashed line) and Theix (alt: 870 m a.s.l., solid line) as plotted vs a calendar date and b chilling units (from Landsberg). Symbols and bars represents respectively mean and standard error calculated on $n=5$ replicates



mountain for wood and -27.0°C in lowland and -27.8°C in mountain for fruit; $P < 0.0001$; genotypes 78.6% of variance, location 5.7%).

In order to compare and explain the source of differences between locations during acclimation, chilling accumulation was calculated from 15 September as evaluated according to different chilling models. Thereafter, ANCOVA was performed using cumulative chilling units as a quantitative co-variable (chilling time), and compared to the simpler ANCOVA using date as a quantitative co-variable (Tables 3 and 4). Compared to Julian days, use of chilling time explained a little bit less variance for most models, but was still highly significant ($P < 0.0001$). Between genotypes (wood- vs fruit-), the difference was similar (between 9.1 and 9.6% of total variance), but most of the difference between locations disappeared using

chilling time for all chilling models except Sarvas and Weinberger. Thus, LT_{50} evolutions became synchronised, especially with the Landsberg model (0.05% of variance explained by variance), as shown in Fig. 3b.

From full acclimation until budburst During deacclimation, three different factors interacted differently: genotype, year and location (Fig. 4). Analysis of covariance depending on calendar date was performed. Differences between years were significant, according to Tukey's test, for Lara ($P=0.001$) and Franquette ($P=0.016$) but neither for E-Hybrid ($P=0.269$) nor L-Hybrid (0.378). Significant differences were observed among locations for Franquette ($P=0.0002$) and L-Hybrid ($P=0.021$), but not for Lara (0.998) and E-Hybrid ($P=0.787$). The same procedure as shown for cold acclimation evolution was applied to cold deacclimation dynamics. Analysis of

Table 3 Analysis of covariance between frost hardiness of different walnut genotypes (LT_{50} calculated by electrolyte leakage method) during endodormancy period, with genotypes and locations as

qualitative variable and date or chill units as quantitative variable calculated from 15 September until full acclimation. SCR Signal to clutter ratio

	Julian day	Bidabe	Dynamic	Hanninen	Landsberg	Utah	Sarvas	Weinberger
R^2	0.950	0.931	0.948	0.929	0.937	0.933	0.909	0.903
SCR	390.8	531.0	406.5	550.0	490.9	515.8	702.2	751.6
$P < F$	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Variation Source								
Quantitative variable	79.83%	82.67%	82.68%	82.19%	83.12%	81.64%	77.90%	76.18%
Genotype	9.55%	9.17%	9.50%	9.25%	9.38%	9.11%	9.26%	9.23%
Location	4.13%	0.20% ns	1.23%	0.35%*	0.05% ns	1.31%	3.08%	4.22%
Varieties* location	0.03% ns	0.02% ns	0.02% ns	0.01% ns	0.01% ns	0.01% ns	0.00% ns	0.00% ns
Quantitative variable* genotype	0.91%	0.83%	0.87%	0.79%***	0.83%***	0.79%	0.68% ns	0.66% ns
Quantitative variable* location	0.50%**	0.26%*	0.46%**	0.31%*	0.27%*	0.49%**	0.02% ns	0.00% ns

**** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns $P > 0.05$

Annexe 5 : La sortie de dormance et l'acclimatation au gel chez le noyer sont-elles sous contrôle environnemental et/ou génotypique ?

Int J Biometeorol

Table 4 Analysis of covariance between frost hardiness of different walnut genotypes (LT_{50} calculated by electrolyte leakage method) during the ecodormancy period, with genotypes and locations as qualitative variable and date or forcing units as quantitative variable calculated from 15 September until full acclimation. Experimental data refers to fitted equation shown in Table 2

		Julian Day	Bidabé	Hanninen	Landsberg	Anderson	GDD5	Sarvas	Exp. data
R^2		0.937	0.877	0.880	0.833	0.799	0.822	0.886	0.873
SCR		1,190.186	2,312.751	2,268.092	3,149.412	3,792.378	3,354.863	2,142.319	2,389.205
P<F		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Variation Source	Quantitative variable	78.16% ****	68.44% ****	68.71% ****	61.88% ****	57.16% ****	59.95% ****	70.07% ****	75.82% ****
	Genotype	12.03% ****	15.47% ****	15.22% ****	14.71% ****	15.27% ****	15.19% ****	14.95% ****	5.69% ****
	Location	1.46% ****	1.27% ****	1.71% ****	4.46% ****	4.28% ****	4.19% ****	1.60% ****	2.30% ****
	Genotype* location	0.74% ****	1.61% ****	1.55% ****	1.47%***	1.75% ***	1.70% ****	1.40% ****	1.17% ****
	Quantitative variable* genotype	1.27%****	0.33% ns	0.27% ns	0.23% ns	0.62% ns	0.46% ns	0.22% ns	2.10% ****
	Quantitative variable* location	0.02% ^{ns}	0.62%***	0.51%***	0.55%**	0.82%**	0.72%**	0.41%**	0.25%*

**** $P < 0.0001$; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns $P > 0.05$

covariance using different thermal times classically used for growing stages or depending on the response to temperature observed for buds (experimental data, Fig. 2) was performed in order to decrease difference among locations. However, none of these analyses (Table 4) were more significant than the simple calendar date (Table 3). Correlation between date and frost hardiness was linear for all genotypes and highly significant ($P < 0.0001$; $R \geq 0.924$). Analysis of covariance indicates that the slope is similar among four different fruit walnuts, whereas wood walnuts deacclimated significantly faster ($P < 0.0001$). At the last sampling date, in June, all genotypes had similar frost resistance of around -10°C at the day of budbreak.

Discussion

Endodormancy and cold acclimation

Dormancy induction is considered as a prerequisite to cold acclimation (Weiser 1970). Moreover, it has been shown in many species that photoperiod decrease is the main driving factor in both endodormancy (Moshkov 1935; Bogdanov 1931; Welling et al. 1997) and cold acclimation inductions (Irving and Lanphear 1968; Weiser 1970; Aronsson, 1975; Christersson 1978). In our study, in both locations, the photoperiod is similar (same latitude, 20 km distant) but the climate is really different (around 3°C less at the higher elevation). Cold resistance was similar in mid-September

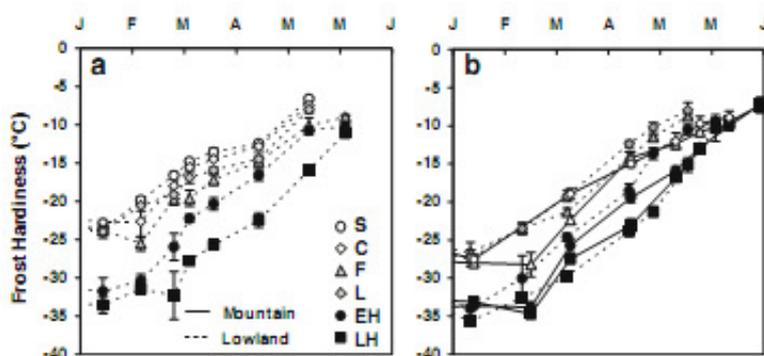


Fig. 4 Frost resistance variation of different walnut genotypes (Franquette: F; Lara: L; Early hybrid: EH and Late hybrid: LH) in two locations in central France: Crouël (alt: 340 m a.s.l., dashed line) and Theix (alt: 870 m a.s.l., solid line) during ecodormancy stage:

LT_{50} calculated by electrolyte leakage method (y-axis) and calendar date (x-axis) in 2008 (a) and 2009 (b) in both locations (lowland and mountain: dashed lines and solid lines, respectively). Symbols and bars represent mean and standard error from $n=5$ replicates

(Fig. 3). Thus, endodormancy release and cold acclimation processes likely started at the same time in both locations and genotypes.

Short day signal alone is only sufficient to provide a first level of hardiness (Howell and Weiser 1970; Schwarz 1970; Greer and Warrington 1982), e.g., to around -20°C in *Picea sitchensis* (Cannell et al. 1985). When endodormancy and cold acclimation processes are enabled, chilling temperature becomes the main driving factor (Sakai and Larcher 1987). Proteins synthesized during the first stage (short-days-induced) will allow, during the second stage of hardening, synthesis of cryoprotectants such as sugars (Guy et al. 1992; Tajiri et al. 2002), solutes or proteins (Xing and Rajashekar 2001).

Freezing temperatures trigger deeper frost resistance than chilling temperatures (Glerum 1973). In this study, a faster rate of cold acclimation was observed in the colder climate: Mountain vs Lowland but maximal hardiness in deep winter was equal, as reported in Dantuma and Andrews (1960) and Pogosyan and Sakai (1969).

Maximal cold hardiness (in January) was similar within fruit walnuts or within wood hybrid walnuts but not between. Wood walnut, a hybrid between *J. regia* and *J. nigra* (more frost resistant), is more frost resistant than *J. regia* (Poirier et al. 2010). However, even if potential maximal hardiness is different, the time course for acclimation is similar. In other species, several studies reported inter-population variation in cold hardiness during autumn (acclimation) or spring (deacclimation). However, no significant differences were observed either in summer (minimal hardiness period) or winter (maximal hardiness period) in *Pinus sylvestris* (Nilsson and Walfridsson 1995) or *Pinus albicaulis* (Bower and Aitken 2006).

In order to compare both locations, we calculated accumulated chilling units according to Landsberg's model (Landsberg 1974), from September until maximal hardiness was reached (Table 3, Fig. 3b). In this case, differences between locations were no longer observed. Thus, differences in the cold acclimation process between both sets of environmental conditions were of strict thermal origin in all different genotypes. Moreover, small differences were observed in chilling requirement (around 900–950 hours of chilling; Table 1), which is in agreement with simulated data from Luedeling et al. (2009). Thus, it appeared that neither endodormancy release nor cold acclimation evolution were genotypically different despite the large differences in budburst dates. Some intraspecific differences in chilling requirements have however been observed in peach trees (Linsley Noakes and Allan 1994), and also in walnut trees (Aslamarz et al. 2010). Conversely, in our study, we observed similar chilling requirements among genotypes. Chilling temperatures should be considered as the main

driving factor for these processes under strict environmental, even thermal, control.

In the context of global warming, some studies have reported that the date of endodormancy release could be delayed significantly (Legave et al. 2008). It is also likely that the onset of endodormancy should be delayed mainly for species that are poorly sensitive to photoperiod. But very few reports are available in the literature. Regarding cold acclimation, hardening could be affected significantly (Pogosyan and Sakai 1969) but would still be possible (Charrier and Améglio 2011). We can hypothesize that the differences among walnut genotypes should not be impacted significantly during cold acclimation and endodormancy release.

Ecodormancy and cold deacclimation

After endodormancy was released, huge differences among genotypes in sensitivity to forcing temperatures appeared (Table 1). The earlier the genotype in natura, the lower the MTB at 25°C after endodormancy release [470 h in earlier (Serr and Chandler) and 550 h in later fruit walnut trees (Lara and Franquette), which is consistent with earlier studies on different walnut trees (Mauget and Germain 1980; Mauget 1981)]. This was also observed within wood walnuts (660 vs 730 h).

This relationship between growth rate and temperature is non linear (Fig. 1) consistent with earlier reports (Myking 1999; Sarvas 1974), although some authors use linear response curve (Karlsson et al. 2003; Linkosalo et al. 2009; Clark and Thompson 2010). This linear approach has been contested for years (Arnold 1959; Wang 1960; Cannell and Smith 1983). This is indeed likely to be due to the relationship with the underlying metabolism driving bud growth, and differences in temperature sensitivity between genotypes, which are not linear processes. Lots of models have been published predicting phenology of trees (e.g., Fuchigami et al. 1982; Kellomaki et al. 1992; Linkosalo et al. 2000; Rea and Eccel 2006) and have used a linear relationship between time to budbreak and temperature (Cannell and Smith 1983; Linkosalo et al. 2009; Clark and Thompson 2010). As indicated by Cannell and Smith (1983), a non-linear response "would not invalidate the use of thermal time if there were temperatures without any marked tendency to increasing temperatures". But, with global change, this approximation could lead to large discrepancies between predicted and actual future phenology.

Among fruit walnuts, for most temperatures, only a few significant differences were observed in growth rate. They involved mainly the Serr genotype, which seemed to grow slower than Lara whereas its budburst occurred earlier. Thus, growth rate in ecodormancy cannot explain pheno-

logical deviation among fruit walnut cultivars. But, among wood walnuts, under warm temperatures, growth rate is similar; in colder temperatures, the growth rate of the earliest hybrids is higher than that of later hybrids. Thus, below 15°C, the growth rate of early hybrids was similar to that of fruit walnuts. After endodormancy release, while temperatures were still cold, earlier hybrids are able to grow faster than later ones. Thereafter, in milder temperatures, the growth rate was similar but phenological deviation between wood walnuts already existed.

Trends in cold deacclimation highlighted the difference between fruit and wood walnuts (Fig. 4). Some studies observed that the evolution of cold deacclimation is correlated with budburst time in natural populations (Hannerz 1999). Indeed, between locations, deacclimation started later in mountain climate, limited by cold temperatures. Two differences were observed between fruit and wood walnuts: the rate of deacclimation was significantly different, with wood walnuts deacclimating faster but starting at a lower level. Then, among fruit walnut, or also among wood or fruit walnut, earlier genotypes were deacclimating with the same rate but a little bit earlier. In some studies on *Pseudotsuga menziesii*, it was observed that earlier genotypes deacclimate faster (Jermstad et al. 2001, O'Neill et al. 2000). Nevertheless, the heritability of spring frost resistance is higher than for autumn resistance (Anekonda et al. 2000; Aitken and Adams 1997). We can hypothesize that sensitivity to temperature is different and probably linked to inherent metabolic activities. During cold deacclimation, starch reserves, used initially as substrate for acclimation, are re-synthesized (Witt and Sauter 1994a, 1994b; Essiamah and Eschrich 1985). Alpha amylase involved in carbohydrate metabolism could be the critical factor in this process (Schrader et al. 2004). Indeed, genetic analysis identified this enzyme as a strong quantitative trait locus (QTL) for budburst date in different *Quercus petrae* altitudinal populations (Derory et al. 2006, 2009). Thus, among fruit or among wood walnuts, differences in the activation energy of isoenzymes could trigger metabolic activities in colder conditions for earlier genotypes, and thus, in fruit walnuts, enzymatic activity could be higher than that in wood walnuts. These hypotheses could better explain why we observed budburst when an LT_{50} value reached around -10°C, because of the strong link between frost hardiness and carbohydrate content (Sakai and Larcher 1987).

The environmental response of cold deacclimation is not totally clear among genotypes. Some interactions were indeed observed between genotype and location: for L-Hybrid or Franquette but not for Lara and E-Hybrid; or between genotype and year: for Lara and Franquette but

not E-Hybrid and L-Hybrid. These differences among location and years could not be explained by temperature alone, but maybe through a photoperiod effect, acting as a forcing factor, whereas temperature was limiting. Recently, Korner and Basler (2010a) argued that "phenological events (...) are not primarily controlled by temperature", which initiated a controversy (Chuine et al. 2010, Korner and Basler 2010b). These results serve to show that temperature is not the only factor involved in differences between locations. But, if there is a photoperiod effect, this could better explain why late hybrids are bud bursting at similar dates at different locations (Table 1).

Our results appear to contradict several earlier studies on fruit trees. Couvillon and Erez (1985) proposed that, in fruit tree cultivars, there is no genetic difference in heat requirement during ecodormancy, but Citadin et al. (2001) showed the reverse. A negative correlation between chilling requirement and heat requirement has been reported in apricot (Ruiz et al. 2007). Our findings are supported by experiments in which endodormancy release dates were similar between walnut cultivars whereas budburst dates were highly different (Mauget and Germain 1980; Mauget 1981). Several studies concluded that frost acclimation and endodormancy release were strongly related (Fuchigami et al. 1982; Leinonen 1996; Druart et al. 2007). Moreover, strong genetic control of spring cold hardiness was observed in natural populations, while for autumn the cold hardiness relationship is weak (Aitken and Adams 1997).

According to our results, we could expect that, in the future, the phenological response of walnut would differ significantly among genotypes, exacerbating the range of deviation. This could lead to increasing freezing damage in the earliest genotypes, mostly through earlier exposure of buds and new leaves. But, this impact could be mitigated if endodormancy release is delayed enough to result in delayed budburst. More likely there will be extended budbreak and flowering periods, and maybe some problems for pollination if male and female flowers do not respond exactly in the same way to increasing temperatures. This point should be investigated as it is not certain that we can continue to consider the whole population of buds as homogeneous regarding their response to temperature. Interaction between genotype and environment (temperature but also photoperiod) should also lower these risks.

Conclusion

In this study, two main frost resistance mechanisms were monitored: frost avoidance and frost tolerance. Both

processes appeared to be similarly driven. First, during endodormancy and cold acclimation, they were strictly environmentally driven. Thereafter, during ecodormancy and cold deacclimation, beside environmental effects, a strong genotypic effect was identified. During this stage, these two driving factors interact within the same species, *J. regia* L. This explains why we observed a deviation in budbreak date in walnut trees. These results are of great importance in modelling approaches to predict dates of budburst in the coming decades. Thus, during the endodormancy/acclimation stage, climatic data only would be sufficient as a parameter, but in ecodormancy/deacclimation, genotypic differences have to be taken into account, probably through metabolism and expression of some related protein. This will need further experiments.

Acknowledgments This work was supported in part by INRA—Department of Agronomy and Environment and by a MRES PhD grant to G.C. We are grateful to Christian Bodet and Christophe Serre for their help with data collection of LT₅₀. We would like also thank the two anonymous reviewers for their comments, which helped us to improve the manuscript.

References

- Aitken SN, Adams WT (1997) Spring cold hardiness under strong genetic control in Oregon populations of *Betula pumila* var. *menziesii*. *Can J For Res* 27:1773–1780
- Anderson JL, Richardson EA, Kesner CD (1986) Validation of chill unit and flower bud phenology models for "Montmorency" sour cherry. *Acta Hort* 184:71–78.
- Anekonda TS, Adams WT, Aitken SN, Neale DB, Jermstad KD, Wheeler NC (2000) Genetics of cold hardiness in a cloned full-sib family of coastal Douglas-fir. *Can J For Res* 30:837–840
- Arnold CY (1959) The determination and significance of the base temperature in a linear heat unit system. *Proc Am Soc Hort Sci* 74:430–445
- Aronsson A (1975) Influence of photo- and thermoperiod on the initial stages of frost hardening and dehardening of phytotron-grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Stud For Suec* 128
- Aslamarz AA, Vahdati K, Rahemi M, Hassani D (2010) Evaluation of chilling-heat requirements of some Persian walnut cultivars. *Acta Hort* 861:317–320.
- Bidabe B (1967) Action de la température sur l'évolution des bourgeons de pommier et comparaison de méthodes de contrôle de l'époque de floraison. *Ann Physiol Vég* 9:65–86
- Bogdanov P (1931) Ueber Photoperiodismus beider Holzarten. *Mitt Staatsinst Wiss Forsch Gebiet Forstwirtschaft Holzind* 10:21–55
- Bower AD, Aitken SN (2006) Geographic and seasonal variation in cold hardiness of whitebark pine. *Can J For Res* 36:1842–1850
- Campbell RK, Sugano AI (1975) Phenology of bud burst in Douglas-fir related to provenance, photoperiod, chilling, and flushing temperature. *Bot Gaz* 136:290–298
- Cannell MGR, Smith RI (1983) Thermal time, chill days and prediction of budburst in *Picea sitchensis*. *J Appl Ecol* 20:951–963
- Cannell MGR, Sheppard LJ, Smith RI, Murray MB (1985) Autumn frost damage on young *Picea sitchensis* 2. Shoot frost hardening, and the probability of frost damage in Scotland. *Forestry* 58:145–166
- Charrier G, Améglio T (2011) The timing of leaf fall affects cold acclimation by interactions with air temperature through water and carbohydrate contents. *Environ Exp Bot* 72:351–357
- Christersson L (1978) The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. *Physiol Planta* 44:288–294
- Chuine I, Morin X, Bugmann H (2010) Warming, photoperiods, and tree phenology. *Science* 329:277–278
- Citadin I, Raseira MCB, Herter FG, Silva JbD (2001) Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience* 36:305–307
- Clark RM, Thompson R (2010) Predicting the impact of global warming on the timing of spring flowering. *Int J Climatol* 30:1599–1613
- Couvillon GA, Erez A (1985) Effect of level and duration of high temperatures on rest in the peach. *J Am Soc Hortic Sci* 110:579–581
- Dantuma G, Andrews JE (1960) Differential response of certain barley and wheat varieties to hardening and freezing during sprouting. *Can J Bot* 38:133–151
- Dennis FG Jr (1987) Producing temperate-zone fruits at low latitudes: an overview. *HortScience* 22:1226–1227
- Dennis FG Jr (1994) Dormancy. What we know (and don't know). *HortScience* 29:1249–1255
- Derory J, Scotti-Saintagne C, Bertocchi E, Le Dantec L, Graignic N, Jauffres A, Casasoli M, Chancarel E, Bodenès C, Alberto F, Kremer A (2009) Contrasting relations between diversity of candidate genes and variation of bud burst in natural and segregating populations of European oaks. *Heredity* 105:401–411
- Derory J, Leger P, Garcia V, Schaeffer J, Hauser MT, Salin F, Luschnig C, Plomion C, Gloss J, Kremer A (2006) Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytol* 170:723–738
- Druart N, Johansson A, Baha K, Schrader J, Sjödin A, Bhalerao RR, Resman L, Trygg J, Moritz T, Bhalerao RP (2007) Environmental and hormonal regulation of the activity-dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *Plant J* 50:557–573
- Esiyama S, Eschrich W (1985) Changes of starch content in the storage tissues of deciduous trees during winter and spring. *IAWA Bulletin*:97–106
- Fishman S, Erez A, Couvillon GA (1987a) The temperature dependence of dormancy breaking in plants: mathematical analysis of a two-step model involving a co-operative transition. *J Theor Biol* 124:473–483
- Fishman S, Erez A, Couvillon GA (1987b) The temperature dependence of dormancy breaking in plants: computer simulation of processes studied under controlled temperatures. *J Theor Biol* 126:309–321
- Fuchigami LH, Weiser CJ, Kobayashi K, Timmis R, Gusta LV (1982) A degree growth stage (degree GS) model and cold acclimation in temperate woody plants. In: Li PH, Sakai A (eds) *Plant cold hardiness and freezing stress. Mechanisms and crop implications*, vol 2. Academic, New York, pp 93–116
- Germain E, Prunet JP, Garcin A (1999) *Le Noyer* Editions. CTIFL, Paris
- Glerum C (1973) Annual trends in frost hardiness and electrical impedance for seven coniferous species. *Can J Plant Sci* 53:881–889
- Greer DH, Warrington IJ (1982) Effect of photoperiod, night temperature, and frost incidence on development of frost hardiness in *Pinus radiata*. *Aust J Plant Physiol* 9:333–342

Annexe 5 : La sortie de dormance et l'acclimatation au gel chez le noyer sont-elles sous contrôle environnemental et/ou génotypique ?

Int J Biometeorol

- Guy CL, Huber JLA, Huber SC (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low-temperature. *Plant Physiol* 100:502–508
- Hannerz M (1999) Evaluation of temperature models for predicting bud burst in Norway spruce. *Can J For Res* 29:9–19
- Hanninen H (1990) Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. *Acta For Fenn* 213:1–47
- Heide OM (1993a) Daylength and thermal time responses of budburst during dormancy release in some northern deciduous trees. *Physiol Planta* 88:531–540
- Heide OM (1993b) Dormancy release in beech buds (*Fagus sylvatica*) requires both chilling and long days. *Physiol Planta* 89:187–191
- Heide OM, Prestrud AK (2005) Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiol* 25:109–114
- Howell GS, Weiser CJ (1970) The environmental control of cold acclimation in apple. *Plant Physiol* 45:390–394
- Irving RM, Lanphear FO (1968) Regulation of cold hardiness in *Acer negundo*. *Plant Physiol* 43:9–13
- Jernstad KD, Bassoni DL, Wheeler NC, Anekonda TS, Aitken SN, Adams WT, Neale DB (2001) Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir. II. Spring and fall cold-hardiness. *Theor Appl Genet* 102:1152–1158
- Kalberer SR, Wisniewski M, Arora R (2006) Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Sci* 171:3–16
- Karlsson PS, Bylund H, Neuvonen S, Heino S, Tjus M (2003) Climatic response in the mountain birch at two areas in northern Fennoscandia and possible responses to global change. *Ecography* 26:617–625
- Kellomaki S, Vaisanen H, Hanninen H, Kolstrom T, Lauhanen R, Mattila U, Pajari B (1992) A simulation model for the succession of the boreal forest ecosystem. *Silva Fenn* 26:1–18
- Korner C, Basler D (2010a) Phenology under global warming. *Science* 327:1461–1462
- Korner C, Basler D (2010b) Warming, photoperiods, and tree phenology response. *Science* 329:278
- Landsberg JJ (1974) Apple fruit bud development and growth. Analysis and an empirical model. *Ann Bot* 38:1013–1023
- Lang GA, Early JD, Martin GC, Darnell RL (1987) Endo-, para- and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience* 22:371–377
- Larcher W (1995) Physiological plant ecology. *Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer, Berlin
- Larcher W, Mair B (1968) Das kalteresistenzverhalten von *Quercus pubescens*, *Ostrya carpinifolia* und *Fraxinus ornus* auf drei thermisch unterschiedlichen standorten. *Oecol Planta* 3:255–270
- Legave JM, Farrera I, Almeras T, Calleja M (2008) Selecting models of apple flowering time and understanding how global warming has had an impact on this trait. *J Hort Sci Biotechnol* 83:76–84
- Leinonen I (1996) A simulation model for the annual frost hardiness and freezing damage of scots pine. *Ann Bot* 78:687–693
- Linkosalo T, Carter TR, Hakkinen R, Hari P (2000) Predicting spring phenology and frost damage risk of *Betula* spp. under climatic warming: a comparison of two models. *Tree Physiol* 20:1175–1182
- Linkosalo T, Hakkinen R, Terhivuo J, Tuomenvirta H, Hari P (2009) The time series of flowering and leaf bud burst of boreal trees (1846–2005) support the direct temperature observations of climatic warming. *Agric For Meteorol* 149:453–461
- Linsley Noakes GC, Allan P (1994) Comparison of two models for the prediction of rest completion in peaches. *Sci Hortic* 59:107–113
- Luedeling E, Zhang MH, McGranahan G, Leslie C (2009) Validation of winter chill models using historic records of walnut phenology. *Agric For Meteorol* 149:1854–1864
- Mauget JC (1981) Modification des capacités de croissance des bourgeons du noyer par application d'une température de 4 degrés C à différents moments de leur période de repos apparent. *C R Acad Sci Paris III* 292:1081–1084
- Mauget JC, Germain E (1980) Dormance et précocité de débourrement des bourgeons chez quelques cultivars de Noyer (*Juglans regia* L.). *C R Acad Sci Paris D* 290:135–138
- Meier U (2001) Stades phénologiques des mono-et dicotylédones cultivées. BBCH Monographie. Centre Fédéral de Recherche Biologiques pour l'Agriculture et les Forêts. http://www.jki.bund.de/fileadmin/dam_uploads/_veroeff/bbch/BBCH-Skala_franz%20C3%B6sisch.pdf. 166 pp
- Menzel A, Sparks TH, Estrella N, Koch E, Aasa A, Ahas R, Alm-Kubler K, Bissolli P, Braslavska O, Briede A, Chmielewski FM, Crepinsek Z, Curnel Y, Dahl A, Defila C, Donnelly A, Filella Y, Jatca K, Mage F, Mestre A, Nordli O, Penuelas J, Prinen P, Remisova V, Scheffinger H, Striz M, Susnik A, Van Vliet AJH, Wielgolaski FE, Zach S, Züst A (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biol* 12:1969–1976
- Moshkov BS (1935) Photoperiodismus und Frosthärte ausdauernder Gewächse. *Planta* 23:774–803
- Myking T (1999) Winter dormancy release and budburst in *Betula pendula* Roth and *B. pubescens* Ehrh. ecotypes. *Phyton* 39:139–146
- Nilsson JE, Walfridsson EA (1995) Phenological variation among plus-tree clones of *Pinus sylvestris* (L.) in northern Sweden. *Silvae Genet* 44:20–28
- O'Neill GA, Aitken SN, Adams WT (2000) Genetic selection for cold hardiness in coastal Douglas-fir seedlings and saplings. *Can J For Res* 30:1799–1807
- Parnesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421:37–42
- Perry TO (1971) Dormancy of trees in winter. *Science* 171:29–36
- Pogosyan KS, Sakai A (1969) Freezing resistance in grape vines. *Low Temperature Science Series B* 27:125–142
- Poirier M, Lacombe A, Améglio T (2010) A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. *Tree Physiol* 30:1555–1569
- Pouget R (1964) Observations sur la vitesse de débournement de cépages de *Vitis vinifera* L. après levée artificielle de la dormance. *C R Acad Sci Paris* 258:4333–4335
- Rea R, Eccel E (2006) Phenological models for blooming of apple in a mountainous region. *Int J Biometeorol* 51:1–16
- Repo T, Lappi J (1989) Estimation of standard error of impedance-estimated frost resistance. *Scand J For Res* 4:67–74
- Richardson EA, Seeley SD, Walker DR (1974) A model for estimating the completion of rest for Redhaven and Elberta peach trees. *Hortscience* 9:331–332
- Ruiz D, Campoy JA, Egea J (2007) Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ Exp Bot* 61:254–263
- Sakai A, Larcher W (eds) (1987) Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological studies series*. Springer, Berlin
- Sarvas R (1974) Investigations on the annual cycle of development of forest trees. 2. Autumn dormancy and winter dormancy. *Commun Inst For Fenn* 84:101
- Schrader J, Moyle R, Bhalerao R, Hertzberg M, Lundeberg J, Nilsson P, Bhalerao RP (2004) Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *Plant J* 40:173–187
- Schwarz Wv (1970) Der einfluss der photoperiode auf das austreiben, die frosthärte und die hitzeresistenz von zirben und alpenroten. *Flora* 159:258–285
- Scorza R, Okie WR (1990) Peaches (*Prunus*). *Acta Hort* 290:175–231

- Sutinen ML, Palta JP, Reich PB (1992) Seasonal differences in freezing stress resistance of needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa*: evaluation of the electrolyte leakage method. *Tree Physiol* 11:241–254
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29:417–426
- Thomson AJ, Moncrieff SM (1982) Prediction of bud burst in douglas-fir by degree-day accumulation. *Can J For Res* 12:448–452
- Topp BL, Sherman WB, Raseira MCB (2008) Low-chill cultivar development. In: Layne DR, Bassi D (eds) *The peach: botany, production and uses*. Cabi, Wallingford, UK, pp 106–138
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A (2009) Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Can J For Res* 39:1259–1269
- Wang JV (1960) A critique of the heat unit approach to plant response studies. *Ecology* 41:785–790
- Weinberger JH (1950) Prolonged dormancy of peaches. *Proc Am Soc Hort Sci* 56:129–133
- Weiser CJ (1970) Cold resistance and acclimation in woody plants. In: Larsen RP (ed) *Cold hardiness, dormancy and freeze protection of fruit crops*. Pullman, WA, pp 403–410
- Welling A, Palva ET (2006) Molecular control of cold acclimation in trees. *Physiol Planta* 127:167–181
- Welling A, Kaikuranta P, Rinne P (1997) Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*. Involvement of ABA and dehydrins. *Physiol Planta* 100:119–125
- Witt W, Sauter JJ (1994a) Enzymes of starch metabolism in poplar wood during fall and winter. *J Plant Physiol* 143:625–631
- Witt W, Sauter JJ (1994b) Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilization and summer deposition. *Physiol Planta* 92:9–16
- Xing WB, Rajashekar CB (2001) Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* 46:21–28
- Zhang MIN, Willison JHM (1987) An improved conductivity method for the measurement of frost hardiness. *Can J Bot* 65:710–715

Annexe 6 : Modélisation de la résistance au gel du noyer au cours de l'hiver

« The purpose of models is not to fit the data but to sharpen the questions. »

S. Karlin

Frost Resistance and Evolution of Acclimation in walnut trees: a process-based model

Charrier Guillaume^{1,2}, Améglio Thierry^{1,2}

¹INRA, UMR547 PIAF, F-63100 CLERMONT-FERRAND, France

²Université Blaise Pascal, UMR547 PIAF, F-63 AUBIERE, France

Introduction

Le froid est considéré comme étant le facteur majeur limitant la répartition et la productivité des arbres (Sakai & Larcher, 1987). On distingue deux aspects complémentaires dans les mécanismes de résistance au gel : la dormance des bourgeons qui constitue un mécanisme d'évitement de l'exposition au gel d'un organe particulièrement sensible (cf. chapitre 2) et l'endurcissement à supporter des températures gélives par l'intermédiaire d'une augmentation progressive des capacités de résistance au gel.

Pour le premier mécanisme, l'entrée en dormance des bourgeons serait initiée par une diminution de la photopériode (Perry, 1971 ; Lang *et al.*, 1987). Les bourgeons qui sont entrés en endodormance nécessitent alors une exposition à des températures froides pour retrouver des capacités de croissance (Weinberger, 1950). Après un délai suffisant d'exposition au froid, leurs capacités de croissance ne dépendent plus que des températures douces, durant la phase d'écodormance du cycle de développement. Les bourgeons vont alors s'ouvrir et débourrer lorsque les températures sont devenues propices à la physiologie estivale.

Pour le second mécanisme d'acclimation aux basses températures, la diminution de la photopériode à la fin de l'été est un signal initiant l'endurcissement aux températures gélives (Aronsson, 1975; Christersson, 1978). Les basses températures par la suite vont permettre un accroissement de cette

résistance au gel (Pogosyan & Sakai, 1969 ; Greer & Warrington, 1983) durant l'automne, pour atteindre un maximum de résistance au coeur de l'hiver (cf. chapitre 3). Enfin, au printemps, alors que les risques et l'intensité des gels diminuent, une diminution de la résistance au gel est observée, le désendurcissement, phase principalement contrôlée par des températures douces, sans effet de la photopériode (Leinonen *et al.*, 1997).

Ces deux mécanismes (dormance et endurcissement) sont donc sous le contrôle des mêmes paramètres climatiques et sont, de plus, décrits comme interagissant entre eux (Fuchigami *et al.*, 1982 ; cf. chapitre 5). Par exemple, l'arrêt de croissance et l'entrée en dormance sont des pré-requis nécessaires à l'endurcissement au gel (Weiser, 1970 ; Ruttink *et al.*, 2007).

Depuis quelques décennies, la réalité d'un changement global semble se confirmer et les études climatologiques prédisent une augmentation moyenne des températures de 3 à 6°C (IPCC, 2007). Même s'il existe une forte incertitude sur l'ampleur de ces changements, ces modèles montrent également une augmentation de la probabilité d'événements extrêmes, *i.e.* gels moins fréquents mais aussi intenses. De plus, les perturbations sur des processus, qui nous l'avons vu, sont essentiellement dirigés par la température ne sont pas encore totalement estimées (Saxe *et al.*, 2001 ; Woldendorp *et al.*, 2008). Néanmoins des cartes de répartition potentielle des espèces commencent à être produites (Badeau *et al.* 2004) et une forte demande des gestionnaires forestiers se fait sentir sur la connaissance et le choix

d'espèces à replanter moins vulnérables et plus résilientes vis à vis de ces événements extrêmes.

Pour répondre à cette demande, et prédire les capacités d'adaptation et les risques potentiels sur la survie des arbres forestiers et fruitiers, il nous semble particulièrement nécessaire d'estimer l'impact de ces changements sur la résistance au gel, facteur majeur limitant la répartition et la productivité des arbres (Sakai & Larcher, 1987).

Il existe à l'heure actuelle différents modèles pour prédire la résistance au gel. Certains sont basés sur des relations directes entre température et vitesse d'évolution de la résistance au gel directement (Greer & Warrington, 1982 ; Cannell *et al.*, 1985b, Repo *et al.*, 1990) ou couplée avec la dynamique de sortie de dormance (Fuchigami *et al.*, 1982 ; Leinonen *et al.*, 1996). Ces modèles pourraient permettre d'évaluer ces risques. Mais l'impact des changements climatiques n'étant pas limité aux

températures et à la période hivernale, différentes interactions sont à craindre qu'elles soient abiotiques (ex. sécheresses) ou biotiques (ex. défoliation par des phytophages). Ces événements en limitant la capacité des arbres à former des réserves risquent d'entraîner une limitation de l'endurcissement (Thomas *et al.*, 2004 ; Poirier, 2008). Récemment Poirier *et al.*, (2010) ont publié un modèle permettant de prédire la résistance au gel en fonction d'une variable climatique et de deux variables physiologiques : l'humidité pondérale et le contenu en sucres solubles. Ce modèle permet ainsi de prendre en compte l'effet de stress estivaux sur la capacité à s'endurcir mais nécessite des prélèvements répétés et n'est donc pas prédictif ou limité à une utilisation en pépinière pour de jeunes arbres.

Il ressort donc que si l'on souhaite prédire l'évolution de la résistance au gel dans des conditions climatiques futures et rendre un peu plus réaliste les cartes de répartition des espèces actuellement produites, il va

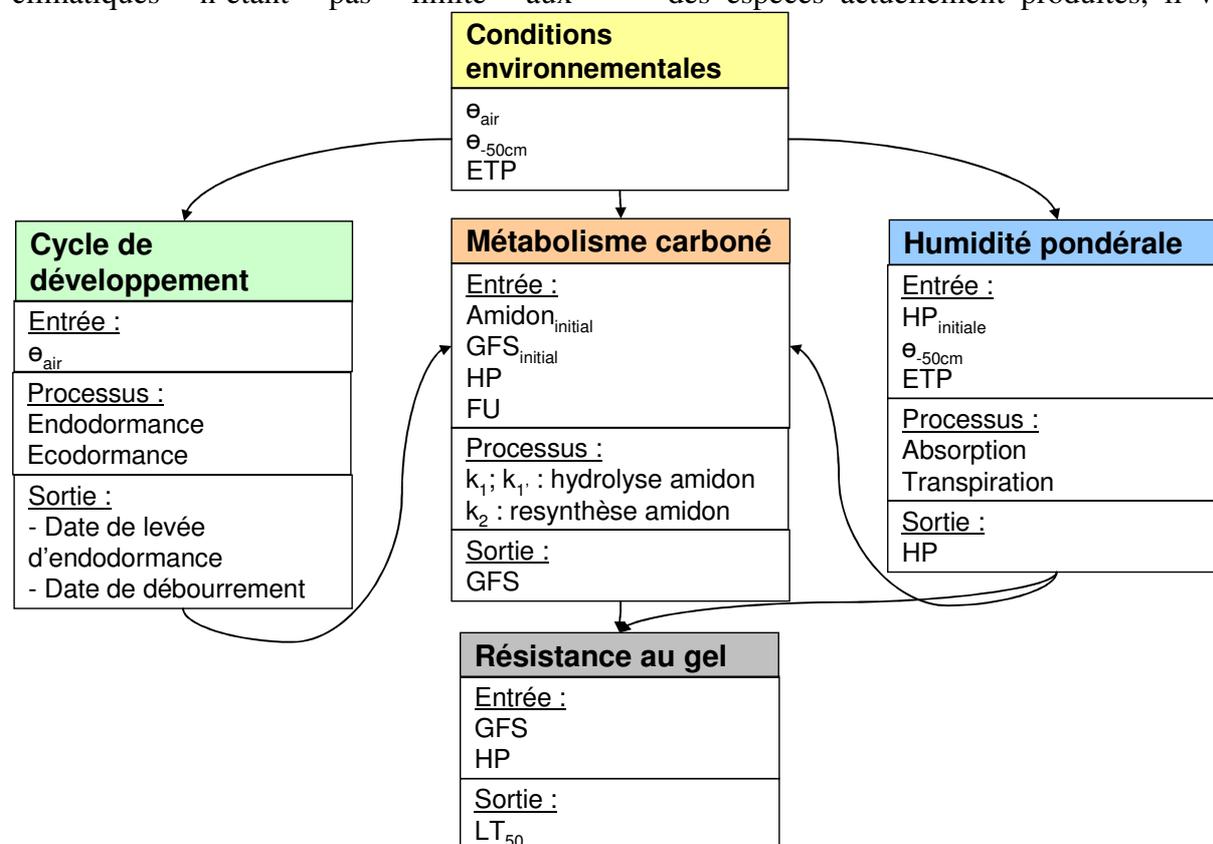


Figure 6.1. Architecture du modèle de prédiction de la vulnérabilité au gel: composé de 3 sous-modèles : Cycle de développement, Humidité Pondérale et Métabolisme Carboné avec comme variables d'entrée T_{air} (température de l'air), T_{-50} (température du sol à 50cm de profondeur) et ETP (évapotranspiration potentielle).

falloir prendre en compte : (i) l'interaction avec la dynamique du cycle annuel de dormance et de débourrement, (ii) l'impact de stress intervenant durant la période estivale sur la capacité à s'acclimater ou *a minima* disposer d'un état physiologique initial intégrant les variations de conditions estivales de croissance, (iii) n'utiliser que des variables climatiques comme variables d'entrée.

C'est le challenge que nous nous sommes donnés en développant un modèle qui tienne compte de ces considérations. Ce modèle a été développé et paramétré sur *J.regia*, pour des raisons essentiellement de disposition d'un dispositif expérimental de proximité (gradient climatique entre nos deux sites expérimentaux : plaine et moyenne montagne) et d'un important jeu de données pour le paramétrer et le calibrer sur cette espèce.

Description du modèle

Ce modèle est composé de 3 sous-modèles permettant le calcul de la résistance au gel : un sous modèle de prédiction du cycle annuel de développement (ex. levée d'endodormance et date de débourrement), un sous-modèle d'évolution de l'humidité pondérale et un sous-modèle d'évolution du contenu en sucres solubles. La calibration de ces différents modèles a été effectuée sur des données indépendantes.

Sous modèle d'évolution du cycle annuel de développement :

Nous avons fait l'hypothèse d'un modèle séquentiel pour les différentes phases composant la dormance, à savoir que la phase d'écodormance ne débute qu'après la levée complète de l'endodormance (Kramer *et al.*, 1994).

L'entrée en dormance est contrôlée par la diminution de la photopériode (Moshkov, 1935 ; Bogdanov, 1935). Welling *et al.*, (1997) a montré qu'un délai d'exposition de 3 semaines en dessous d'une

photopériode de 12h induisait l'entrée en dormance. Ainsi, le 15 Octobre (20 jours après la date à laquelle la photopériode est de 12h à la latitude des parcelles expérimentales), l'intensité de la dormance est proche de son maximum (Mauget, 1981). En accord avec cela, la date de début d'accumulation des doses de froid (Chilling Units) a donc été fixée au 15 octobre.

L'endodormance est levée après une exposition aux températures froides (Weinberger, 1950). Différents modèles d'accumulation de froid ont été élaborés depuis des décennies (Weinberger, 1967 ; Bidabé, 1967 ; Sarvas, 1974 ; Richardson *et al.*, 1974 ; Landsberg, 1974 ; Fishman *et al.*, 1987 ; Hänninen, 1990). Après une étude préalable, nous avons sélectionné le modèle de Landsberg (1974) car il permet de prendre en compte la variabilité intersites observée dans nos conditions expérimentales (Charrier *et al.*, soumis, Article5).

Ce modèle considère qu'en dessous d'une température de 5°C une unité de froid est accumulée et au-delà, l'effet du froid est inversement proportionnel à la température :

$$CU = \begin{cases} 1 & \text{si } T < 5^{\circ}\text{C} \\ 5/T & \text{si } T > 5^{\circ}\text{C} \end{cases} \quad (1)$$

où : T : température de l'air ; CU : Chilling Unit.

Lorsque ΣCU atteint S_{CUcrit} (48,75), l'endodormance est considérée comme levée, et la phase d'écodormance débute. S_{CUcrit} est fixé à l'aide des résultats obtenus par Charrier *et al.* (Article5). La loi d'action de la température sur la sortie d'écodormance est également fixée à l'aide des résultats de cette même étude. Il s'agit d'une loi d'action suivant une fonction en puissance :

$$\Sigma FU = FU_{t-1} + 1/(a.T^b) \quad (2)$$

avec $a=1281$ et $b=-1.293$

où : FU : Forcing Unit

Ainsi, lorsque $\Sigma FU = 1$, la phase d'écodormance est considérée comme terminée et le débourrement a lieu.

Sous modèle d'évolution de l'humidité pondérale

L'humidité pondérale est le rapport entre la masse d'eau contenue dans les tissus et la masse sèche. On observe une diminution de l'humidité pondérale au cours de l'endurcissement (Luoranen *et al.*, 2004). Elle évolue en fonction de la balance entre l'absorption par le système racinaire (Ab) et l'évapotranspiration par les tissus aériens. La transpiration est considérée comme négligeable pour des arbres à feuilles caduques lors de l'hiver, donc seule l'évaporation est prise en compte (Ev). L'eau est présente dans les tissus végétaux sous forme d'eau libre et d'eau liée qui ne peut pas être évaporée en conditions naturelles. La fraction d'eau liée constitue de 20 à 25% de la matière sèche (Sun, 1999). Ainsi, le contenu en eau est égal au rapport entre la somme de l'eau libre et de l'eau liée et de la masse sèche auquel on ajoute l'eau absorbée et retranche l'eau évaporée :

$$WC = \frac{M_{fw} + M_{bw}}{DM} + Ab_t - Ev_t \quad (3)$$

où WC = humidité pondérale, M_{fw} : la masse d'eau libre, M_{bw} : la masse d'eau liée, DM : la masse sèche, Ab_t : la quantité d'eau absorbée à l'instant t et Ev_t la quantité d'eau évaporée à l'instant t.

En première approximation, nous avons considéré la matière sèche comme constante au cours de l'hiver, ce qui est une approximation grossière, puisqu'une respiration de maintenance peut diminuer le stock de glucides non structuraux en fonction des besoins et sous contrôle de la température.

Ainsi, durant l'hiver, l'absorption d'eau est limitée par la capacité des racines à transporter l'eau vers les parties aériennes. Cette capacité est dépendante de la température du sol (Améglio *et al.*, 2002). En effet, des températures inférieures à 8°C limitent la perméabilité des cellules racinaires et donc l'absorption. De plus fortes températures permettent au contraire une absorption accrue et une réhydratation

(Turcotte *et al.*, 2009 ; Charrier & Améglio, 2011 : Chapitre 3). L'absorption est considérée dépendante de la température selon une fonction sigmoïde :

$$Ab_t = \frac{a}{1 + e^{b(T_{-50} - c)}} \quad (4)$$

où a est un coefficient, b représente la pente au point d'inflexion c (température à laquelle 50% de l'absorption maximale est observée) et T_{-50} : la température du sol à 50cm de profondeur.

L'évaporation est dépendante à la fois de la demande atmosphérique, (Monteith, 1965) et de la quantité d'eau libre disponible (Mellander *et al.*, 2006). L'évolution de l'évaporation est considérée suivre un modèle linéaire croisé à deux variables d'entrée : l'évapotranspiration potentielle et la quantité d'eau libre.

$$Ev = d \cdot M_{fw} + e \cdot ETP + f \cdot M_{fw} \cdot ETP + g \quad (5)$$

où d, e et f sont des coefficients, ETP : l'évapotranspiration potentielle selon la formule de Penman Monteith et M_{fw} la quantité d'eau libre.

Lors de chaque cinétique hivernale, l'humidité pondérale observée expérimentalement est utilisée comme valeur initiale.

Sous modèle d'évolution du contenu en sucres solubles

Le métabolisme carboné est l'objet durant la période hivernale de profonds remaniements (Sauter, 1988 ; Witt & Sauter, 1994 ; Lacoïnte *et al.* 1995 ; Wong *et al.*, 2003 ; Poirier, 2010). A l'automne, sous l'action de basses températures (<10°C ; Sauter, 1988), l'amidon contenu dans les parties aériennes est hydrolysé en sucres solubles (Sakai, 1962; Reuther, 1971, Harms & Sauter, 1992 ; Lacoïnte *et al.* 1993 ; Sauter & Wellekamp, 1998). Il a également été observé en conditions de températures douces (>15°C), une diminution des quantités d'amidon qui n'est pas observée aux températures intermédiaires (Sakai, 1966c ; Chapitre 3). Nous allons donc considérer que deux réactions catalytiques sont possibles pour

l'hydrolyse de l'amidon en sucres solubles avec deux températures optimales différentes. Durant l'hiver, la diminution du contenu total en glucides non structuraux n'a pas toujours été observée significative, dans ces conditions, les pertes de carbone par la respiration ont donc été négligées. Puis, à la fin de l'hiver, lors de la remontée des températures, le contenu en sucres solubles diminue et les réserves en amidon sont resynthétisées. Le métabolisme carboné a donc été modélisé en tant que conversion directe et réversible entre Amidon et Sucres solubles

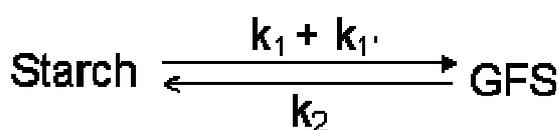


Figure 6.2. Conversion amidon sucre solubles (GFS) selon le sous-modèle métabolisme carboné chaque constante catalytique (k_i) reflète une voie métabolique et un optimum thermique.

La constante catalytique est dépendante de la température et l'équation formulée par Schoolfield *et al.*, (1981) a été utilisée car elle considère à la fois la perte d'activité due aux basses et aux hautes températures de manière non symétrique (équation 6). Par ailleurs, cette équation est utilisée pour décrire les vitesses de développement sans détailler l'ensemble des réactions biochimiques impliquées, mais en considérant la réaction comme limitante. En effet, de nombreuses enzymes sont impliquées dans l'interconversion de l'amidon en sucres solubles.

$$k_i = \frac{\rho_{25} \times \frac{T}{298} \times e^{\left[\frac{\Delta H_A \times \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right]}}{1 + e^{\left[\frac{\Delta H_L \times \left(\frac{1}{T_{1/2L}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right]} + e^{\left[\frac{\Delta H_H \times \left(\frac{1}{T_{1/2H}} - \frac{1}{T} \right)}{R} \right]}} \quad (6)$$

On considère que ces relations sont d'ordre 1, c'est-à-dire que la quantité de substrat transformé sera dépendante à la fois de la constante catalytique et de la quantité de substrat (Marangoni *et al.*, 1997).

Charrier et Améglio (2011 ; chapitre 3) ont observé une relation entre contenu en eau et capacité à former des sucres solubles.

Ainsi une trop forte hydratation limiterait la quantité de sucres formés. De plus, nos nombreux travaux chez le noyer, (Dreyer 1984 ; Améglio, 1991 ; Kajji 1992 ; Chenevard 1995 ; Alves 2003, Decourteix 2006, Poirier, 2008) montrent les quantités d'amidon ne diminuent pas en dessous d'une valeur seuil (aux alentours de 20mg.g^{-1} MS), même en conditions de froid intense. Ainsi, en cohérence avec ces données expérimentales, nous considérons que ces différentes voies métaboliques sont transitoirement activées durant l'hiver.

A l'automne, tant que l'humidité pondérale est supérieure à une valeur seuil, la synthèse d'amidon se produit (k_2 actif, k_1 et k_1' inactif).

Lorsque l'humidité pondérale est en deçà de cette valeur et que le contenu en amidon supérieur au seuil observé par les études préalables, l'hydrolyse de l'amidon en sucres est possible (k_1 et k_1' actifs, k_2 inactif).

Lorsque ce seuil en amidon est franchi et tant que les bourgeons n'ont pas dépassé un stade développement critique, la réaction est possible dans les deux sens en fonction de la température (k_1 , k_1' , k_2 actifs).

Lorsque le développement du bourgeon atteint un stade critique, la resynthèse de l'amidon se produit (k_2 actif, k_1 , k_1' inactifs).

Enfin, à l'approche du débourrement, une nouvelle hydrolyse de l'amidon se produit pour alimenter les bourgeons en substrat carboné : hydrolyse (k_1 , k_1' actifs, k_2 inactif).

Ces différents seuils utilisés sont tirés d'observations expérimentales et affinés lors de la calibration du sous-modèle. Lors de chaque cinétique hivernale, les quantités d'amidon et de GFS observés expérimentalement sont utilisés comme valeurs initiales.

Modélisation de la Résistance au gel

La résistance au gel est fortement corrélée au contenu en eau et en sucres solubles (Poirier *et al.*, 2010; Chapitre1). De plus

une interaction existe entre contenu en eau et capacité à former des sucres solubles (Chapitre 2, Chapitre 3). La résistance au gel est inversement proportionnelle au contenu en eau qui exerce une influence majeure sur les faibles états de résistance. Le contenu en sucres solubles évolue lui dans les gammes de résistance moyenne à maximale, en relation avec la déshydratation déjà observée dans la plante. La température qui provoque 50% de lyse cellulaire, LT_{50} , est donc prédite par l'intermédiaire de la relation suivante :

$$LT_{50} = \frac{a}{(b \cdot WC + c)} \cdot \ln(d \cdot GFS + e) + f \quad (7)$$

Calibration du modèle

Les différents sous-modèles ont été calibrés soit à l'aide d'observation personnelles comme pour le cycle annuel de croissance (Article 5) et la résistance au gel (Article 2) soit à l'aide de données indépendantes utilisées soit pour la calibration soit pour la validation. Ainsi, des dynamiques d'humidité pondérale ont été relevées sur les mêmes lieux durant les hivers 1994-1995 en plaine et 2004-2005 ; 2005-2006 en plaine et moyenne montagne. La calibration a été effectuée en minimisant la somme des carrés des écarts entre les données individuelle ($n=135$ pour chaque paramètre physiologique).

Concernant la résistance au gel la calibration a été effectuée à l'aide des données présentées dans le chapitre 2 (sans les bourgeons).

La sensibilité de chacun des paramètres du modèle sur les variables de sortie que sont l'humidité pondérale, le contenu en sucres et la résistance au gel ont été représentés dans le Tableau 2. Une variation de $\pm 10\%$ de chaque paramètre a été effectuée indépendamment et la différence par rapport à la valeur initiale est également exprimée en pourcentage.

Résultats

Cycle annuel de développement

Les dates de sortie d'endodormance sont observées comprises entre le 21 Décembre 2007 et 14 Décembre 2008 en plaine et 9 Décembre 2008 en moyenne montagne (Figure 1). A partir de ces dates, l'accumulation de chaud commence jusqu'au débourrement. Les dates de débourrement prédites sont les 10 et 22 Avril en plaine (en 2008 et 2009, respectivement) et le 21 Mai 2008 en moyenne montagne. Les dates prédites en plaine sont plus précoces que celle réellement observées de 20 jours en 2008 et 8 jours en 2009 (30 Avril pour les bourgeons terminaux et 4 Mai pour les bourgeons latéraux en 2008 et en 2009). En moyenne montagne, la date de débourrement est également plus précoce que celle prédite (le 8 Mai 2009) pour les bourgeons terminaux, mais correspond exactement à celle observée pour les bourgeons latéraux (21 Mai 2009).

Contenu en eau

A l'automne, une diminution de l'humidité pondérale est observée. Cette diminution est prédite par le modèle, à une vitesse plus rapide (moyenne montagne) ou plus lente (plaine en 2008) que celles réellement observés. En plein hiver, un palier est atteint pour des valeurs

comprises entre 0.7 et 0.9. Ce palier, s'il est correctement prédit en plaine en 2007-2008, est surestimé aussi bien en plaine et qu'en moyenne montagne par rapport aux valeurs observées en 2008-2009.

Au printemps, une augmentation du contenu en eau est observée à l'approche du débourrement lorsque les températures du sol remontent. Cette augmentation de l'humidité pondérale est bien prédite en plaine. Elle apparait plus tardive en moyenne montagne que la remontée réellement observée. Néanmoins, dans l'ensemble, les valeurs prédites sont relativement proches des valeurs observées (RMSE = 0.167) avec des données utilisées

pour valider le modèle qui diminue encore cet écart (RMSEP = 0.161).

Sucres solubles

Dans l'ensemble, l'incertitude de prédiction est faible (RMSEP = 12,1mg.g⁻¹ DM). Les valeurs prédites pour l'année 2007-2008 montrent une décroissance un peu plus rapide de la teneur en sucres par rapport aux valeurs effectivement observées. En plaine en 2008-2009, l'initiation de la formation de sucres

semble retardé, la valeur maximale est ainsi plus basse et la décroissance plus précoce que les données observées. Par contre, la dynamique prédite pour la moyenne montagne en 2008-2009 épouse parfaitement le profil observé.

Résistance au froid

La résistance au froid simulée en 2007, malgré un point initial apparaissant aberrant, montre une dynamique de désendurcissement très proche de celle

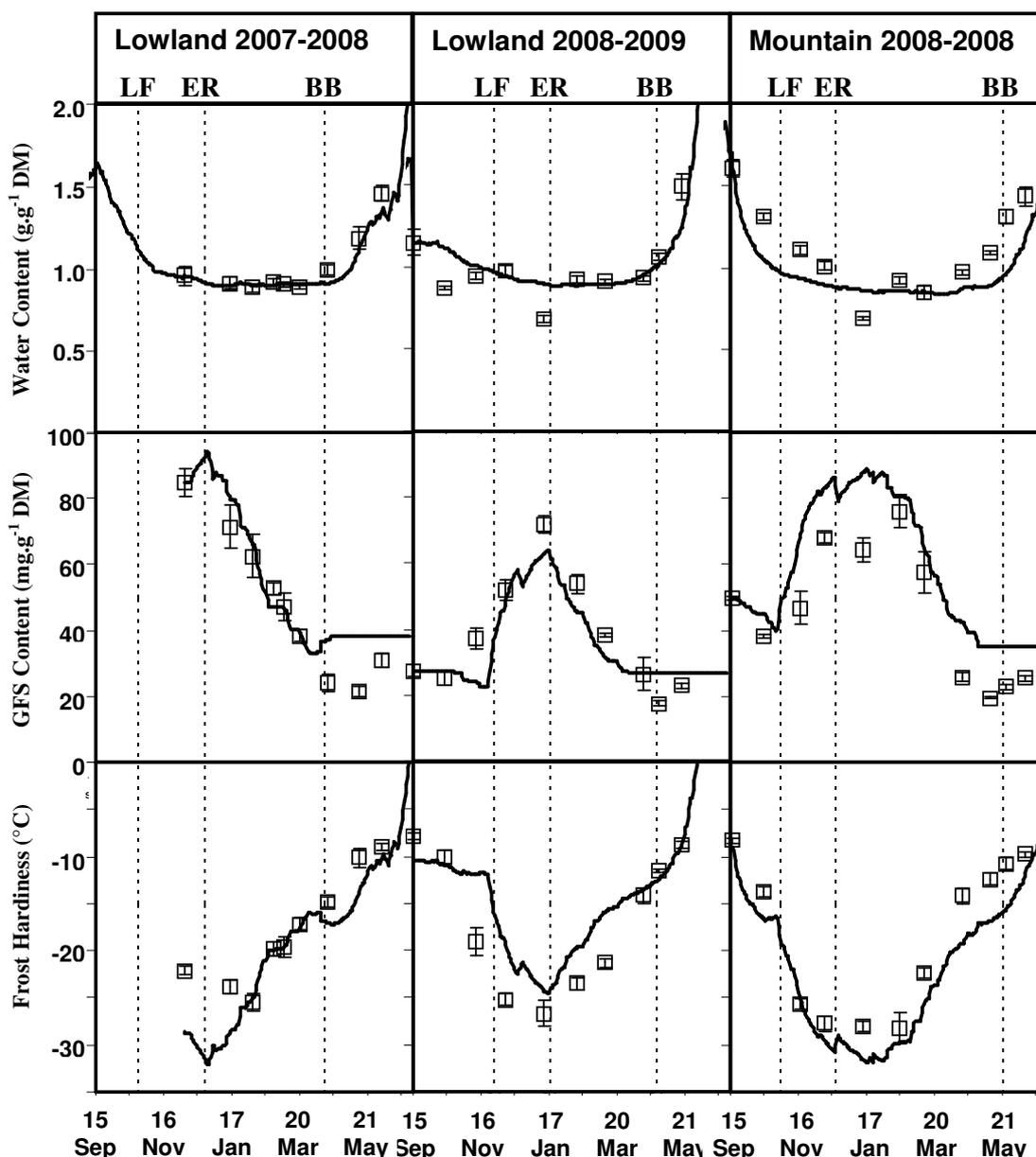


Figure1. Evolution hivernale du contenu en eau (1^{ère} ligne), du contenu en sucres solubles (2^{ème} ligne) et de la résistance au froid (3^{ème} ligne) chez le noyer en plaine lors de l'hiver 2007-2008 (1^{ère} colonne) en 2008-2009 (2^{ème} colonne) et en moyenne montagne (3^{ème} colonne). La ligne représente les valeurs simulées et les carrés représentent les valeurs observées : moyenne et erreur standard de 5 échantillons. Les lignes pointillées verticales représentent les dates simulées de sortie d'endormance (ER) et de débourrement (BB).

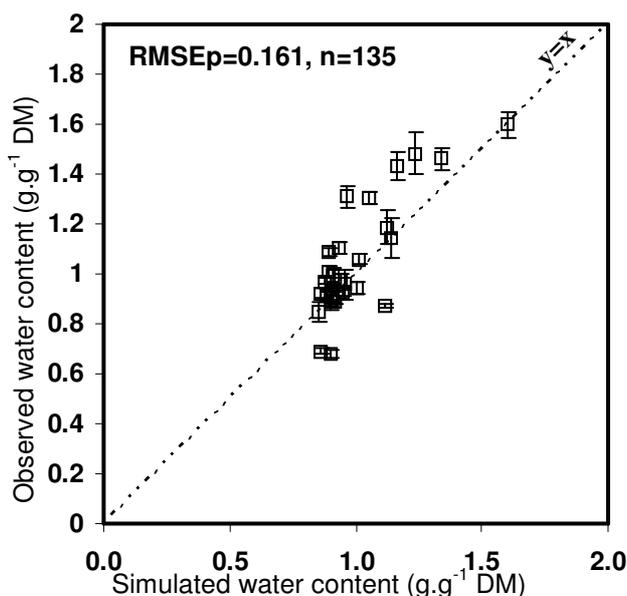


Figure 2. Relation entre le contenu en eau simulé (en abscisse) et observé (en ordonnées) représenté par la moyenne et l'erreur standard de 5 échantillons.

observée. En 2008-2009, la simulation est contrastée selon qu'on simule l'évolution en plaine, où les valeurs observées en termes de vitesse d'acclimatation et de résistance maximale s'éloignent des valeurs prédites. A l'inverse, en moyenne montagne, les valeurs prédites sont très proches des données observées. Dans tous les cas, Malgré cela, la résistance est relativement bien prédite au printemps (RMSEP = 4.11°C).

Discussion

Modélisation du Cycle de développement du noyer.

Comme nous l'avons déjà dit, l'initiation de la phase d'endormance a été synchronisée avec la diminution de la photopériode (trois semaines en dessous de 12h), comme Welling *et al.* (1997) l'ont montré chez *Betula pubescens*. A partir de cette date, le modèle prédit le début de l'accumulation de froid qui est la condition environnementale permettant de lever cette endormance (Weinberger, 1950). Ainsi, la fin de l'endormance est prédite courant Décembre quelque soit la provenance ou l'année, ce qui est cohérent

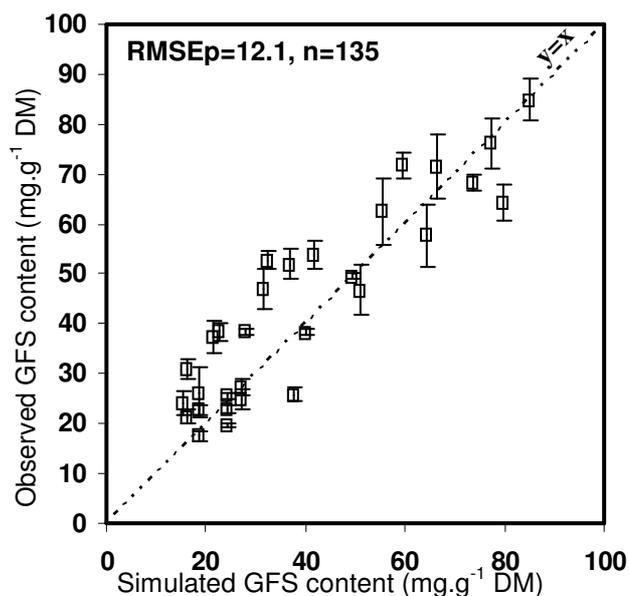


Figure 3. Relation entre le contenu en sucres solubles simulé (en abscisse) et observé (en ordonnées) représenté par la moyenne et l'erreur standard de 5 échantillons.

avec les résultats publiés chez le noyer dans les mêmes conditions

environnementales (Mauget 1976, 1981). En effet, à cette période du cycle, les températures froides permettent une levée rapide de l'endormance. La phase d'écodormance qui lui succède est d'autant plus courte que les températures sont chaudes. Notre modèle, calibré à partir de données expérimentales de Charrier *et al.* (Annexe 4) prédit bien le retard de phénologie observé en moyenne montagne par rapport aux conditions de plaine, mais pour la plaine la date de débourrement apparaît plus précoce que celle observée. Certains modèles utilisent pour modéliser la phénologie que la phase d'écodormance, à partir du premier janvier.

Nos résultats suggèrent que, dans les conditions climatiques de l'étude, cette approche n'apporte pas de véritable biais par rapport à une modélisation séquentielle des deux phases. Néanmoins, certaines études récentes montrent qu'un retard dans la levée d'endormance pour des hivers plus doux (où des fruitiers de climats tempérés cultivés dans des zones sub-optimales) a des répercussions sur la date finale de débourrement en retardant cette date (Guédon & Legave, 2008).

Pour notre sous-modèle, une variation de 10% des paramètres liés à l'accumulation de froid n'a que peu d'impact sur la prédiction de la fin de la phase d'endodormance (2 à 5 jours) et aucun sur la date de débourrement prédite (inférieur à 1 jour). Par contre, les paramètres liés à la phase d'écodormance sont beaucoup plus sensibles, prédisant une variation de l'ordre de 6 à 21 jours pour les paramètres a1 et b1, respectivement. Néanmoins ces paramètres étant basés sur des résultats expérimentaux, leur niveau de confiance est bon.

Modélisation de l'humidité pondérale

L'humidité pondérale évolue au cours de l'hiver ; elle diminue au début de l'hiver (Luoranen *et al.*, 2004) puis remonte au printemps (Turcotte *et al.*, 2009). Cette dynamique est prédite par le modèle avec une divergence importante pour l'humidité pondérale minimale prédite pour l'hiver 2008-2009. Cette différence peut être liée à notre année choisie pour calibrer le modèle. En effet, l'humidité pondérale minimale de ce jeu de données n'est pas descendue au dessous de 0,77, alors que

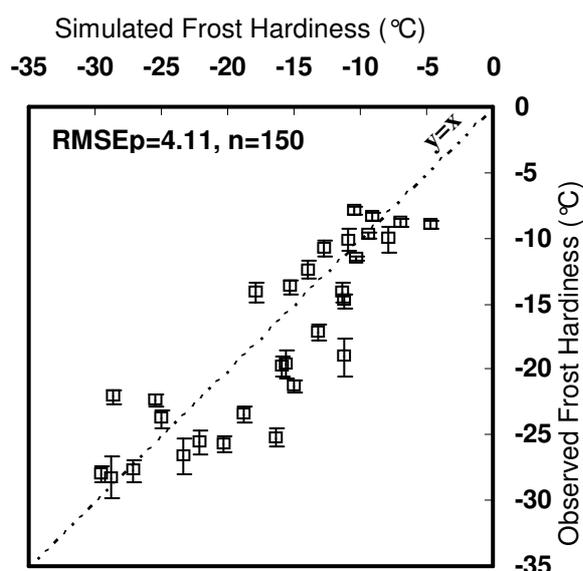


Figure 4. Relation entre la résistance au gel simulée (en abscisse) et observée (en ordonnées) représenté par la moyenne et l'erreur standard de 5 échantillons.

des valeurs significativement plus basses ont été observées lors de l'hiver 2008-2009 que ce soit en plaine ou en moyenne montagne (0,69). Au printemps, la dynamique de réhydratation est bien prédite en plaine mais, pour le site en altitude, la réhydratation est tardive (Mai), par rapport à la réhydratation observée dès le mois d'Avril. Pour le site expérimental en altitude, la température du sol à 50 cm de profondeur qui permet d'initier la réhydratation (Améglio *et al.*, 2001) a été simulée pour les données de calibration par rapport à l'écart de température entre l'air et le sol mesuré sur les deux sites. Cette approximation, pour des teneurs en eau du sol certainement différentes (ex. pluie et type de sol) pourrait expliquer en partie cette différence.

Modélisation de la teneur en sucres solubles

La conversion de l'amidon en sucres solubles lors de l'hiver est décrite par de nombreuses études (Siminovitch *et al.*, 1953 ; Essiamah & Eschrich, 1985 ; Witt & Sauter, 1994). Si notre modèle prédit assez finement la dynamique observée en moyenne montagne, la dynamique simulée semble légèrement décalée en plaine. Sur ce site, elle est en effet retardée à l'automne et avancée au printemps. Charrier & Améglio (2011 ; chapitre 3) ont montré que la première phase d'hydrolyse de l'amidon en sucres solubles est fortement dépendant de l'hydratation des tissus. Ainsi, les paramètres sensibles du sous-modèle qui prédit l'évolution de l'humidité pondérale influencent également ici sur la prédiction de la teneur en sucres solubles. La majorité des paramètres utilisés dans ce sous modèle s'avèrent extrêmement sensibles Cette sensibilité peut néanmoins s'expliquer par le type de modèle utilisé. En effet les réactions enzymatiques sont généralement finement régulées et l'on peut concevoir, qu'un modèle basé sur une analogie enzymatique le soit également ce qui expliquerait la sensibilité de ces

paramètres. De plus, la variation des températures d'inactivation ($T_{1/2H}$ et $T_{1/2L}$) exprimées en Kelvin génère une différence énorme par rapport à la gamme d'activité d'une enzyme.

Modélisation de la résistance au gel

Malgré les incertitudes présentées auparavant sur les différents sous modèles nécessaire à la simulation de la résistance au gel, cette dernière reste relativement bien prédite. L'effet du sous modèle sucre est particulièrement visible sur la dynamique de l'hiver 2008-2009 en plaine. Néanmoins, au printemps : la prévision des risques de dégâts du à une exposition des bourgeons en débourrement est assez bien simulée. C'est la dynamique d'humidité pondérale est le paramètre majeur à cette période (cf Chapitre 2).

Ainsi, notre modèle permet de prédire la dynamique de résistance au gel en fonction de variables climatiques tout en prenant en

compte l'impact du climat sur la physiologie des arbres. Il peut sous cette forme, être testé en conditions de stress ou de climat variable afin d'estimer sa robustesse et permet déjà de traiter et d'évaluer les interactions entre stress à partir du moment où nous avons une idée des réserves glucidiques à l'automne. Ces réserves glucidiques automnales pouvant soit être mesurées, soit simulées comme sortie d'autres modèles de simulation de la physiologie en conditions estivales (PIAF-Munch (Lacointe *et al.*,), STICS (Bresson *et al.*, 1998) ou Castanea (Dufrêne *et al.*, 2005).

Enfin, un couplage avec des modèles prédisant les aires de répartition des espèces, comme le modèle Phénofit (Chuine & Beaubien, 2001, Morin & Chuine 2005°) permettrait de rendre plus réaliste les cartes de distribution des espèces suite aux *scenarii* climatiques prévisibles.

Tableau1. Liste des paramètres

Symbole	Description	Unité	Valeur	Référence
<u>Cycle annuel</u>				
T_b	Température seuil pour l'accumulation de froid	°C	5	Landsberg, 1974
CU_{crit}	Seuil de levée d'endormance	Chilling Units	48,75	Chapitre4 ; article soumis
a_1	Délai de débourrement à 0°C	Jours	1281,17	Chapitre4 ; article soumis
b_1	Coefficient	Sans dimension	-1,293	Chapitre4 ; article soumis
<u>Humidité pondérale</u>				
M_{bw}	Eau liée	g.g DM ⁻¹	0,5	Estimée
a_2	Coefficient	Sans dimension	0,13	Calibré
b_2	Pente	g.g DM ⁻¹ .jour ⁻¹	-0,05	Calibré
c_2	Température à laquelle 50% de l'absorption maximale est observée	°C	9,90	Calibré
d_2	Coefficient	Sans dimension	0,14	Calibré
e_2	Coefficient	Sans dimension	0,02	Calibré
f_2	Coefficient	Sans dimension	-0,045	Calibré

Annexe 6 : Modélisation de la résistance au gel du noyer au cours de l'hiver

g_2	Coefficient		-0,003	Calibré
Metabolisme Glucidique				
P_{25-1}	Vitesse de réaction à 25°C sans inactivation	$mg.g\ DM^{-1}.Jour^{-1}$	0,541	Calibré
ΔHA_{-1}	Enthalpie d'activation de la réaction	$cal.mol^{-1}$	21800	Calibré
ΔHL_{-1}	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le froid	$cal.mol^{-1}$	239971	Calibré
ΔHH_{-1}	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le chaud	$cal.mol^{-1}$	100	Calibré
$T_{1/2L-1}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le froid	Kelvin	277	Calibré
$T_{1/2H-1}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le chaud	Kelvin	330	Calibré
$P_{25-1'}$	Vitesse de réaction à 25°C sans inactivation	$mg.g\ DM^{-1}.Jour^{-1}$	0,75	Calibré
$\Delta HA_{-1'}$	Enthalpie d'activation de la réaction	$cal.mol^{-1}$	19557	Calibré
$\Delta HL_{-1'}$	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le froid	$cal.mol^{-1}$	240440	Calibré
$\Delta HH_{-1'}$	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le chaud	$cal.mol^{-1}$	50000	Calibré
$T_{1/2L-1'}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le froid	Kelvin	275	Calibré
$T_{1/2H-1'}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le chaud	Kelvin	330	Calibré
P_{25-2}	Vitesse de réaction à 25°C sans inactivation	$mg.g\ DM^{-1}.Jour^{-1}$	783174	Calibré
ΔHA_{-2}	Enthalpie d'activation de la réaction	$cal.mol^{-1}$	131204	Calibré
ΔHL_{-2}	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le froid	$cal.mol^{-1}$	328216	Calibré
ΔHH_{-2}	Changement d'enthalpie engendré par l'inactivation par le chaud	$cal.mol^{-1}$	50000	Calibré
$T_{1/2L-2}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le froid	Kelvin	278	Calibré
$T_{1/2H-2}$	Température à laquelle l'enzyme est moitié active moitié inactivée par le chaud	Kelvin	420	Calibré
WC_{crit}	Humidité pondérale critique pour l'initiation de la dégradation de l'amidon en sucre	$g.g\ DM^{-1}$	1,01	Mesuré (voir chapitre3)
FU_{crit1}	Stade de développement du bourgeon au delà duquel l'hydrolyse de l'amidon est inhibée	Sans dimension	0,29	Fixé

Annexe 6 : Modélisation de la résistance au gel du noyer au cours de l'hiver

FU_{crit2}	Stade de développement du bourgeon au delà duquel l'hydrolyse de l'amidon est restaurée	Sans dimension	1,00	Fixé
<u>Frost Hardiness</u>				
a_3	coefficient		-2.977	Calibré
b_3	coefficient		0.0022	Calibré
c_3	constante		0.0067	Calibré
d_3	coefficient		0.00098	Calibré
e_3	constante		1.204	Calibré
f_3	constante		56.44	Calibré

Résumé

Le gel est un des facteurs majeurs limitant l'aire de répartition des végétaux. Il a pour conséquence de limiter l'efficacité de la circulation de sève brute par formation d'embolie dans les vaisseaux du xylème. Lorsqu'il y a formation de glace dans les tissus, les cellules vivantes peuvent également être lysées dans les organes lignifiés, et dans les bourgeons. Pour pallier cela, différents mécanismes de résistance sont développés pour limiter la formation d'embolie ou la résorber, pour augmenter transitoirement la tolérance à la formation de glace dans les tissus et pour éviter d'exposer les bourgeons et jeunes feuilles aux gels printaniers tardifs. Ces différents traits ont été caractérisés pour onze espèces communes ayant des limites altitudinales potentielles contrastées. Puis la physiologie de l'acclimatation au gel chez *Juglans regia* L. a été caractérisée, essentiellement à travers les relations entre humidité pondérale, contenu en sucres solubles, climat et levée de dormance. L'ensemble de ces données a permis d'élaborer un modèle prédictif de la résistance au gel en relation avec la physiologie de l'arbre qui pourrait, couplé avec d'autres modèles simulant la période estivale, permettre d'estimer la conjonction de différents stress sur le potentiel de résistance.

Mots clés : Acclimatation au froid, *Juglans regia* L., Humidité pondérale, Sucres solubles LT₅₀

Abstract

Frost is one of the major limiting constraints for plants causing embolism, living cell lysis and damages on buds during spring. Several processes are observed in trees in order to limit embolism or refill vessels, to increase frost resistance and to avoid freezing period for buds while bursting. Those different processes were monitored in eleven common species according to their potential altitudinal limit. And one was selected (*Juglans regia* L.) and physiology of acclimation was characterised through interaction between water content, soluble carbohydrate (which are the best explaining factors for frost resistance), climate and dormancy release. According to those data, a predicting model for frost hardiness was built related to physiology of acclimation. This kind of model would be useful related to a summer simulating model in order to estimate interaction between different stresses for frost hardiness potential.

Key Words : Frost Acclimation, *Juglans regia* L., Water content, Soluble Carbohydrate, LT₅₀