



**HAL**  
open science

**Etude de la variabilité génétique et de la plasticité  
phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez  
Fagus sylvatica L.**

Rémi Wortemann

► **To cite this version:**

Rémi Wortemann. Etude de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez *Fagus sylvatica* L.. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22205 . tel-00720995

**HAL Id: tel-00720995**

**<https://theses.hal.science/tel-00720995v1>**

Submitted on 26 Jul 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.

**Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie et  
Environnement**

N° d'ordre : 568

**Thèse**

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**Docteur d'université**

(Spécialité : Ecophysiologie végétale)

Soutenue le 16 décembre 2011

Rémi WORTEMANN

---

**Etude de la variabilité génétique et de la  
plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la  
cavitation chez *Fagus sylvatica* L.**

---

Président :

M. Thierry SIMONNEAU, Directeur de recherche INRA, UMR LEPSE INRA-Supagro,  
Montpellier.

Membres :

M. Hervé COCHARD, Directeur de recherche INRA, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand  
(Directeur de thèse).

Mme. Patricia ROECKEL-DREVET, Professeur d'université, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-  
Ferrand (Directeur de thèse).

M. Oliver BRENDEL, Chargé de recherche INRA, UMR EEF INRA-UHP, Nancy.

M. Stéphane HERBETTE, Maître de conférence, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand.

Rapporteurs :

M. Thierry SIMONNEAU, Directeur de recherche INRA, UMR LEPSE INRA-Supagro,  
Montpellier.

M. Pierre-Eric LAURI, Ingénieur de recherche INRA, UMR AGAP CIRAD-INRA-Supagro,  
Montpellier.



**Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie et  
Environnement**

N° d'ordre : 568

**Thèse**

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**Docteur d'université**

(Spécialité : Ecophysiologie végétale)

Soutenue le 16 décembre 2011

Rémi WORTEMANN

---

**Etude de la variabilité génétique et de la  
plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la  
cavitation chez *Fagus sylvatica* L.**

---

Président :

M. Thierry SIMONNEAU, Directeur de recherche INRA, UMR LEPSE INRA-Supagro,  
Montpellier.

Membres :

M. Hervé COCHARD, Directeur de recherche INRA, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand  
(Directeur de thèse).

Mme. Patricia ROECKEL-DREVET, Professeur d'université, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-  
Ferrand (Directeur de thèse).

M. Oliver BRENDEL, Chargé de recherche INRA, UMR EEF INRA-UHP, Nancy.

M. Stéphane HERBETTE, Maître de conférence, UMR PIAF INRA-UBP, Clermont-Ferrand.

Rapporteurs :

M. Thierry SIMONNEAU, Directeur de recherche INRA, UMR LEPSE INRA-Supagro,  
Montpellier.

M. Pierre-Eric LAURI, Ingénieur de recherche INRA, UMR AGAP CIRAD-INRA-Supagro,  
Montpellier.



## *Remerciements*

Trois ans déjà! Oui cela fait trois ans que cette belle aventure a commencé. Si ces années ont passées si vite c'est que je ne me suis «éclaté» aussi bien professionnellement qu'humainement. Pour cela je tiens à vous remercier.

En premier lieu, je remercie chaleureusement chacun des membres de l'UMR PIAF, les «INRA» pour m'avoir accueilli dans leurs locaux, pour nos discussions toujours intéressantes bien que parfois «farfelues», pour les bons moments autour d'un café et pour leur bonne humeur!

Merci aux Universitaires. J'ai apprécié leur accueil et leur joie de vivre lors de mes passages assez fréquents en période d'enseignement.

Je souhaite également remercier sincèrement mes directeurs de thèse, Hervé Cochard et Patricia Roeckel-Drevet ainsi que Stéphane Herbette, pour leur disponibilité, leurs conseils et corrections. Sans vous, ce travail n'aurait pas été aussi passionnant ni aussi enrichissant.

Je remercie aussi Christian Bodet et Pierre Conchon pour leur aide technique en laboratoire et Christophe Serre pour m'avoir accompagné lors des prélèvements dans des endroits pas forcément très exotiques (Espagne, Picardie... Surtout Picardie). Merci à vous trois pour ces cafés du matin où les débats rugbystiques et autres furent toujours très animés.

Je tiens également à témoigner ma reconnaissance à Thierry Simonneau, Pierre-Eric Lauri et Oliver Brendel pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Alexis Ducouso, Rémy Petit et Erwin Dreyer, Têtè Barigah et Boris Fumanal pour les discussions et conseils prodigués lors des comités de thèse.

Je n'oublie pas tous mes collègues thésards, voisins de bureau et amis de la place clermontoise : merci Alex, Matthieu, Renaud, Guillaume et Fabiano pour ces soirées passées entre les frères Berthom et le Puys de la Lune où la truffade est toujours aussi bonne, merci Noémie, Nico et Dominique amateurs de BD et/ou de bières (Chouffe, Chimay ou Kwak, qu'elle est la meilleure??), merci Boris pour les bonnes tranches de rigolades lors de soirées, merci David et Qian pour les invitations à des sessions «coup de pinceau» souvent suivies d'un bon barbecue, merci Matthieu, Fred et Jérôme pour toutes les balades au milieu des Volcans et merci à Adelin, collègue lorrain et amateur de foot, (c'est rare en ce pays de rugby) pour les soirées pizza bière foot!

Je n'oublie pas ceux qui ont toujours été là, les amis et la famille. Merci Jean-Marc, Tina, Christophe, Le Luc, Xav et Laetitia d'avoir fait 500 km pour venir me voir, chacune de vos visites étaient un grand plaisir. Merci Jean-Marc et Geoffrey de m'avoir hébergé à chaque fois que je venais à Nancy!

Enfin maman, papa, papi, mamie et soeurlette merci d'avoir toujours cru en moi dans les bons comme dans les moments plus difficiles. Sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui, merci!

## Résumé

Cette thèse visait à étudier la variabilité génétique et plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez le hêtre (*Fagus sylvatica* L.). A cette fin, nous avons tout d'abord testé les variations dues à la méthodologie de mesure de la vulnérabilité à la cavitation. Notre étude a montré que les variations de vulnérabilité à la cavitation au cours du temps sont faibles. Néanmoins, il est préférable d'éviter de récolter les échantillons durant le début de la période de formation du bois. Par ailleurs il est possible de conserver au frais les échantillons sans dégrader les mesures durant au moins un mois. Nos résultats montrent également que la vulnérabilité à la cavitation peut être variable aussi bien au sein d'un même arbre qu'entre populations *in situ*. Ensuite, nous avons voulu déterminer la part de plasticité phénotypique de la part de variabilité génétique dans la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Pour cela nous avons étudié 17 populations de hêtre venant de toute l'Europe et poussant dans une plantation comparative. Parmi les 17 populations 6 d'entre elles ont été étudiées dans trois plantations comparatives différentes (France, Espagne et Slovaquie). Nos résultats indiquent que chez le hêtre la vulnérabilité à la cavitation varie considérablement au sein de chaque population. Ils indiquent aussi que l'on observe peu de différenciation génétique entre populations. Les résultats montrent également que la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation est importante entre les plantations, et que le degré de cette plasticité peut varier d'une population à l'autre. Pour finir, nous avons regardé s'il existait des relations entre la vulnérabilité à la cavitation et des paramètres d'efficacité hydraulique ainsi qu'avec l'efficacité d'utilisation de l'eau. Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence des preuves d'un trade-off entre l'efficacité et la sûreté du xylème.

Mots clefs : *Fagus sylvatica* L., efficacité d'utilisation de l'eau, plantations comparatives, plasticité phénotypique, variabilité génétique, vulnérabilité à la cavitation

## Summary

This work aimed at studying the genetic variability and the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation in beech (*Fagus sylvatica* L.). We tested the variations due to the methodology of measuring vulnerability to cavitation. Our study showed that the variations in vulnerability to cavitation over time are low. However, it's better to avoid collecting samples during the period of initial wood formation. Furthermore it's possible to store samples without degrading measures for during one month. Our results also show that vulnerability to cavitation can be variable both within the same tree and between populations *in situ*. We determined the proportion of phenotypic plasticity and the proportion of genetic variability in the variability of vulnerability to cavitation. For this we studied 17 beech populations from all Europe and growing in a common garden. Among the 17 populations 6 of them have been studied in three different common gardens (France, Spain and Slovakia). Our results indicate that for beech, vulnerability to cavitation varies considerably within populations. They also indicate that there are few genetic differentiations between populations. The results show that the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation is important among common garden, and the degree of this plasticity can vary between populations. To complete our study, we looked at the relationships between vulnerability to cavitation and hydraulic efficiency parameters and with the water use efficiency. Our results do not reveal evidence of relationships vulnerability to cavitation and other physiological traits.

Keywords: common garden experiment, *Fagus sylvatica* L., genetic variability, hydraulic traits, phenotypic plasticity, vulnerability to cavitation, water use efficiency



# Sommaire

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	13
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	19
Le fonctionnement hydraulique de l'arbre .....	19
Les mécanismes de la montée de la sève .....	20
Les mécanismes de formation de l'embolie .....	22
<i>Contrainte mécanique</i> .....	22
<i>Contrainte thermique</i> .....	22
<i>Contrainte hydrique</i> .....	23
Détection et quantification de l'embolie .....	26
<i>Détection acoustique de la cavitation</i> .....	26
<i>Technique hydraulique de détection de la cavitation</i> .....	27
Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation .....	30
<i>Variabilité inter-spécifique</i> .....	30
<i>Variabilité intra-spécifique</i> .....	32
<i>Variabilité entre organes</i> .....	32
<i>Plasticité phénotypique</i> .....	33
Résorption de l'embolie .....	34
Objectifs de la thèse .....	35
<b>Méthodologies de mesures</b> .....	39
Les échantillons .....	39
Les différents sites de prélèvement .....	39
<i>Les sites français</i> .....	39
<i>Les plantations comparatives européennes</i> .....	40
Mesures de la vulnérabilité à la cavitation .....	43
<i>Le Cavitron</i> .....	43
<i>La courbe de vulnérabilité et P<sub>50</sub></i> .....	46
Analyses de la variabilité génétique .....	47
<i>Extraction de l'ADN</i> .....	47
<i>Diversité des ADN Chloroplastiques</i> .....	47
Mesures de l'efficacité de l'utilisation de l'eau intrinsèque (Wi) .....	49
Mesures anatomiques et efficacité hydraulique .....	50
<i>Préparation des échantillons</i> .....	50
<i>Efficacité hydraulique</i> .....	51
Densité du bois .....	52
Analyses statistiques .....	52
<b>Résultats</b> .....	55
1 <sup>ère</sup> partie : Sources de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation .....	55
<i>Effet de l'âge et de la durée de conservation des échantillons</i> .....	55
<i>Variation phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation</i> .....	57
<i>Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation entre des populations le long d'un gradient altitudinal et d'un gradient latitudinal</i> .....	59
<i>Discussion</i> .....	61
2 <sup>nde</sup> partie : Variabilité génétique et plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation .....	67
<i>La variabilité génétique neutre</i> .....	67
<i>Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation du xylème au sein et entre populations</i> .....	67
<i>Plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation du xylème</i> .....	68
<i>Discussion</i> .....	70

3 <sup>ème</sup> partie : Relations entre vulnérabilité à la cavitation et d'autres traits physiologiques .	77
<i>Variations des différents traits</i> .....	80
<i>Relations entre les différents traits</i> .....	80
<i>Discussion</i> .....	81
<b><i>Conclusions et perspectives</i></b> .....	89
<b><i>Bibliographie</i></b> .....	95

## Liste des principales abréviations

$\alpha$  : Angle de contact entre l'eau et a paroi  
 $\Delta$  : Discrimination isotopique  
 $\delta^{13}\text{C}$  : Composition isotopique  
 $\delta_{\text{air}}$  : Composition isotopique de l'air  
 $\Delta\text{c}$  : Discrimination isotopique du carbone lors de la carboxylation  
 $\Delta\text{P}$  : Différence de pression positive  
 $\delta_{\text{plante}}$  : Composition isotopique de la plante  
 $\Delta\text{s}$  : Discrimination isotopique du carbone dans la cavité sous stomatique  
 $\eta$  : Viscosité de l'eau à 20°C  
 $\rho$  : Densité de l'eau à 20°C  
 $\rho_{\text{bois}}$  : Densité du bois  
 $\tau$  : Tension superficielle de l'eau  
 $\omega$  : Vitesse angulaire  
**A** : Assimilation nette de CO<sub>2</sub>  
**a** : Petit diamètre du vaisseau  
**A<sub>image</sub>** : Aire de l'image analysée  
**b** : Grand diamètre du vaisseau  
**Ca** : Concentration en dioxyde de carbone dans l'air  
**CV** : Coefficient de variation  
**d** : Diamètre du vaisseau  
**Dh** : Diamètre hydraulique  
**d<sub>moy</sub>** : Diamètre moyen des vaisseaux  
**F** : Flux traversant une branche  
**g<sub>s</sub>** : Conductance stomatique  
**K** : Conductance hydraulique  
**K<sub>0</sub>** : Conductance hydraulique initiale  
**K<sub>i</sub>** : Conductance initiale  
**K<sub>max</sub>** : Conductance maximale  
**K<sub>s</sub>** : Conductance hydraulique spécifique  
**n** : Nombre de vaisseaux de l'échantillon  
**n<sub>v</sub>** : Densité de vaisseaux  
**P** : Pression au centre de l'échantillon  
**P<sub>12</sub>** : Pression induisant 12% de perte de conductivité  
**P<sub>50</sub>** : Pression induisant 50% de perte de conductivité  
**P<sub>88</sub>** : Pression induisant 88% de perte de conductivité  
**P<sub>atm</sub>** : Pression atmosphérique  
**PCR** : Amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)  
**P<sub>crit</sub>** : Seuil critique  
**PLC** : Pourcentage de perte de conductivité (Percent Loss of Conductance)  
**P<sub>xyl</sub>** : Pression xylémienne  
**r** : Différence de niveau d'eau entre les deux cuves  
**R** : Distance entre l'axe de rotation et la cuve  
**Ri** : Rapport isotopique  
**s** : Aire de la section d'eau dans le réservoir  
**S** : Pente de la courbe de vulnérabilité  
**Wi** : Efficience d'utilisation de l'eau

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation des sites d'études exploités en France .....	40
Tableau 2 : Caractéristiques des 3 sites ainsi que des 17 populations de hêtre.....	42
Tableau 3 : Séquences et tailles des amorces utilisées pour l'étude génétique.....	48
Tableau 4 : ANOVA à deux facteurs de la vulnérabilité à la cavitation des six populations des trois plantations .....	68
Tableau 5 : Liste des paramètres étudiés.....	79
Tableau 6 : Variations observées entre populations et au sein des populations.....	79
Tableau 7 : Matrice de corrélation entre les différents traits testés ( $P_{50}$ , $\Delta$ , $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks).....	80

## Liste des figures

Figure 1 : Modélisation de l'aire de répartition du hêtre en France .....	15
Figure 2 : Voies de circulation de l'eau dans l'arbre .....	21
Figure 3 : Mécanisme de cavitation des vaisseaux du xylème selon l'hypothèse du « gere d'air » .....	25
Figure 4 : Chambre à pression de Scholander.....	29
Figure 5 : « Cavitron » .....	29
Figure 6 : Classement des espèces d'arbres en fonction du $P_{50}$ .....	31
Figure 7 : Carte de distribution du hêtre d'après EUFORGEN 2009 .....	41
Figure 8 : Dessin à l'échelle du rotor utilisé dans le « Cavitron » .....	45
Figure 9 : Courbe de vulnérabilité d'un hêtre .....	46
Figure 10 : Coupe d'une section de branche de hêtre .....	51
Figure 11 : Effet de l'âge de la tige et du temps de conservation des échantillons .....	56
Figure 12 : Résistance à la cavitation de branches d'ombre et de branches de lumière .....	57
Figure 13 : Suivi de la vulnérabilité à la cavitation au cours du temps pour deux arbres.....	58
Figure 14 : Résistance à la cavitation de populations de hêtres distribuées le long d'un gradient latitudinal.....	59
Figure 15 : Résistance à la cavitation des populations de hêtres des faces nord et sud du Mont Ventoux le long d'un gradient altitudinal .....	60
Figure 16 : $P_{50}$ moyen de chacune des 17 populations.....	69
Figure 17 : Moyennes de $P_{50}$ par population et par plantation .....	69
Figure 18 : Modèle conceptuel des relations entre les différents paramètres ( $P_{50}$ , $\Delta$ , $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks).....	79
Figure 19 : Modèle conceptuel des relations entre les différents paramètres testés à l'échelle intra-spécifique ( $P_{50}$ , $\Delta$ , $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks) .....	86

## Liste des annexes

Annexe 1 : Protocole d'isolement de l'ADN de bois d'après Novaes <i>et al.</i> (2009) .....	107
Annexe 2 : Mode opératoire de la plate-forme GENTYANE.....	108
Annexe 3 : Protocole de coloration des tissus végétaux .....	111
Annexe 4 : Protocole de mesure de la densité du bois .....	112



# Introduction générale



## ***Introduction générale***

Le contexte des changements globaux soulève de nombreuses interrogations. Les experts du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) prédisent des modifications climatiques, en particulier une accentuation du nombre et de l'intensité des événements de sécheresse extrême. Cela pose des questions quant à la capacité de la flore européenne à s'acclimater ou à s'adapter à ces modifications climatiques. Des modèles d'aire de répartition des espèces végétales, existent et prédisent la modification de ces aires en lien avec les changements climatiques.

C'est le cas pour *Fagus sylvatica L.* qui est l'espèce modèle pour cette thèse. En effet Badeau *et al.* (2008) ont modélisé l'aire de répartition potentielle du hêtre en France suite aux changements climatiques (figure 1). Il apparaît que ces changements climatiques vont avoir un impact important sur son aire de répartition : en 2100 le hêtre ne se retrouvera plus que dans le Nord et le Nord Est de la France ainsi qu'au dessus de 1000 m d'altitude.

Le temps de révolution pour une hêtraie est de 70 à 90 ans (Office National des Forêts, communication personnelle). En gestion forestière, une révolution est le temps nécessaire pour passer du stade régénération (semis) au stade futaie adulte. Les hêtres plantés ou semés aujourd'hui ne seront donc exploités que dans 90 ans. Aujourd'hui ces arbres sont plantés dans leur aire de distribution, mais dans 50 ans ces arbres vont se trouver dans des conditions environnementales qui leur seront défavorables, ce qui engendrera une perte de productivité, voir la mort des arbres. Ce problème de productivité ne sera pas restreint à la France, le hêtre étant une des espèces constitutives des forêts tempérées d'Europe. Son aire de répartition actuelle s'étend du sud de l'Italie au sud de la Suède, et de l'ouest de la France à l'ouest de l'Ukraine. D'un point de vue économique, c'est une essence importante. Son bois est aussi bien utilisé en menuiserie, pour du chauffage ou pour produire de la pâte à papier. Cette essence est principalement exploitée en France, en Allemagne et en Roumanie. En France, selon l'IFN (Inventaire forestier national), le hêtre est la troisième essence en terme de superficie des forêts dédiées à la production de bois. D'après les données 2008 de l'IFN, le hêtre recouvre 1390 milles hectares, c'est moins que le chêne pédonculé et le chêne sessile, mais plus que le pin maritime (1850, 1690 et 1100 milliers d'ha respectivement). Sa production annuelle est de 8.4 millions de m<sup>3</sup> en France (IFN, 2008).

Les modèles de changement d'aire de répartition sont importants pour les forestiers pour prévoir la gestion future des forêts. Mais ces modèles reposent essentiellement sur des données climatiques et ne prennent pas en compte l'écophysiologie des espèces, ni l'effet de l'environnement ou de la variabilité génétique sur la physiologie de l'arbre. Il paraît donc important de s'intéresser à l'écophysiologie des espèces afin de compléter les informations fournies par les modèles prédictifs. Il faut donc s'intéresser aux traits physiologiques impliqués dans la résistance à la sécheresse des espèces. Rose *et al.* (2009) se sont par exemple intéressés au ratio entre la masse racinaire et la masse de tige. Ils ont montré chez le hêtre que les arbres les plus adaptés à la sécheresse étaient ceux dont le ratio masse de racine sur masse de tige est important. Li & Wang (2003) ont étudié l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE), et ont montré que des populations d'*Eucalyptus microtheca* F. Muell. adoptaient différentes stratégies en terme de WUE lorsque la disponibilité en eau est faible. Maherali *et al.* (2004) ont étudié la vulnérabilité à la cavitation de 14 espèces d'arbres et ont observé que les arbres les moins vulnérables à la cavitation sont les plus résistants à la sécheresse. D'après Maherali *et al.* (2004) avoir une grande résistance à la cavitation est un élément clef de la tolérance à la sécheresse. D'autres études portant sur la vulnérabilité à la cavitation ont également indiqué que la vulnérabilité à la cavitation serait un trait physiologique important dans la résistance à la sécheresse des arbres (Bréda *et al.*, 2006 ; Cochard *et al.*, 2008 ; Brodribb & Cochard, 2009). Toutes ces études portent sur des comparaisons entre espèces. A ce jour, il existe peu d'information concernant la vulnérabilité à la cavitation à l'échelle intra-spécifique. S'il existe une variabilité de la vulnérabilité à la cavitation à l'échelle intra-spécifique, on peut se demander si les arbres les moins vulnérables à la cavitation au sein d'une espèce sont aussi les plus résistants à la sécheresse. Si c'est le cas, cette information sera importante pour les forestiers qui pourront alors disposer d'un critère pertinent pour sélectionner des arbres résistants à la sécheresse afin d'assurer la pérennité des forêts face aux changements globaux. C'est pourquoi cette thèse porte sur l'étude de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation de *Fagus sylvatica* L..

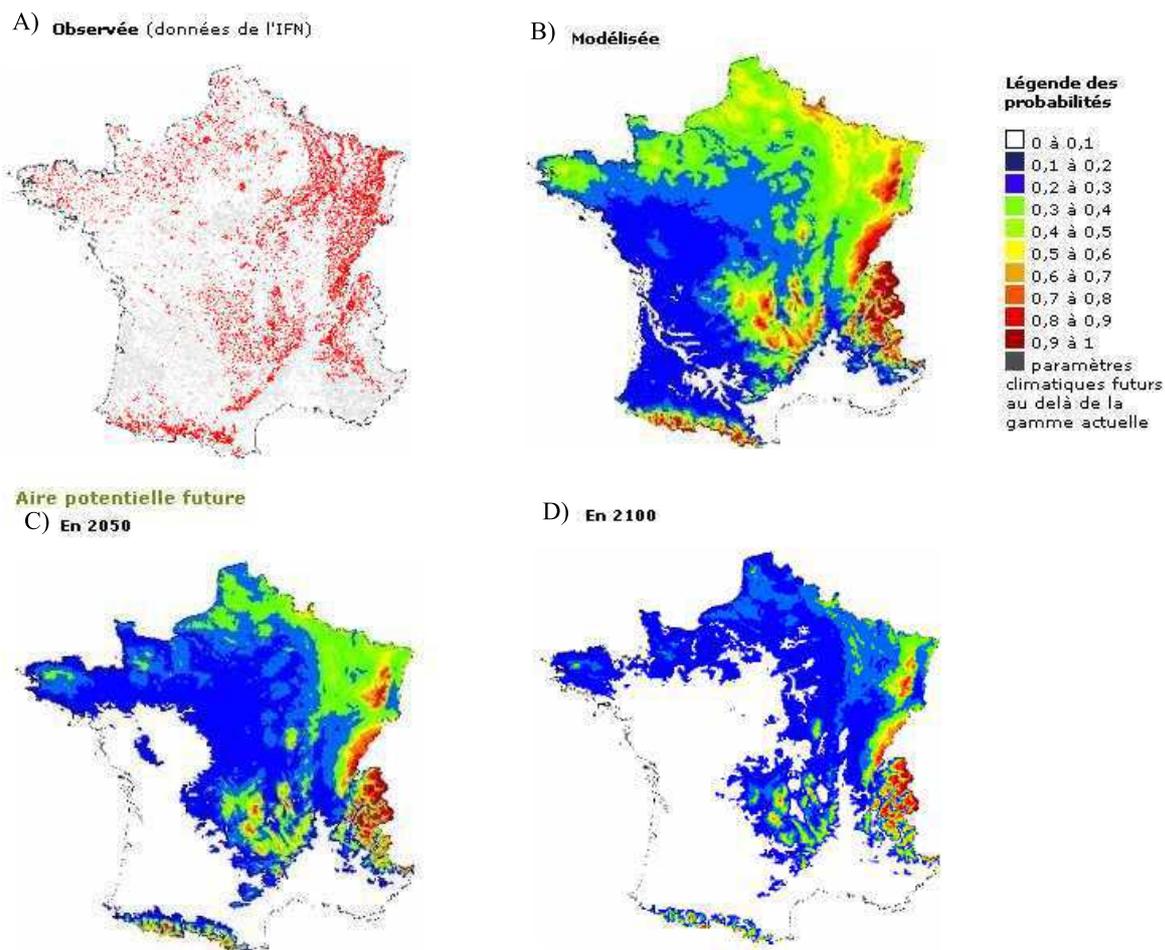


Figure 1 : (A), carte de répartition du hêtre en France à partir de données IFN. (B), modélisation de l'aire de répartition du hêtre en France, à partir des déficits hydriques des mois de juin et juillet et de la température maximale du mois d'octobre. (C) et (D), modélisation de l'aire de répartition potentielle du hêtre en France en 2050 et 2100. Ces cartes ont été produites par Badeaux *et al.* de l'UMR EEF de l'INRA de Nancy (2008). ([http://www.nancy.inra.fr/la science et vous/dossiers scientifiques/rechauffement climatique et forets francaises/le hetre](http://www.nancy.inra.fr/la_sciences_et_vous/dossiers_scientifiques/rechauffement_climatique_et_forets_francaises/le_hetre))



# Synthèse bibliographique



# ***Synthèse bibliographique***

## Le fonctionnement hydraulique de l'arbre

L'eau est un élément indispensable à la survie et au bon fonctionnement des êtres vivants et les arbres ne dérogent pas à cette règle, ils ont un besoin important en eau. Les arbres ne pouvant pas se déplacer d'un point d'eau à un autre comme les animaux, ils doivent donc puiser l'eau nécessaire directement dans le sol où ils sont ancrés, grâce à leurs racines. L'eau une fois extraite du sol doit être acheminée des racines à l'appareil aérien de l'arbre. Ce flux vertical d'eau, appelé flux de sève brute est essentiel. Il permet d'alimenter en eau tous les tissus. Les pertes en eau au niveau des parties aériennes sont inévitables car la teneur en eau de l'air est généralement bien inférieure à la teneur en eau des cellules. L'eau a donc tendance à quitter les cellules par évaporation ce qui pourrait engendrer la déshydratation de ces dernières. Il est donc fondamental pour la plante de maintenir un apport en eau suffisant pour compenser les pertes. Les végétaux ont d'ailleurs développé des tissus limitant remarquablement la diffusion des molécules d'eau. On retrouve ces tissus dans toutes les parties de la plante en contact avec l'air, il s'agit de l'écorce des tiges et de l'épiderme cireux que l'on trouve sur la surface des feuilles. Les pertes en eau peuvent engendrer un arrêt de croissance de la plante et, dans les cas extrêmes, la mort de la plante. Ces pertes en eau sont paradoxalement indispensables au bon fonctionnement du végétal. En effet elles permettent la régulation thermique de la plante. Le rayonnement du soleil va augmenter la température des feuilles. La vaporisation de l'eau permet à la plante de conserver une température n'affectant pas son fonctionnement. L'eau est également nécessaire à la production de sucres lors de la photosynthèse. La photosynthèse utilise l'énergie lumineuse pour convertir le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'eau en sucres. La photosynthèse a lieu dans les feuilles, et plus exactement dans les chloroplastes des cellules foliaires. La première étape de la photosynthèse utilise l'énergie lumineuse et l'eau pour produire de l'énergie chimique sous forme d'ATP et de NADPH, ainsi que du dioxygène comme sous produit. La deuxième étape de la photosynthèse correspond au cycle de Calvin, durant lequel des sucres sont synthétisés à partir de l'ATP, du NADPH et du  $\text{CO}_2$  de l'air. La photosynthèse nécessite un échange gazeux entre la plante et l'air. C'est au niveau des stomates qu'ont lieu les échanges gazeux. Un stomate est composé de deux cellules de garde qui délimitent l'orifice stomatique. La plante est capable de moduler

l'ouverture et la fermeture de cet orifice. Un flux de CO<sub>2</sub> entrant dans la plante est obligatoirement accompagné d'un flux sortant d'eau et d'O<sub>2</sub> issu de la photosynthèse. La plante doit donc trouver un compromis entre l'absorption du CO<sub>2</sub> nécessaire à la production de sucres et les pertes en eau, qui, si elles sont trop importantes peuvent engendrer une limitation de la croissance de la plante et, si elles sont extrêmes, peuvent entraîner la mort de la plante. En plus de ces fonctions hydriques, le flux de sève brute permet d'apporter aux parties aériennes certains minéraux ou substances provenant du sol ou des racines. Le flux de sève brute est essentiel à la survie des végétaux, et doit être particulièrement efficace. Chez les arbres l'eau est parfois acheminée à des hauteurs supérieures à 100m ce qui fait du système hydraulique des arbres un des systèmes les plus performants.

## Les mécanismes de la montée de la sève

La théorie de “ Tension-Cohésion ” (Dixon, 1914 ; Zimmermann, 1982 ; Cruiziat et Tyree, 1990) est encore aujourd'hui considérée comme étant la meilleure explication du mécanisme d'ascension de la sève. Ce sont la cohésion des molécules d'eau et les tensions qui se développent dans la sève qui sont à l'origine du nom de cette théorie, la cohésion des molécules d'eau entre elles étant assurée par des liaisons hydrogènes.

Le tissu conducteur de sève est formé de vaisseaux, de fibres, de trachéides et de parenchyme. Ce sont les vaisseaux qui assurent le flux de sève brute. Les vaisseaux sont des structures multicellulaires, constituées d'un empilement d'éléments de vaisseaux. La structure des vaisseaux peut être assimilée à un capillaire rigide, mais limité à chaque extrémité par des parois transversales perforées. Le passage de sève de vaisseaux à vaisseaux s'effectue au travers de la paroi via des structures spécialisées : les ponctuations. Ces ponctuations sont des pores dont le diamètre varie de quelques nanomètres à plusieurs centaines de micromètres (Choat *et al.*, 2008) qui tapissent les cloisons des vaisseaux permettant le passage de la sève brute. Les vaisseaux permettent d'amener l'eau des racines, responsables de l'absorption, jusqu'aux feuilles, lieu de la transpiration, sans interrompre la colonne d'eau, c'est ce qu'on appelle le continuum sol-plante-atmosphère (Figure 2).

Impossibilité d'obtenir les droits d'auteurs, pour avoir la figure suivre le lien :

[http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09\\_10.html](http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_10.html)

Figure 2 : Voies de circulation de l'eau dans un arbre. L'eau est absorbée du sol au niveau des racines, puis monte verticalement à travers le xylème des racines aux feuilles. Enfin l'eau quitte les feuilles par les stomates.

La transpiration est à l'origine des forces de tension permettant l'ascension de la sève dans l'arbre. Les cellules de la cavité sous-stomatique ont des parois nano-poreuses permettant la formation de ménisques air-eau de quelques nanomètres de diamètre, qui sont l'interface entre la phase liquide et la phase gazeuse. La vaporisation de l'eau au niveau des ménisques génère des tensions capillaires qui entraînent une diminution du potentiel hydrique de l'eau dans les régions adjacentes. Ces tensions sont transmises au reste de la colonne d'eau jusqu'aux sites d'absorption de l'eau dans les racines. Les zones proches du lieu de la vaporisation de l'eau fonctionnent donc à des potentiels hydriques plus faibles que les zones proches des racines, un gradient de potentiels hydriques est ainsi généré. Il est responsable du sens et de l'intensité du flux de sève brute.

Les tensions présentes dans les conduits étant très importantes, l'eau liquide s'y trouvant est dans un état métastable, et peut évoluer à tout moment vers une phase gazeuse plus stable. Ce changement brusque de phase constitue le phénomène de cavitation. Quand ce phénomène a lieu, le vaisseau se vide de son eau et se remplit de vapeur d'eau. De l'air va ensuite diffuser dans le conduit, jusqu'à ce que l'air soit à pression atmosphérique. Le vaisseau n'est alors plus fonctionnel et ne véhicule plus de sève, la colonne d'eau étant

rompue. L'efficacité du transport de l'eau des racines vers les feuilles est altérée. Si tous les conduits sont amenés à caviter, il n'y aura plus d'alimentation en eau des parties aériennes ce qui compromettra leur intégrité.

## Les mécanismes de formation de l'embolie

Ce paragraphe traite des différents mécanismes de formation de l'embolie. Il traite aussi bien de l'embolie hivernale que de l'embolie estivale. Dans le reste du manuscrit seule l'embolie estivale sera présentée car c'est cet aspect qui a été abordé au cours de cette thèse.

### *Contrainte mécanique*

C'est le mécanisme de formation de l'embolie le plus simple. L'embolie est créée par une blessure occasionnée aux vaisseaux conducteurs. Les vaisseaux endommagés n'étant plus intègres, ils se vident de leur sève et ne sont donc plus conducteurs. Les sources de blessures sont variées : pique et morsure d'insectes herbivores ou xylophages, dommages liés au vent, etc. Il est donc très probable de trouver un certain nombre de conduits embolisés dans les feuilles et les tiges sans que la contrainte hydrique soit importante.

### *Contrainte thermique*

La cavitation peut être induite par les cycles de gel-dégel hivernaux. C'est un phénomène annuel qui touche la plupart des arbres feuillus des régions tempérées. Cette embolie résulte de l'alternance de gel et de dégel pendant la période durant laquelle l'arbre est dépourvu de feuille (Cochard et Tyree, 1990). Lors de températures négatives, la sève gèle, les gaz dissous qu'elle contient sont expulsés, les gaz étant peu solubles dans la glace, et forment des bulles dans les vaisseaux. Lors du dégel, ces bulles se dissolvent à nouveau dans la sève ou, lorsqu'elles sont trop volumineuses, obstruent le vaisseau (Sperry, 1993). Plus les bulles de gaz sont volumineuses, moins elles se dissolvent. Le diamètre des vaisseaux conducteurs conditionne la cavitation liée aux cycles gel-dégel. En effet, plus les vaisseaux ont un

diamètre important, plus les bulles de gaz se formant lors des gels peuvent être volumineuses, rendant l'embolie plus probable (Cruziat *et al.* 2002 ; Tyree & Zimmermann 2002).

### *Contrainte hydrique*

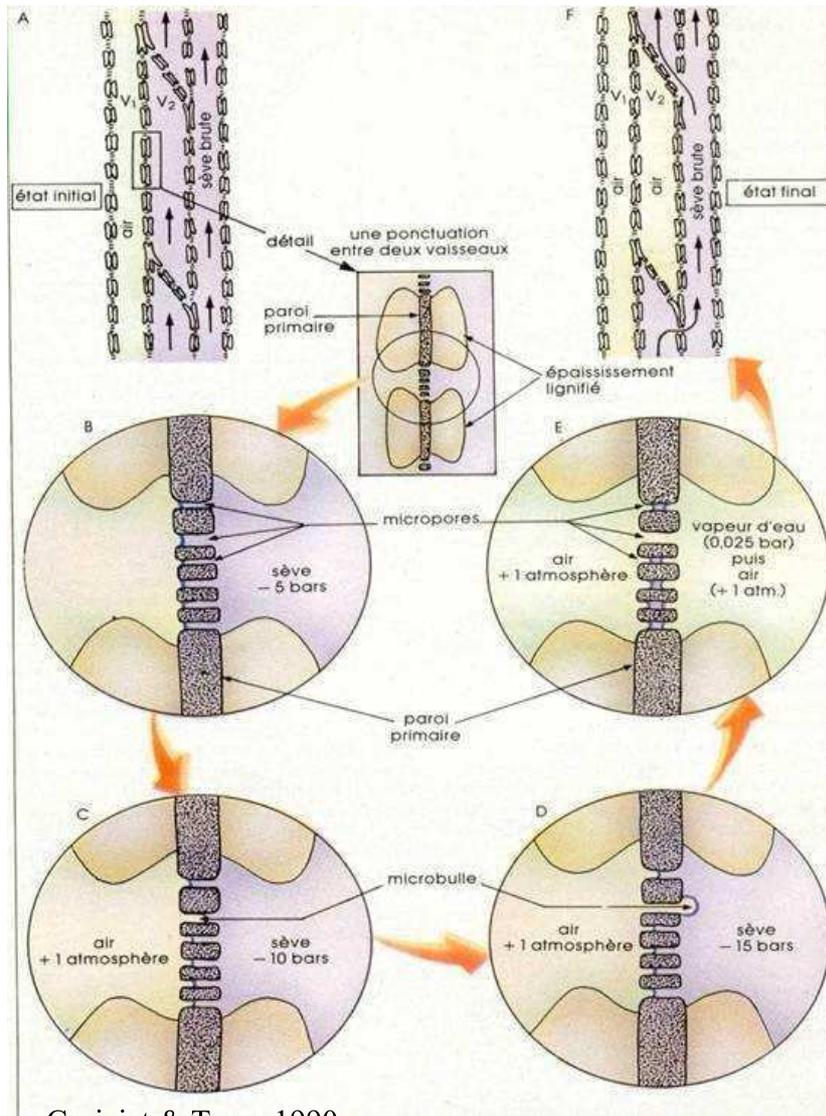
Plusieurs mécanismes sont en théorie susceptibles de provoquer la rupture d'une colonne d'eau sous tension (Pickman 1981 ; Cochard 2006). Deux hypothèses sont possibles. La première est la nucléation homogène, qui est liée à une rupture spontanée des liaisons entre les molécules d'eau au sein même des conduits. Cette première hypothèse de la nucléation homogène est généralement écartée. Pour qu'il y ait rupture spontanée des liaisons entre molécules d'eau, il est nécessaire que les valeurs de tensions soient très fortes ( $< -50$  MPa) (Cochard 2006). Or ce sont des tensions bien supérieures aux tensions extrêmes que l'on a pu observer chez les plantes.

La deuxième hypothèse, la nucléation hétérogène, est liée à une perte d'adhésion au niveau de la paroi des conduits. Cette perte d'adhésion s'expliquerait par la présence de microscopiques bulles d'air dans les fissures hydrophobiques des parois des conduits. Mais le mécanisme le plus probable aujourd'hui et qui est largement accepté par la communauté scientifique est la théorie du « germe d'air » proposée par Zimmermann (1983). Cette théorie suggère que la rupture de la colonne d'eau serait causée par le passage d'une bulle d'air d'un vaisseau embolisé vers un vaisseau fonctionnel à travers un pore (10 à 100 nm) de la paroi des conduits. Pour que le phénomène se produise, il faut qu'il y ait déjà des vaisseaux embolisés, ce qui est le cas. Ces vaisseaux déjà embolisés résultent soit d'une contrainte mécanique soit d'une embolie hivernale qui n'a pas été résorbée. La théorie du « germe d'air » s'apparente au mécanisme de rupture capillaire d'un ménisque air-eau situé à l'interface entre deux conduits. On part d'un état initial où un vaisseau V1 est embolisé et à pression atmosphérique ( $P_{atm}$ ), et d'un vaisseau V2 fonctionnel rempli de sève à pression xylémienne ( $P_{xyl}$ ) (Figure 3). Les forces capillaires au niveau du ménisque air-eau empêchent l'aspiration de la bulle d'air. Lors d'un épisode de sécheresse par exemple, la transpiration va augmenter et l'appel d'eau donc la tension dans les conduits aussi. La différence de pression entre les deux conduits va augmenter jusqu'à un seuil critique ( $\Delta P_{crit}$ ) supérieur aux forces capillaires (Figure 3). A la rupture du ménisque air-eau une bulle va se former et envahir tout l'espace de l'élément conducteur V2, qui va se trouver rempli d'air à pression atmosphérique

et ne sera donc plus fonctionnel. La rupture du ménisque peut être formalisée par l'équation suivante (Sperry & Tyree, 1988 ; Tyree & Sperry, 1989) :

$$\Delta P_{\text{crit}} = P_{\text{atm}} - P_{\text{xyl}} = (4\tau \cos\alpha)/d \quad (1)$$

où  $\tau$  est la tension superficielle de l'eau ( $\text{N m}^{-1}$ ),  $d$  le diamètre du pore (m), et  $\alpha$  l'angle de contact entre l'eau et la paroi.  $\alpha$  est généralement considéré comme nul ( $\cos\alpha = 1$ ), la paroi étant hydrophile. La tension superficielle de l'eau et la pression atmosphérique sont également considérées comme étant constantes. Au regard de l'équation (1) il apparaît que la tension xylémienne ( $P_{\text{xyl}}$ ) entraînant une rupture du ménisque air-eau est dépendante de la taille du pore. Cela signifie que plus le diamètre du pore sera important, plus la tension xylémienne nécessaire à l'aspiration de la bulle d'air sera faible et donc les risques d'embolie seront plus élevés. Ainsi, ce n'est pas la taille des vaisseaux qui conditionne l'embolie estivale, mais plutôt l'infrastructure des parois primaires des ponctuations. Certains auteurs ont émis une hypothèse pour expliquer la relation entre la vulnérabilité à la cavitation et la structure des ponctuations (Choat *et al.*, 2003, 2004 ; Wheeler *et al.*, 2005 ; Hacke *et al.*, 2006 ; Christman *et al.*, 2009 ; Hacke *et al.*, 2009). C'est l'hypothèse du « germe rare » (« the rare pit hypothesis »), elle est basée sur l'observation que le seuil critique de cavitation dépend de la présence de pores de grande taille très rares au sein de la membrane des ponctuations, et non pas de la porosité moyenne des ponctuations (Sperry & Hacke, 2004 ; Wheeler *et al.*, 2005). Plus la taille des vaisseaux est importante plus la surface allouée aux ponctuations l'est, ce qui augmente la probabilité d'avoir un pore de grande taille ainsi que le risque de cavitation (Wheeler *et al.*, 2005).



Cruziat & Tyree 1990

Figure 3 : Mécanisme de cavitation des vaisseaux du xylème selon l'hypothèse du « germe d'air ». A) Modèle structural des vaisseaux du xylème. Le vaisseau V1 est plein d'air à pression atmosphérique et le vaisseau V2 est fonctionnel et rempli de sève sous tension. B,C, D et E) sont des grossissements de la zone des ponctuations montrant les étapes du passage d'air entre deux vaisseaux. F) est le modèle structural des vaisseaux du xylème montrant les vaisseaux V1 et V2 remplis d'air.

## Détection et quantification de l'embolie

Dans ce paragraphe sont décrites succinctement les différentes méthodes de mesures utilisables pour mesurer et quantifier l'embolie estivale. Il existe des techniques acoustiques et des techniques dites hydrauliques. La technique utilisée pour le travail de thèse fait partie de cette dernière catégorie et sera décrite plus précisément dans le paragraphe « méthodologies de mesures ».

### *Détection acoustique de la cavitation*

Milburn (1966) utilisa le premier les émissions acoustiques pour étudier les phénomènes de cavitation chez les plantes. La cavitation d'un vaisseau s'accompagne d'une forte libération d'énergie. Une grande partie de cette énergie est produite sous forme d'émissions acoustiques. Ces émissions acoustiques couvrent un large spectre de fréquences, de l'audible à l'ultrasonique. L'utilisation du domaine ultrasonique (Tyree & Dixon, 1983) a facilité l'expérimentation. Cette méthode est attrayante puisqu'elle est non destructrice, très peu perturbatrice et simple à mettre en place. Un des pré-requis de base de la méthode acoustique de détection de phénomènes de cavitation est qu'il existe une corrélation entre les événements acoustiques et la cavitation. Il faut de plus que ces événements acoustiques soient corrélés à la cavitation des conduits conducteurs de sève. Chez les conifères, la majorité des émissions acoustiques sont corrélées à la cavitation de trachéides qui assurent la conduction de la sève. Par ailleurs ces trachéides sont de dimensions comparables dans le tissu conducteur, et ont donc toutes la même importance dans la conduction totale du tissu. Par contre, chez les angiospermes, les vaisseaux de xylème sont souvent accompagnés de fibres ou d'autres cellules non conductrices de sève. Il est, à l'heure actuelle, difficile de différencier le phénomène acoustique produit par une cellule non conductrice de celui produit par une cellule conductrice de sève. Cette technique est donc très peu utilisée pour étudier les angiospermes. Dans ce travail de thèse portant sur le hêtre, la méthode acoustique n'a pas été utilisée.

## *Technique hydraulique de détection de la cavitation*

Pour la mise en œuvre de la technique hydraulique, on se base sur un constat : l'embolie entraîne une perte de fonctionnalité des vaisseaux et donc une baisse de conductance hydraulique. Le principe de la technique consiste donc à mesurer la conductance hydraulique initiale ( $k_i$ ) d'un segment de xylème et à la comparer à la conductance hydraulique du même segment après re-saturation ( $k_{max}$ ) complète de ce dernier. Pour résorber totalement l'embolie le segment est perfusé à plusieurs reprises sous haute pression (0.1, 0.2 MPa). On peut alors exprimer l'embolie par un pourcentage de perte de conductance (PLC, Percent Loss of Conductance) comme suit :

$$PLC = (1 - k_i / k_{max}) \times 100 \quad (2)$$

La PLC nous donne une information sur le taux d'embolie d'un segment de xylème à un instant  $t$  dans des conditions données. Il est donc difficile de comparer deux segments entre eux. Les courbes de vulnérabilité à la cavitation vont nous permettre d'estimer la vulnérabilité à la cavitation de chaque segment et de les comparer. La courbe de vulnérabilité représente la PLC (%) en fonction de la tension xylémienne (MPa). Pour construire cette courbe, il est nécessaire de mesurer une PLC pour chaque valeur de tension xylémienne. Il existe différentes techniques pour établir ces courbes de vulnérabilité. La plus ancienne (Sperry *et al.*, 1988) est la technique de déshydratation qui consiste à laisser des branches se déshydrater jusqu'à une valeur de tension xylémienne donnée, et à mesurer ensuite la PLC. On répète la procédure avec d'autres branches déshydratées à différentes tensions xylémiennes pour tracer une courbe. Cette technique est donc simple à mettre en place mais présente deux inconvénients. Elle nécessite un grand nombre d'échantillons et est coûteuse en temps.

Cochard *et al.* (1992) ont développé une méthode d'établissement des courbes de vulnérabilité. Il n'est plus nécessaire d'attendre que les branches se déshydratent par évapotranspiration. Les branches sont placées dans une chambre à pression de Scholander (Figure 4) et on leur applique une pression pneumatique précise pour atteindre le degré de déshydratation souhaité. On mesure ensuite la PLC de la branche. On répète l'opération sur différentes branches à différentes pressions pour obtenir de nouveaux points de la courbe de vulnérabilité. Cette technique est également simple à mettre en place, et plus rapide que la méthode de déshydratation, mais nécessite encore un grand nombre d'échantillons.

Une nouvelle technique, le « cavitron » (Figure 5), a été développée au laboratoire (Cochard, 2002 ; Cochard 2005). Cette méthode est adaptée de celle d'Alder *et al.* (1997) et utilise la force centrifuge pour créer des tensions au sein de l'échantillon. Il est ainsi possible de réaliser une courbe de vulnérabilité à partir d'une seule branche et de la réaliser en moins d'une heure. Cette technique a été utilisée pour ce travail de thèse car elle permet de faire des analyses à grande échelle. Elle est décrite précisément dans le paragraphe méthodologies des mesures. Li *et al.* (2008) ont comparé la technique du « Cavitron » aux méthodes standards sur 10 espèces différentes (2 conifères, 4 espèces à pores diffus et 4 espèces à zone initiale poreuse). Pour ces 10 espèces présentant des anatomies du xylème très variées, la méthode par centrifugation donne en général des courbes de vulnérabilités similaires à la méthode standard. Néanmoins, pour 3 espèces sur 10, il y a de petites différences de l'ordre de 10% entre les deux méthodes. Li *et al.* (2008) expliquent ces différences par le fait que dans l'une des méthodes la conductivité est mesurée sous tension (cavitron), alors que dans l'autre la conductivité est mesurée sous pression. Cochard *et al.* (2010) ne sont pas d'accord avec ces conclusions. Ils ont comparé la méthode standard (Sperry *et al.* 1988) à celle du « cavitron » chez 4 espèces différentes (un résineux, deux espèces à pore diffus et une espèce à zone initiale poreuse). Au contraire de Li *et al.* (2008), Cochard *et al.* (2010) montrent qu'il existe des différences significatives entre les deux techniques de mesure pour les espèces ayant les vaisseaux les plus longs (*Prunus* et *Quercus*). Les courbes obtenues à l'aide du cavitron chez le chêne, qui présente de très longs vaisseaux ( $1.34 \text{ m} \pm 0.38\text{m}$ ), sont très différentes de celles obtenues par la méthode standard. D'après Cochard *et al.* (2010) la technique de centrifugation est utilisable à la condition que la longueur des vaisseaux soit inférieure à celle de la branche placée dans le cavitron. Ainsi, l'utilisation de cette technique sur les espèces à zone initiale poreuse est à proscrire.



Figure 4 : Chambre à pression de Scholander (Photo : Noémie Gaudio)

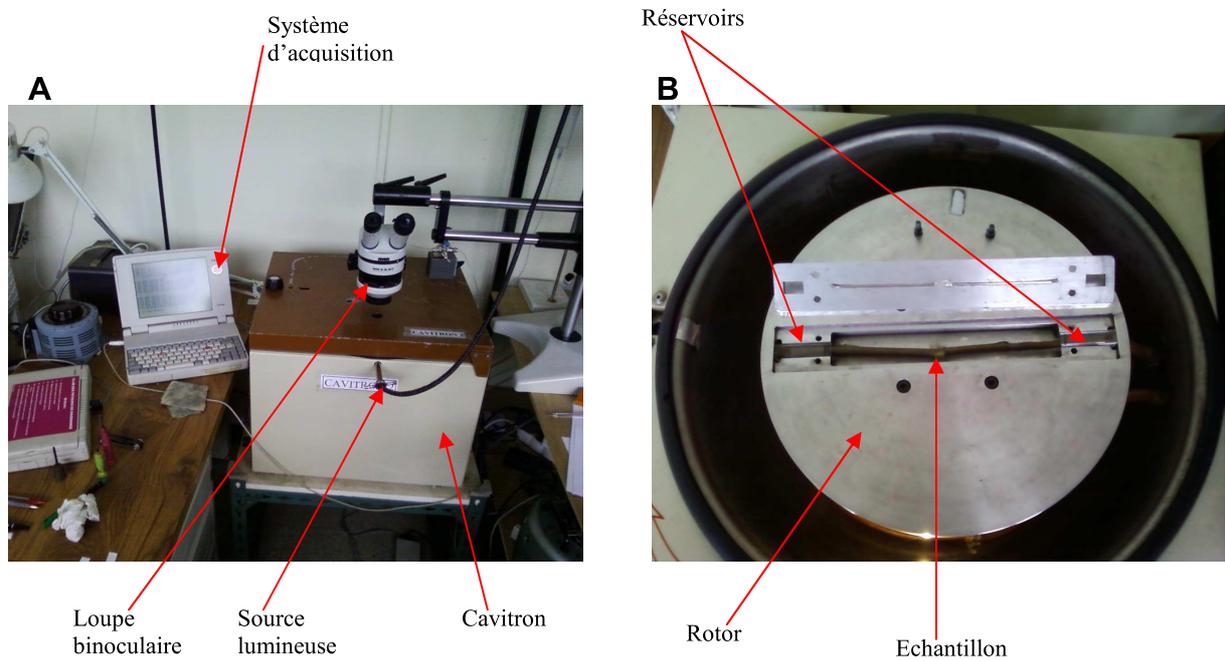


Figure 5 : (A) vue extérieure du Cavitrone et (B) vue de l'intérieur du cavitrone (photos : Rémi Wortemann)

## Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation

La variabilité de la vulnérabilité à la cavitation a été traitée dans de nombreux travaux. Ces travaux ont montré que la vulnérabilité à la cavitation peut varier de façon importante et à différents niveaux. Il existe de la variabilité entre espèces (variabilité inter-spécifique), entre individus d'une même espèce (variabilité intra-spécifique) ou liée à la plasticité phénotypique (organe, environnement). Dans ces différentes études, ce ne sont pas les courbes de vulnérabilité en tant que telles qui sont comparées, mais des paramètres issus de cette courbe. En particulier la  $P_{50}$  qui est la tension xylémienne induisant 50% de PLC.

### *Variabilité inter-spécifique*

L'analyse des nombreuses courbes de vulnérabilité à la cavitation trouvées dans la littérature montre que c'est entre les espèces que l'on observe la plus grande variabilité (Maherali, 2004). Il existe des espèces ligneuses très vulnérables, par exemple les peupliers (Cochard *et al.*, 1996 ; Cochard *et al.* 2007 ; Fichot *et al.* 2010 ; Awad *et al.*, 2010) qui présentent des valeurs de  $P_{50}$  généralement comprises entre -1 et -3 MPa. A l'opposé, il existe des espèces très résistantes à la cavitation avec des valeurs de  $P_{50}$  inférieures à -8 MPa, c'est le cas par exemple du buis et du cyprès commun (Figure 6) (Pockmann & Sperry, 2000). Le hêtre se situe entre ces extrêmes, avec une valeur de  $P_{50}$  comprise entre -2 et -4 MPa (Cochard *et al.* 1999 ; Lemoine *et al.*, 1999 ; Herbette *et al.*, 2010). Le grand nombre d'étude et le grand nombre d'espèces étudiées ont permis de montrer que les espèces décrites comme étant xérophiles possèdent des valeurs de  $P_{50}$  plus faibles que les espèces dites hygrophiles (figure 6) (Pockman & Sperry, 2000 ; Tyree *et al.*, 2003 ; Maherali *et al.*, 2004). Cela indique que la vulnérabilité à la cavitation pourrait être utilisée comme un des paramètres pour définir le niveau de tolérance à la sécheresse d'une espèce.

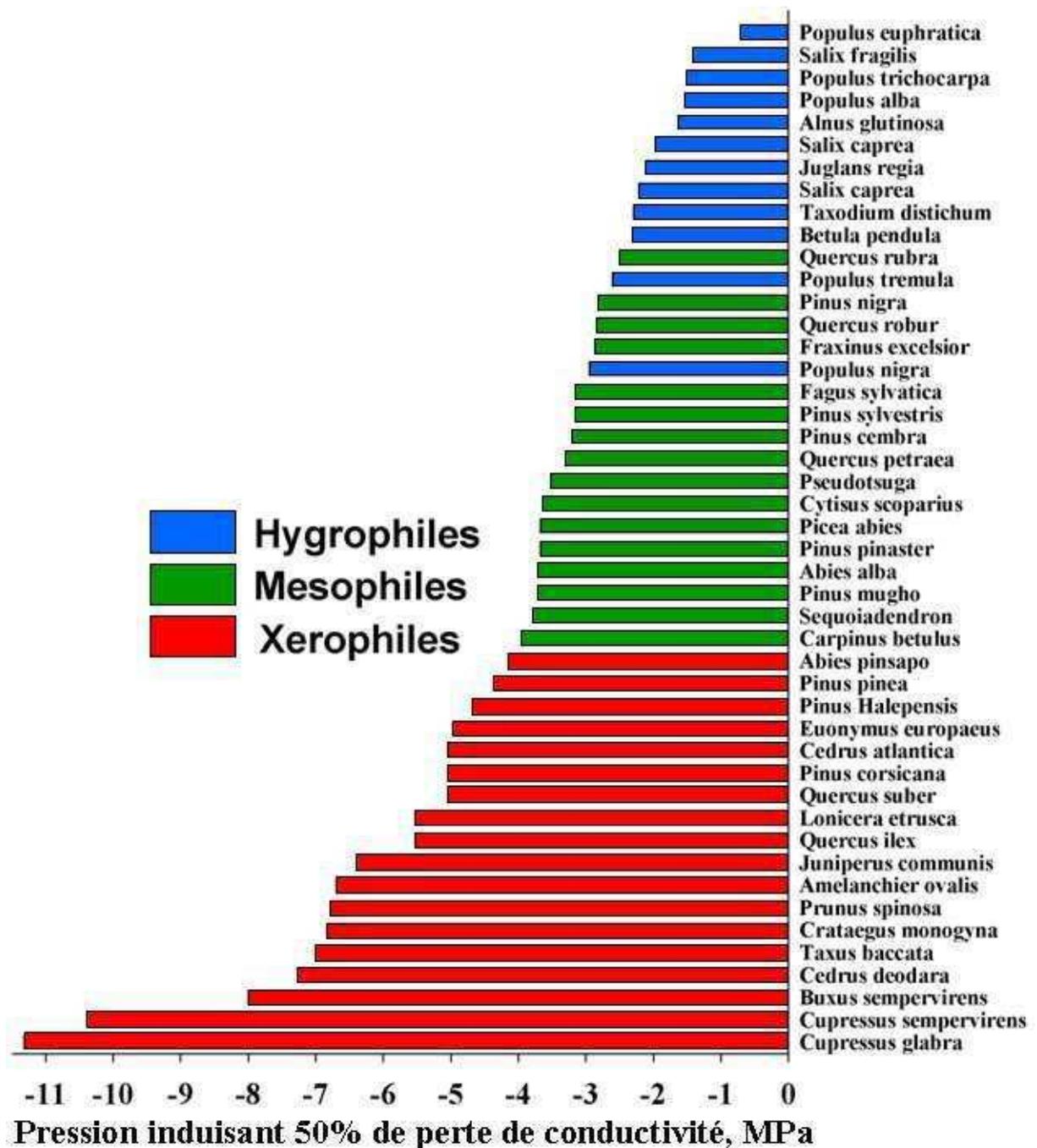


Figure 6 : 46 espèces d'arbres classées en fonction de leur valeur de P<sub>50</sub>. Les espèces sont également identifiées en fonction de leur besoin en eau. (Communication personnelle)

### *Variabilité intra-spécifique*

A ce jour, la variabilité intra-spécifique reste moins documentée que la variabilité interspécifique. Néanmoins, il existe des études comme celle de Neufeld *et al.* (1992) portant sur 4 géotypes de canne à sucre (*Saccharum sp.*). Ces auteurs montrent des différences de  $P_{50}$  assez faibles entre géotypes, de l'ordre de -1 MPa. On dénombre aussi quatre études récentes utilisant la technique du « cavitron » (Cochard. 2005), réalisées sur des résineux (Martnez-Vilalta *et al.*, 2009 ; Corcuera *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2011). De façon générale, la gamme de variabilité observée pour la vulnérabilité à la cavitation à l'échelle intra-spécifique (globalement entre 1 et 2 MPa) est inférieure à celle observée à l'échelle inter-spécifique (les différences entre espèces peuvent atteindre 8 à 10 MPa, figure 6). Par contre, nous ne savons pas si les résultats obtenus pour ces espèces de résineux (pin maritime et pin sylvestre) sont génériques pour les autres espèces ligneuses. Ainsi, il paraît important de continuer dans cette voie, tout en diversifiant le type de végétaux étudiés. C'est pourquoi le travail effectué dans cette thèse porte sur une angiosperme, le hêtre (*Fagus sylvatica L.*).

### *Variabilité entre organes*

La vulnérabilité à la cavitation est variable au sein même d'un individu si on considère des organes différents. Zimmermann (1983) a énoncé l'idée que les pétioles seraient plus vulnérables que les tiges, en s'appuyant sur l'hypothèse de la segmentation hydraulique. C'est au niveau des feuilles que les tensions xylémiennes sont les plus fortes dans la plante. Donc c'est à leur niveau que se produiront les premiers événements de cavitation en cas de sécheresse. Si la sécheresse perdure, les feuilles vont tomber, limitant ainsi la transpiration et diminuant les tensions dans les tiges. Cela sous entend que l'arbre privilégierait les parties pérennes (tiges), représentant un gros investissement carboné, aux parties non pérennes moins coûteuses à produire (feuilles). Différentes études ont été menées pour confirmer cette hypothèse, sans faire ressortir de consensus. En effet, des travaux réalisés sur noyer ont confirmé cette hypothèse avec des différences de 1 MPa entre les organes (Tyree *et al.*, 1993), au contraire d'autres études réalisées sur peuplier (Cochard *et al.* 1996 ). D'après Cochard *et al.* (1996) aucune différence n'est détectée entre les organes, alors que les pétioles de peuplier seraient significativement plus résistants d'après Hacke et Sauter (1996). En ce qui concerne

la partie racinaire, il est en général montré que les racines sont moins résistantes à la cavitation que les tiges (Martinez-Vilalta, 2002 ; McElrone *et al.*, 2004 ; Maherali *et al.*, 2006 ; Pratt *et al.* 2007a, 2007b). On peut expliquer ce résultat par le fait que les racines correspondent aux zones où les tensions xylémiennes sont les plus faibles.

### *Plasticité phénotypique*

La plasticité phénotypique est à prendre en compte dans la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Par exemple, Cochard *et al.* (1999) et Herbette *et al.* (2010) ont montré que chez le hêtre, les branches de « lumière », c'est-à-dire les branches poussant au sommet de l'arbre où le rayonnement est le plus incident, sont plus résistantes à la cavitation que les branches d'ombre. Barigah *et al.* (2006) ont réalisé ce type d'étude sur un large panel d'espèces d'arbres et arrivent aux mêmes conclusions. Les branches de lumière sont celles qui ont la demande évaporative la plus importante du fait de l'incidence de la lumière, ce qui explique leur plus grande résistance à la cavitation. D'autres facteurs environnementaux peuvent avoir une influence sur la vulnérabilité à la cavitation, comme la teneur en azote du sol (Harvey & Van Den Driessche, 1997 ; Ewers *et al.*, 2000). Harvey & Van Den Driessche (1997) ont utilisé des clones de peupliers (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) et ont montré qu'une augmentation de la fertilisation du sol en azote induit une plus grande vulnérabilité à la cavitation des arbres. La sécheresse peut également faire varier la vulnérabilité à la cavitation (Holst *et al.* 2006, Beikircher & Mayr, 2009 ; Awad *et al.*, 2010). Awad *et al.* (2010) ont montré que des clones de peuplier poussant sous stress hydrique sont moins vulnérables à la cavitation que ceux poussant dans des conditions hydriques optimales.

## Résorption de l'embolie

L'embolie n'est pas irréversible, et peut être résorbée. Pour cela il est indispensable que la pression de sève augmente (Ewers *et al.*, 2001), afin de permettre la dissolution des bulles. Une augmentation de la pression de sève n'est cependant pas possible lorsque que le flux xylémien est sous tension. Cette résorption de l'embolie par augmentation de la pression de sève concerne donc principalement l'embolie liée aux cycles de gel et dégel lorsque l'arbre n'a plus de feuilles. Le phénomène de mise sous pression de la sève a pour origine les racines, on parle de poussée racinaire. Cette poussée ou pression racinaire résulte d'une différence de pression osmotique entre la solution du sol, et la pression osmotique de la sève. La solution du sol étant moins concentrée en osmolytes que la sève, un flux d'eau du sol vers les racines se met en place et pousse l'eau présente dans l'appareil vasculaire vers le haut. Cette pression racinaire peut atteindre quelques Mpa.

Un autre phénomène de résorption de l'embolie existe, et a été observé chez le noyer (Améglio *et al.*, 2002). Ce phénomène se produit en hiver. Améglio *et al.* (2002) ont montré que chez le noyer la sève des branches pouvait être sous tension ou sous pression suivant la température de l'air. La sève est sous tension lorsque la température est supérieure à 5°C, et est sous pression quand la température est inférieure à 5°C. Cette pression observée dans les branches résulte d'une différence de pression osmotique. En effet, à 5°C les réserves d'amidon sont hydrolysées pour produire des sucres solubles. Ces sucres solubles vont augmenter la concentration en osmolytes de la sève, ce qui va créer un appel d'eau des tissus voisins vers les vaisseaux, la sève sera alors sous pression, ce qui entrainera la dissolution des bulles d'air.

Ces deux mécanismes fonctionnent lorsque l'arbre est défolié, et concernent la résorption de l'embolie hivernale. Par contre, l'embolie estivale n'est généralement pas résorbée (Cordero & Nielsen, 2002). Les arbres ne pouvant pas résorber l'embolie estivale, ils possèdent des mécanismes pour contrôler l'ampleur de l'embolie. En effet il existe un contrôle stomatique de la cavitation. La tension à laquelle se ferment les stomates correspond à la tension à laquelle la cavitation commence (Cochard *et al.*, 1996 ; Cochard *et al.*, 2002 ; Lemoine *et al.*, 2002 ; Cochard *et al.*, 2002a). En se fermant les stomates limitent les pertes en eau et donc diminuent la tension dans les vaisseaux. Dans ce cas, on parlera d'un phénomène d'évitement de l'embolie plutôt que d'un phénomène de résorption de l'embolie.

## Objectifs de la thèse

Les arbres acheminent l'eau des racines aux feuilles à l'aide d'un système hydraulique particulier composé essentiellement de vaisseaux. Il est donc essentiel pour l'arbre de maintenir ce système hydraulique fonctionnel. Or nous avons vu dans la synthèse bibliographique que des sécheresses intenses peuvent induire de la cavitation et compromettre l'intégrité du système vasculaire des arbres. Les modèles des changements globaux prédisent que des épisodes de sécheresse extrême se feront plus nombreux dans les années à venir, il paraît donc important de s'intéresser à la vulnérabilité à la cavitation. L'objectif de la thèse est donc d'étudier la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation de *Fagus sylvatica* L..

Précédemment il a été mentionné qu'il existait plusieurs sources de variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Le premier objectif a donc consisté à identifier les sources de variabilité de la cavitation chez le hêtre.

Alors que la variabilité inter-spécifique de la vulnérabilité à la cavitation est aujourd'hui bien documentée, quelques études de la variabilité intra-spécifique ont été présentées, toutes réalisées sur des résineux. Le deuxième objectif est donc d'étudier la variabilité intra-spécifique de la vulnérabilité à la cavitation chez le hêtre, et plus exactement d'identifier la part de variabilité génétique de la part de plasticité phénotypique.

La vulnérabilité à la cavitation n'est pas le seul trait physiologique impliqué dans la résistance à la sécheresse des arbres. C'est pourquoi le troisième objectif de cette thèse est d'étudier les relations pouvant exister entre la vulnérabilité à la cavitation et des traits anatomiques ou physiologiques liés à la résistance à la sécheresse.



# Méthodologies de mesures



# ***Méthodologies de mesures***

## **Les échantillons**

Toutes les mesures ont été effectuées à partir du même type de prélèvements. Il s'agit de branches de hêtre de 60 cm ( $\pm 5$  cm) de long et mesurant moins d'1 cm de diamètre. Ces échantillons ont toujours été prélevés dans la partie haute de la couronne de l'arbre sur les branches de lumière à l'aide d'un échenilloir. Une fois coupés, les échantillons sont défoliés rapidement, puis ils sont entourés de papier humide avant d'être plongés dans un sac en plastique noir. Ces différentes étapes empêchent une déshydratation des échantillons. Une fois de retour au laboratoire une partie de chaque échantillon (environ 5 cm) est stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin de pouvoir par la suite extraire des acides nucléiques. Le reste des échantillons est stocké en chambre froide à  $5^{\circ}\text{C}$ . Les mesures de vulnérabilité à la cavitation seront effectuées dans un délai d'un mois maximum (Herbette *et al.* 2010). Les échantillons ayant servi à mesurer la vulnérabilité à la cavitation sont ensuite conservés et stockés à température ambiante, pour pouvoir par la suite effectuer, sur ces mêmes échantillons, les analyses de discrimination isotopique du carbone et de densité du bois.

## **Les différents sites de prélèvement**

### *Les sites français*

Plusieurs sites aux conditions environnementales différentes et comptant des peuplements d'âges différents ont été choisis. Il y a deux sites dans le Nord-est de la France à Graoully et à Hesse, deux sites dans le centre de la France à Allagnat et dans la vallée de Chaudefour, ainsi que plusieurs sites dans le Sud-est à différentes altitudes sur les faces Nord et Sud du mont Ventoux (Tableau 1). Ces différents sites ont déjà été bien décrits dans d'autres expérimentations (voir références Tableau 1).

Nom de la Forêt, localisation en France	Position GPS	Altitude (m)	Etudes de références des sites
Allagnat, centre	45°45'N 2°54'E	1000	Cochard <i>et al.</i> , 2005b
Graouilly, nord-est	49°04'N 6°01'E	300	Piboule <i>et al.</i> , 2005
Hesse, nord-est	48°40'N 7°03'E	330	Granier <i>et al.</i> , 2000
Chaudefour, centre	45°32'N 2°50'E	1340	Wortemann non publié
Mont Ventoux, sud-est	44°10'N 5°14'E	950/Face nord 1260/Face nord 1520/Face nord 930/Face sud 1250/Face sud 1565/Face sud	Dreyfus, 2008

Tableau 1 : Localisation des sites d'études exploités en France.

### *Les plantations comparatives européennes*

Le deuxième groupe de sites est composé de 3 plantations comparatives de populations de hêtres appartenant à un réseau européen. Ces trois plantations sont situées en France à Lyons-la-Forêt, en Espagne à Burgette et en Slovaquie à Vrchdobroc. Les différentes populations présentes dans les plantations sont issues de massifs clairement identifiés. Dans ces massifs les fâines ont été récoltées, poolées puis élevées en pépinières de 1993 à 1995. Les populations ont ensuite été transplantées dans les différentes plantations comparatives en 1995. Les arbres des 3 plantations ont donc tous le même âge. Dans chaque plantation les populations sont réparties en 3 blocs de 50 arbres chacun (5 rangées de 10 arbres). Dans la plantation française, 17 populations ont été analysées. Ces 17 populations proviennent de toute l'aire de répartition du hêtre et sont identifiées sur la figure 7. Six populations présentes dans les 3 plantations comparatives ont également été utilisées pour différentes analyses (figure 7). Les principales caractéristiques des plantations et des différentes populations sont décrites dans le tableau 2.

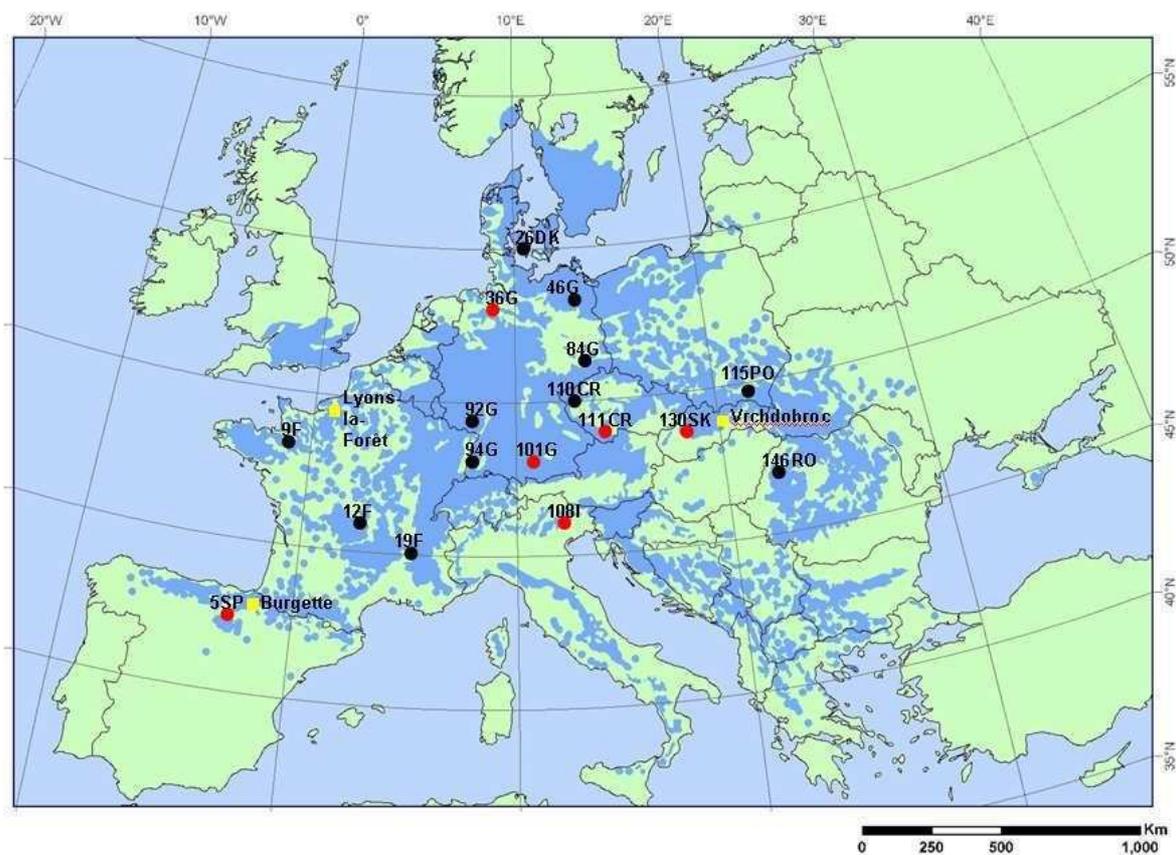


Figure 7 : Carte de distribution du hêtre d'après EUFORGEN 2009 (european forest genetic resources programme). Les différentes populations exploitées sont représentées par des ronds, les ronds rouges correspondent aux six populations testées dans les 3 sites. Les trois sites sont identifiés par des carrés jaunes.

Pays	Localisation	Code	Position GPS	Altitude(m)	Précipitations annuelles (mm)
Espagne*	Burgette	Es	N 43°00' W 1°20'	910	835
Slovaquie*	Vrchdobroc	Sk	N 48°36' E 19°38'	840	625
France*	Lyons	F	N 49°29' E 1°36'	190	692
<b>Allemagne</b>	<b>Kaufbeuren</b>	<b>101A</b>	<b>47°55'N 10°35'E</b>	<b>700</b>	<b>986</b>
<b>Italie</b>	<b>Veneto</b>	<b>108I</b>	<b>46°8'N 12°13'E</b>	<b>1150</b>	<b>1362</b>
République Tchèque	Kladská	110RT	50°2'N 12°37'E	690	755
<b>République Tchèque</b>	<b>Chvalsiny</b>	<b>111RT</b>	<b>48°51'N 14°15'E</b>	<b>750</b>	<b>714</b>
Pologne	Stary Sacz	115PO	49°31'N 21°41'E	660	708
France	Beffenares	12F	46°11'N 2°57'E	575	854
<b>Slovaquie</b>	<b>Trenc In</b>	<b>130SK</b>	<b>48°53'N 18°E</b>	<b>600</b>	<b>681</b>
Roumanie	Prisaca	146RO	46°41'N 22°16'E	265	663
France	Léoncel	19F	44°55'N 5°11'E	1350	1106
Denmark	Glorup	26DK	55°11'N 10°41'E	70	568
<b>Allemagne</b>	<b>Osterholz</b>	<b>36A</b>	<b>53°14'N 8°48'E</b>	<b>25</b>	<b>721</b>
Allemagne	Gransee	46A	53°N 13°10'E	70	590
<b>Espagne</b>	<b>Anguiano</b>	<b>5ES</b>	<b>42°15'N -2°45'E</b>	<b>950</b>	<b>731</b>
Allemagne	Pferdestall	84A	50°57'N 13°34'E	365	563
Allemagne	Appenthal	92A	49°22'N 7°57'E	405	721
Allemagne	Ettenheim	94A	48°12'N 7°55'E	445	826
France	Fougères	9F	48°23'N -1°10'E	180	761

Tableau 2 : Caractéristiques des 3 sites (\*) ainsi que des 17 populations de hêtre exploitées dans cette étude. Les populations en gras sont les populations qui ont été testées dans chacun des 3 sites.

## Mesures de la vulnérabilité à la cavitation

### *Le Cavitron*

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation de la force centrifuge. Le segment de xylème est centré sur l'axe de la centrifugeuse et chaque extrémité de l'échantillon est immergée dans l'eau dans deux réservoirs en plastique. Le niveau maximum d'eau dans chaque réservoir est déterminé par la position d'un trou de déversement présent sur une paroi du réservoir. Un tube à l'intérieur du rotor permet l'alimentation en eau des réservoirs. Le trou de déversement d'un des réservoirs (réservoir aval) est positionné à 13 cm de l'axe de rotation. Le second trou de déversement sur le second réservoir (réservoir amont) se situe à 12 cm de l'axe de rotation (Figure 8). Cela crée une différence de pression positive ( $\Delta P$ ) et un flux ( $F$ ) entre le réservoir amont et le réservoir aval à travers l'échantillon. Le niveau d'eau dans le réservoir aval est constant car l'eau est expulsée par le trou de déversement. Le niveau d'eau dans le réservoir amont diminue au cours du temps proportionnellement au flux  $F$ . La différence de niveau d'eau ( $r$ ) entre les réservoirs est déterminée grâce à un système optique durant la centrifugation en mesurant la distance entre les deux ménisques air/eau de chaque réservoir. L'illumination des réservoirs par leur axe facilite la localisation des ménisques sous le microscope. On ne mesure pas directement  $F$  mais plus exactement le temps ( $dt$ ) que met le ménisque du réservoir amont pour parcourir une distance ( $dr$ ).  $F$  est inversement relié à  $dt$  :

$$F = dr s / dt \quad (3)$$

$s$  étant l'aire de la section d'eau dans le réservoir. Cette aire est considérée comme étant constante.  $\Delta P$  est obtenue grâce à la formule :

$$\Delta P = 0.5 \rho \omega^2 \{R^2 - (R - r)^2\} \quad (4)$$

avec  $\rho$  la densité de l'eau ( $998.2 \text{ kg/m}^3$ ),  $\omega$  la vitesse angulaire (rad/s),  $R$  la distance (m) entre l'axe de rotation et la partie distale du réservoir aval et  $r$  la différence de niveau d'eau (m) entre les deux réservoirs (valeur absolue). La conductance hydraulique ( $K$ ) de l'échantillon est calculée comme :

$$K = F / \Delta P \quad (5)$$

La pression minimale du xylème ( $P$ ) au centre de l'échantillon est ajustée en faisant varier la vitesse de rotation :

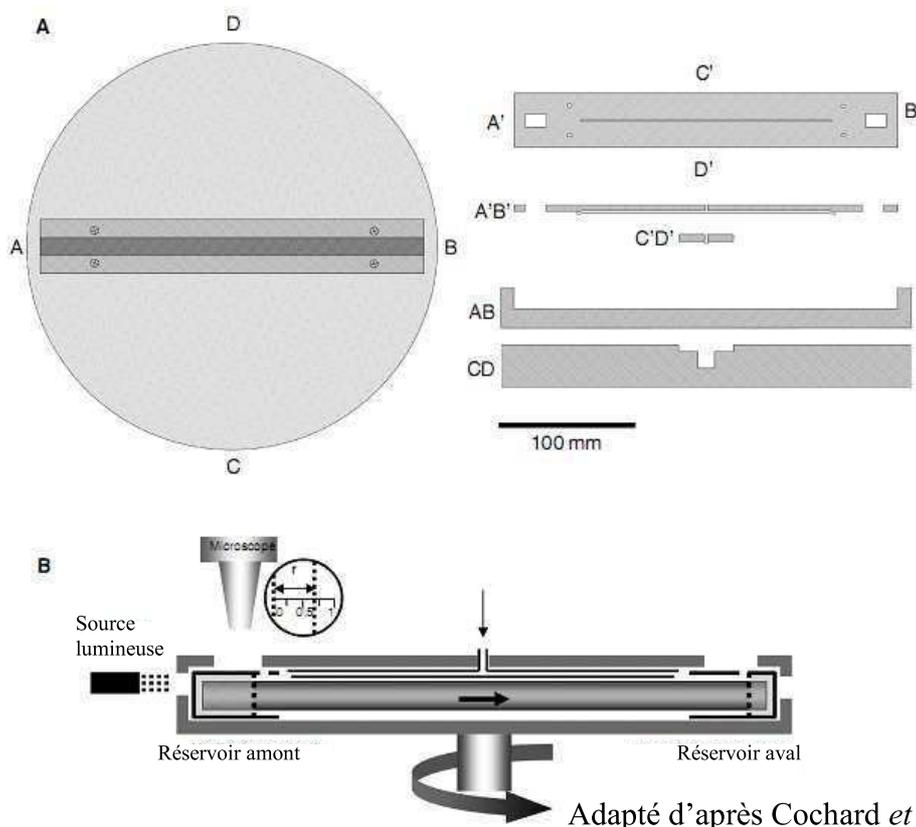
$$P = -0.25 \rho \omega^2 \{R^2 - (R - r)^2\} \quad (6)$$

La courbe de vulnérabilité est obtenue grâce à la relation entre K et P. Un thermocouple permet de connaître la température de l'air dans le cavitron. Un logiciel permet de calculer P,  $\Delta P$ , F et K à partir de la température et de la vitesse de rotation.

Les mesures ont été effectuées avec une pression initiale P de - 0.5 MPa, et la conductance initiale du xylème est déterminée ( $K_0$ ). La pression dans l'échantillon est alors diminuée et maintenue constante pendant une minute, avant de déterminer de nouveau K. C'est alors qu'est calculé le pourcentage de perte de conductivité du xylème à l'aide de la formule :

$$PLC = 100 \times (1 - K / K_0) \quad (7)$$

L'échantillon est ainsi soumis à des pressions de plus en plus négatives par palier de 0.5 MPa ; à chaque palier la PLC est déterminée. Les mesures sont stoppées lorsque la PLC est proche de 100%. A partir de ces données, il est possible de déterminer la courbe de vulnérabilité de chaque échantillon.



Adapté d'après Cochard *et al.* 2005

Figure 8 : (A) Le dessin à l'échelle du rotor utilisé pour centrifuger les segments du xylème. ABCD est une vue de dessus du rotor avec le couvercle A'B'C'D' enlevé. AB, CD et A'B', CD' sont deux sections orthogonales du rotor et du couvercle. (B) Schéma illustrant le principe de la technique de centrifugation pour construire des courbes de vulnérabilité. L'échantillon est centré sur l'axe d'une centrifugeuse avec ses extrémités immergées dans l'eau contenue dans deux réservoirs en plastique. Le niveau maximum d'eau dans chaque réservoir est déterminé par la position d'un trou de déversement. Le trou dans le réservoir en amont étant situé plus près de l'axe de rotation, une différence de pression se développe pendant la centrifugation et un flux d'eau à travers l'échantillon se crée. L'eau va couler du réservoir amont vers le réservoir aval. Le niveau d'eau dans le réservoir en amont diminue avec le temps à une vitesse déterminée que l'on détermine optiquement pendant la centrifugation en mesurant la distance entre les ménisques (Cochard, 2002). air/eau des réservoirs. La source lumineuse est utilisée pour mettre en évidence la position des ménisques.

### La courbe de vulnérabilité et $P_{50}$

Une courbe de vulnérabilité est une courbe sigmoïde (figure 9) qui représente la PLC en fonction de la tension présente dans les conduits de xylème. Le modèle de courbe de vulnérabilité ici utilisé est de celui de Pammenter & Vanderwilligen (1998) :

$$PLC = 100 / [1 + \exp(S / 25 \times (P - P_{50}))] \quad (8)$$

où  $P$  correspond à la tension xylémienne,  $P_{50}$  représente la valeur de  $P$  entraînant 50% de PLC, et  $S$  représente la pente de la courbe de vulnérabilité à la cavitation. Le  $P_{50}$  est le paramètre le plus utilisé dans la littérature, c'est un caractère robuste et comparable. Mais ce paramètre n'a aucune signification physiologique réelle. C'est pourquoi d'autres paramètres comme le  $P_{12}$  et le  $P_{88}$  sont utilisés. Le  $P_{12}$  est considéré comme le point de départ de l'emballement de la cavitation et le  $P_{88}$  est considéré comme le point de « non retour » correspondant à la rupture hydraulique du système (Meizner *et al.*, 2009).

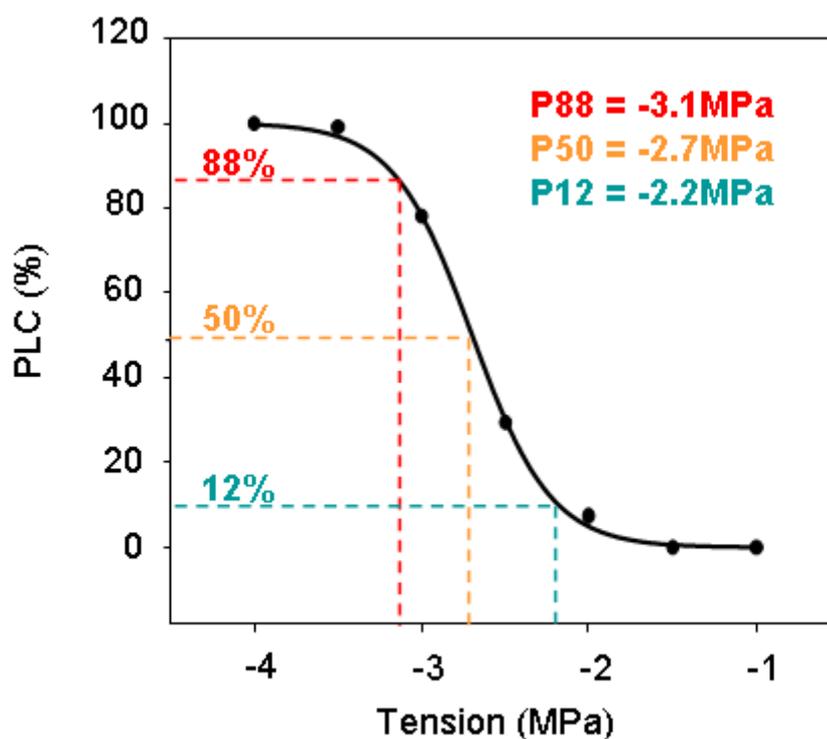


Figure 9 : Courbe de vulnérabilité d'un hêtre. (Données non publiées Rémi Wortemann)

## Analyses de la variabilité génétique

Pour des questions de coût, les analyses génétiques n'ont été effectuées que sur 15 individus de chacune des 6 populations étudiées dans les 3 sites (Tableau 2), ce qui représente 90 échantillons.

### *Extraction de l'ADN*

L'ADN est extrait à partir des échantillons conservés à -80°C. Le protocole utilisé est celui décrit par Noaves *et al.* 2009 (Annexe 1). Dans un premier temps, les échantillons ont été réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille. Ces broyages ont été effectués dans de l'azote liquide. Environ 125 mg de poudre par échantillon ont été utilisés. Pour l'extraction de l'ADN qui s'est effectuée en plusieurs étapes. Tout d'abord on effectue une lyse des cellules afin de libérer le contenu cellulaire, des inhibiteurs de DNAses sont présents lors de cette étape afin de limiter la dégradation des ADN. Une fois que la lyse cellulaire est complète, les protéines ont été séparées des acides nucléiques sous l'action d'un mélange chloroforme / alcool isoamylique. Après centrifugation, la phase aqueuse contenant les acides nucléiques en solution est prélevée et les acides nucléiques sont précipités. Le culot est dissous dans un tampon contenant une RNase afin d'éliminer les ARN. L'ADN est alors stocké à -20°C.

### *Diversité des ADN Chloroplastiques*

Pour l'analyse génétique neutre ce sont des marqueurs de type microsatellite, des ADN chloroplastiques, qui ont été utilisés. Les marqueurs chloroplastiques permettent de révéler un polymorphisme suffisamment important pour être utilisés à l'échelle intra-spécifique (Hamilton, 1999). Les ADN chloroplastiques ont un héritage maternel chez les angiospermes (Morgensen, 1996), ils sont donc intéressants pour l'étude de la structuration génétique d'une espèce, la colonisation dépendant le plus souvent de la dispersion d'un faible nombre de semences (Ouborg *et al.*, 1999). La structuration génétique est d'avantage conservée au niveau de l'ADN chloroplastique qu'au niveau de l'ADN nucléaire qui est soumis aux flux génétiques à la fois via les pollens et les semences (Gaskin *et al.*, 2005). L'analyse de la diversité des ADN chloroplastiques peut être très utile dans le cas d'analyses préliminaires du

degré de polymorphisme et de structuration génétique d'une espèce. Ces marqueurs ont un autre avantage : ils sont universels et peuvent donc être utilisés rapidement sur l'espèce choisie, sans contrainte de mise au point particulière (Taberlet *et al.*, 1991). Pour notre étude sur le hêtre nous avons sélectionné 6 marqueurs chloroplastiques parmi ceux décrits par Weising & Gadner (1999). Les amorces sont présentées dans le tableau 3 (ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp6, ccmp7 et ccmp10). Ces amorces ont été sélectionnées suite à des tests préliminaires. Elles ont été marquées directement avec des fluorochromes. Le marquage des amorces a été réalisé par Applied Biosystems (Californie, USA). Les 90 échantillons ont été amplifiés par PCR à l'aide d'un thermocycleur (Veriti 384 Well, Applied Biosystems). Les produits d'amplification ont été dilués et multiplexés à l'aide du Biomeck Fx<sup>P</sup> tête 384 (Beckman Coulter, Fulerton, Californie, USA). Après multiplexage les produits d'amplification ont été traités par le séquenceur 96 capillaires (3730xl DNA Analyser, Applied Biosystems). Le protocole complet se trouve en annexe. Les tailles des fragments ont été obtenues à l'aide du logiciel GeneMapper<sup>TM</sup> 3.5 d'Applied Biosystems. L'identification des différents haplotypes a été basée sur les variations des 6 microsatellites chloroplastiques. L'ensemble des expérimentations ainsi que les analyses ont été réalisés sur la plateforme « GENTYANE » de l'INRA de Clermont-Ferrand.

Code	Séquences	Taille chez le hêtre (pb)
ccmp2	5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3' 5'-ATCGTACCGAGGGTTCTGAAT-3'	223 / 224 / 225
ccmp3	5'-CAGACCAAAAAGCTGACATAG-3' 5'-GTTTCATTCGGCTCCTTTAT-3'	112 / 113
ccmp4	5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3' 5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'	115 / 116
ccmp6	5'-CGATGCATATGTAGAAAGCC-3' 5'-CATTACGTGCGACTATCTCC-3'	97 / 98
ccmp7	5'-CAACATATACCACTGTCAAG-3' 5'-ACATCATTATTGTATACTCTTTC-3'	143 / 144 / 145
ccmp10	5'-TTTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA-3' 5'-TTCGTCGDCGTAGTAAATAG-3'	118 / 119

Tableau 3 : Séquences et tailles des amorces utilisées pour l'étude génétique.

## Mesures de l'efficacité de l'utilisation de l'eau intrinsèque (Wi)

L'efficacité d'utilisation de l'eau correspond à l'équilibre entre le gain de carbone et les pertes en eau par transpiration de la plante sur une période donnée. Les arbres les plus efficaces sont donc ceux qui pour une même quantité d'eau utilisée, ont produit le plus de biomasse. Nous nous intéressons en particulier à l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque qui est définie comme étant le rapport entre l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et la conductance stomatique. Elle peut être estimée de façon indirecte en utilisant la discrimination isotopique du carbone. Pour effectuer ces mesures, 2 cm d'échantillon ont été nécessaires. Les échantillons ont été séchés à l'étuve à 60°C. Ils ont ensuite été broyés à l'aide d'un broyeur à billes. Les analyses ont été réalisées sur la plateforme technique d'écologie fonctionnelle de l'INRA de Nancy. Entre 0.850 et 1.15 mg d'échantillon sont placés dans une capsule en étain (4 x 6 mm) pour l'analyse de la composition isotopique. Les pesées sont précises à 10<sup>-3</sup> mg près. La composition isotopique de chaque échantillon est mesurée grâce à un IRMS (spectromètre de masse Finnigan MAT Delta S, Brême, Allemagne). Le spectromètre de masse mesure un rapport isotopique Ri :

$$R_i = \text{isotope lourd} / \text{isotope léger}, \quad (9)$$

L'isotope lourd correspondant à <sup>13</sup>C et l'isotope léger à <sup>12</sup>C.

La composition isotopique en carbone se calcule à partir du rapport isotopique de l'échantillon (R<sub>échantillon</sub>) et le rapport isotopique du standard international (R<sub>PDB</sub>), le Pee Dee Belemnite en accord avec Craig (1957) :

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = 1000 (R_{\text{échantillon}} - R_{\text{PDB}}) / R_{\text{PDB}} \quad (10)$$

La discrimination isotopique ( $\Delta$ ) entre la composition isotopique du CO<sub>2</sub> atmosphérique ( $\delta_{\text{air}} \approx -8 \text{‰}$ ) et la composition isotopique en carbone du matériel végétal ( $\delta_{\text{plante}}$ ) est calculée en utilisant l'équation de Farquhar et Richards (1984) :

$$\Delta = (\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plante}}) / [1 + (\delta_{\text{plante}} / 1000)] \quad (11)$$

Ensuite pour obtenir la valeur estimée de l'efficacité d'utilisation de l'eau de l'échantillon on utilise l'équation de Farquhar *et al.* (1982) :

$$W_i = A / g_s = (C_a / 1.6) [(\Delta_c - \Delta) / (\Delta_c - \Delta_s)] \quad (12)$$

où C<sub>a</sub> est la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique (estimé à 360 x 10<sup>-6</sup> mol/mol),  $\Delta_s$  est la discrimination isotopique du carbone 13 dans la cavité sous stomatique (4‰),  $\Delta_c$  est la

discrimination isotopique du  $^{13}\text{C}$  causée par la carboxylation (27‰) et  $\Delta$  est la discrimination entre la composition isotopique du  $\text{CO}_2$  atmosphérique et la composition isotopique de la plante.

## Mesures anatomiques et efficacité hydraulique

### *Préparation des échantillons*

Nous avons réalisé des coupes fines de nos échantillons afin d'effectuer des mesures anatomiques des vaisseaux sous microscope. Ces coupes fines (19 $\mu\text{m}$  d'épaisseur) ont été réalisées à l'aide d'un microtome à moteur (RM 2165, Leica Microsystems, Vienne, Autriche). Les coupes obtenues ont été incubées dans différents bains pour mettre en évidence les différents tissus avant un montage sur lame fine. Il y a d'abord eu un bain permettant la lyse du contenu cellulaire afin de ne conserver que les parois. Ensuite les coupes ont été plongées dans un bain de Safranine pour les colorer, la safranine permet de colorer la lignine. Une fois la coloration terminée, les coupes ont été rincées à l'eau puis montées dans une goutte d'eau entre lame et lamelle (Annexe 3). L'observation a été réalisée en microscopie optique (Mectron, Reichert technologies, Depew, USA). Une caméra (Infinity1-SC-NS, Lumenera Corporation, Ottawa, Canada) connectée à l'objectif du microscope a permis d'obtenir des photos des coupes. Ensuite à l'aide d'un logiciel de gestion d'image (Image J) les photos ont été assemblées afin de reconstituer une image complète de la coupe. (Figure 10).

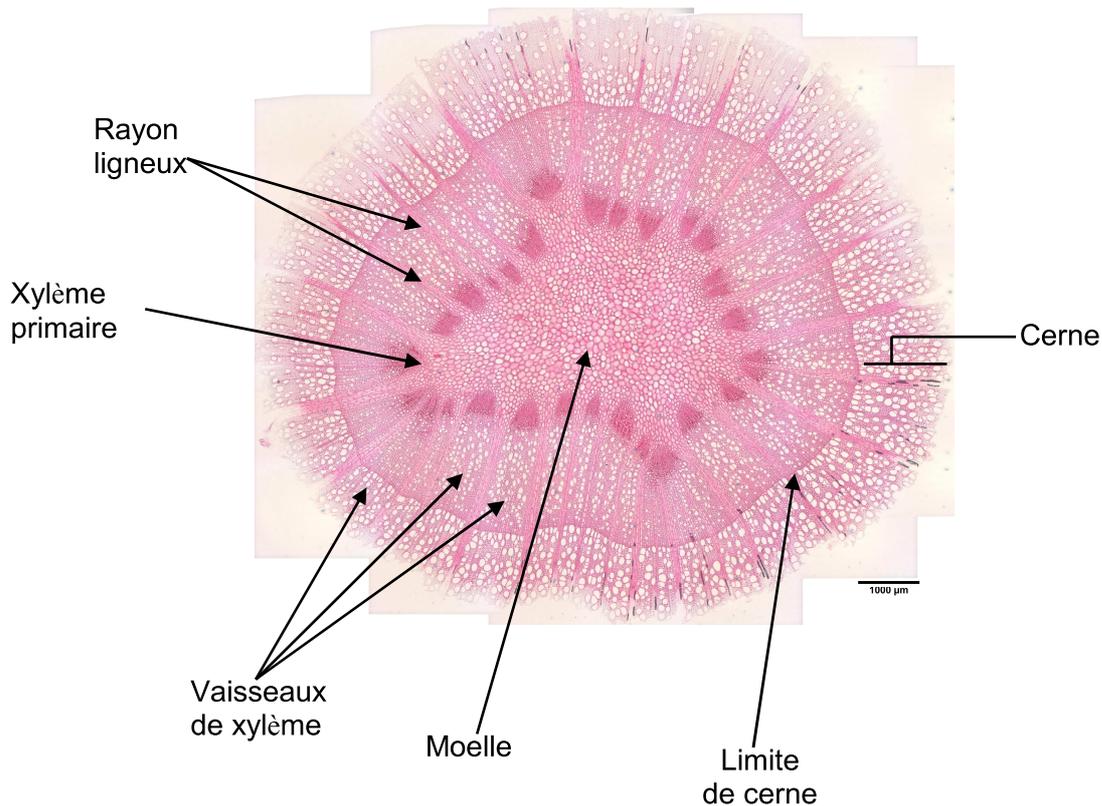


Figure 10 : Photo d'une coupe transversale d'une tige de hêtre réalisée à l'aide d'un microscope optique (Objectif 3 x et Oculaire 5 x). Coloration effectuée à la safranine. (Photo : Pierre Conchon)

### *Efficienne hydraulique*

A partir de ces coupes et à l'aide du logiciel Image J (logiciel libre, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), il a été possible de calculer différents paramètres, notamment le diamètre moyen des vaisseaux ( $d_{moy}$ ) pour chaque échantillon à l'aide de la formule suivante:

$$d_{moy} = (\Sigma \sqrt{a \times b}) / n \quad (13)$$

a et b sont respectivement le petit et le grand diamètre du vaisseau, ces derniers étant ovales. n le nombre de vaisseaux mesurés.

Nous avons également calculé un diamètre hydraulique ( $D_h$ ,  $\mu m$ ) pour chaque échantillon (Sperry *et al.*, 1994) :

$$D_h = (\Sigma d^5) / (\Sigma d^4) \quad (14)$$

Enfin nous avons calculé une conductivité hydraulique spécifique théorique du xylème en se basant sur la loi de Hagen-Poiseuille:

$$K_s = (\pi\rho / 128\eta A_{\text{image}}) \times \Sigma d^4 \quad (15)$$

où  $\rho$  est la densité de l'eau à 20°C (998.2 kg m<sup>-3</sup>),  $\eta$  est la viscosité de l'eau à 20°C (1.002 x 10<sup>-9</sup> MPa s) et  $A_{\text{image}}$  l'aire de l'image analysée (m<sup>2</sup>).

## Densité du bois

La densité du bois a été évaluée car des études ont montré qu'il existait une relation entre la vulnérabilité à la cavitation et la densité du bois. Les arbres les plus denses seraient les plus résistants à la cavitation (Maherali et al., 2004 ; Jacobsen *et al.* 2007). La densité du bois ( $\rho_{\text{wood}}$ ) a été déterminée pour chaque échantillon par déplacement d'eau (annexe 4). Un segment de 2 cm de long de chaque échantillon a été immergé totalement dans de l'eau pendant 24h afin de réhydrater complètement l'échantillon. Une fois la réhydratation complète on plonge l'échantillon dans un tube contenant de l'eau sur une balance afin de déterminer le volume de bois frais. L'échantillon est ensuite séché à l'étuve à 65°C pendant 48h. La masse sèche de chaque échantillon est alors obtenue par pesée. La densité du bois est calculée avec la formule :

$$\rho_{\text{wood}} = \text{masse sèche} / \text{volume frais} \quad (16)$$

## Analyses statistiques

Nous avons réalisé des analyses de variance (ANOVA) pour déterminer si les différents paramètres testés sont significativement différents entre les populations testées. En cas de différences significatives, nous avons effectué un test HSD de Tuckey à  $p < 0.05$  pour comparer les valeurs moyennes des paramètres. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour étudier à la fois l'effet population et l'effet site dans la deuxième partie de la thèse. Nous avons également calculé des coefficients de variations (CV) pour pouvoir comparer la variation du P<sub>50</sub> à plusieurs niveaux et comparer les variations des différents paramètres testés. Pour les analyses génétiques nous avons effectué une analyse moléculaire de la variance (AMOVA) à l'aide du logiciel Arlequin (ver 3.5.1.3, développé par Excoffier & Lischer, 2010).

# Résultats



## ***Résultats***

### 1<sup>ère</sup> partie : Sources de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation

Il est important de signaler que certains résultats présentés dans cette partie « sources de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation » ont été obtenus en amont de cette thèse. Mais il paraît important de présenter ces résultats dans leur intégralité pour garder une cohérence dans le cheminement de cette étude. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Herbette *et al.*, 2010) qui est présentée dans ce manuscrit (pages 67-74) .

#### *Effet de l'âge et de la durée de conservation des échantillons*

L'étude de l'effet de l'âge du segment a été réalisée à partir d'échantillons prélevés dans la plantation comparative de Lyons-la-Forêt. Nous montrons qu'il n'y a pas d'effet "âge" du segment utilisé, étant donné qu'il n'y a pas de différences significatives entre les  $P_{50}$  obtenus. (Figure 11a). Nous avons également trouvé qu'il était possible d'effectuer des mesures de  $P_{50}$  fiables sur des échantillons qui ont été conservés humides pendant 10 semaines à 5°C dans le noir (Figure 11b). Cela est sans doute possible du fait que les conduits de xylème sont constitués de cellules mortes.

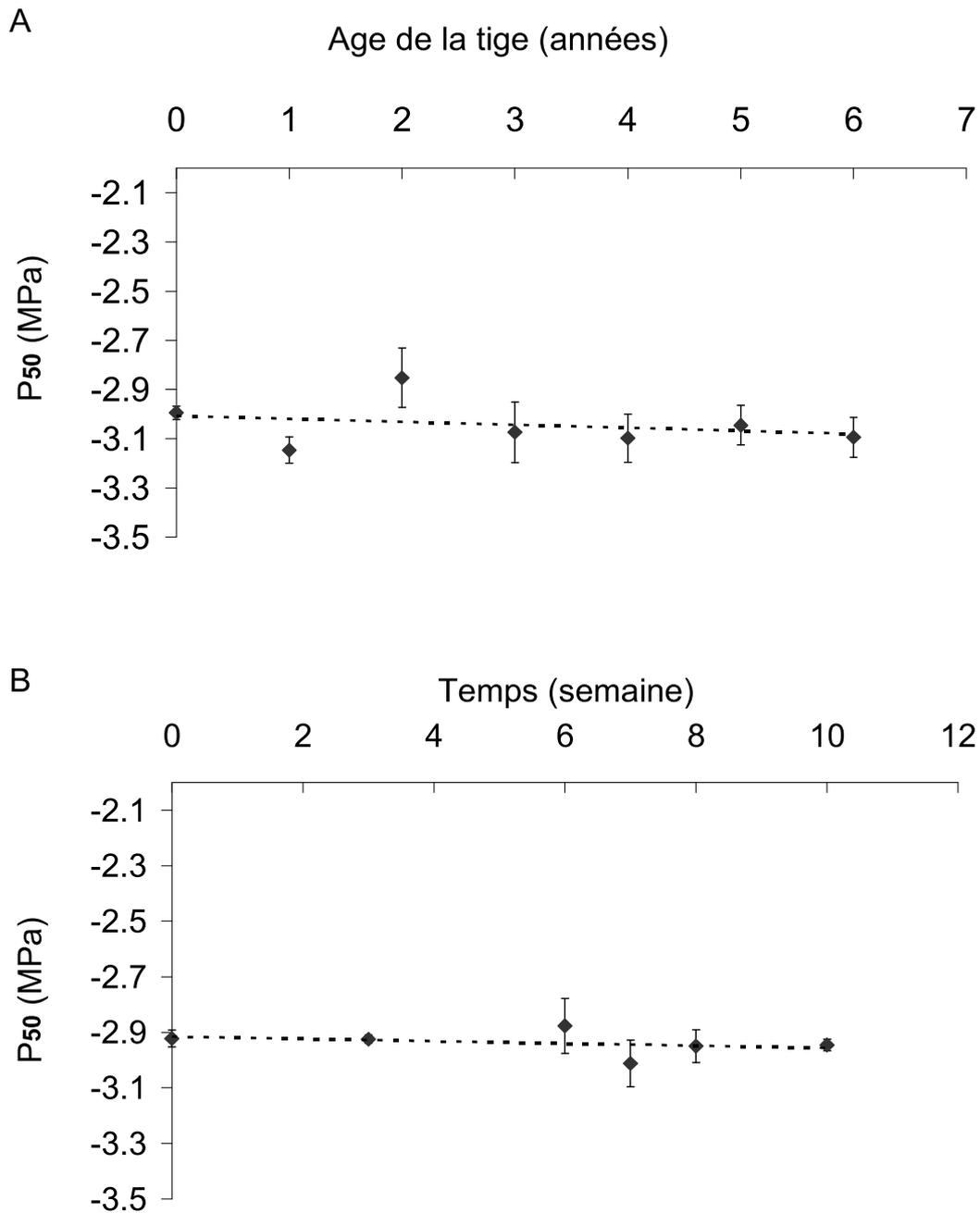


Figure 11 : Effet de l'âge de la tige (A) et du temps de conservation des échantillons (B). (A) l'abscisse représente la classe d'âge de la tige et l'ordonnée représente le P<sub>50</sub> relatif de l'échantillon par rapport au P<sub>50</sub> moyen de la population. Les ronds sont des moyennes ( $\pm$  Ecart type). (B) La valeur de P<sub>50</sub> de branches d'un seul arbre mesurée après 0, 3, 6, 7, 8 et 10 semaines de stockage. Les données sont des moyennes ( $\pm$  Ecart type) de 4 à 6 branches. Les lignes sont des régressions linéaires. Les pentes ne sont pas significativement différentes de 0, avec  $p = 0.672$  et  $0.626$ , respectivement pour (A) et (B) (Test de Tuckey).

### *Variation phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation*

L'étude de la variation phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation a été réalisée sur deux arbres adultes suivis pendant 20 mois. La figure 12 montre que les échantillons issus de branches de lumière, c'est à dire de branches exposées au soleil, sont significativement moins vulnérables à la cavitation que les échantillons issus de branches d'ombre. Lorsque les deux types d'échantillons sont considérés séparément, ils diffèrent significativement en terme de vulnérabilité à la cavitation sur la durée de l'étude, mis à part quelques dates (Figure 13). Néanmoins, les échantillons issus de branches de lumière ont tendance à avoir de valeurs de  $P_{50}$  plus négatives que les échantillons de branches d'ombre. Des variations de vulnérabilité à la cavitation sont observées au cours du temps (Figure 13), mais ces différences dépendent des arbres et il n'est pas possible de détecter une variation saisonnière. Néanmoins, nous avons observé des variations mineures de la vulnérabilité à la cavitation lorsque les échantillons ont été prélevés durant la période de formation du bois c'est-à-dire entre juin et fin septembre et plus particulièrement sur les échantillons de branches de lumière. Pour la suite des travaux de cette thèse, tous les prélèvements ont été effectués en dehors de cette période.

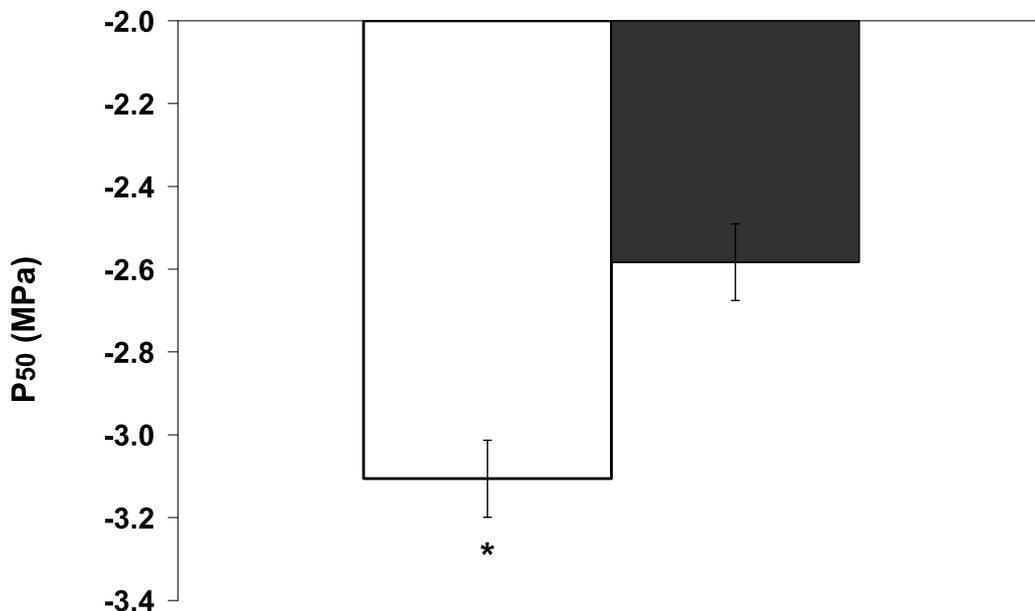


Figure 12 : Résistance à la cavitation de branches d'ombre (barre noire) et de branche de lumière (barre blanche) de hêtre. Les données sont des moyennes sur les 20 mois des valeurs de  $P_{50}$  pour les branches d'ombre et les branches de lumière ( $\pm$  Ecart type). La différence entre les branches d'ombre et de lumière est significative  $p = 27.3 \times 10^{-6}$  (Test de Tuckey).

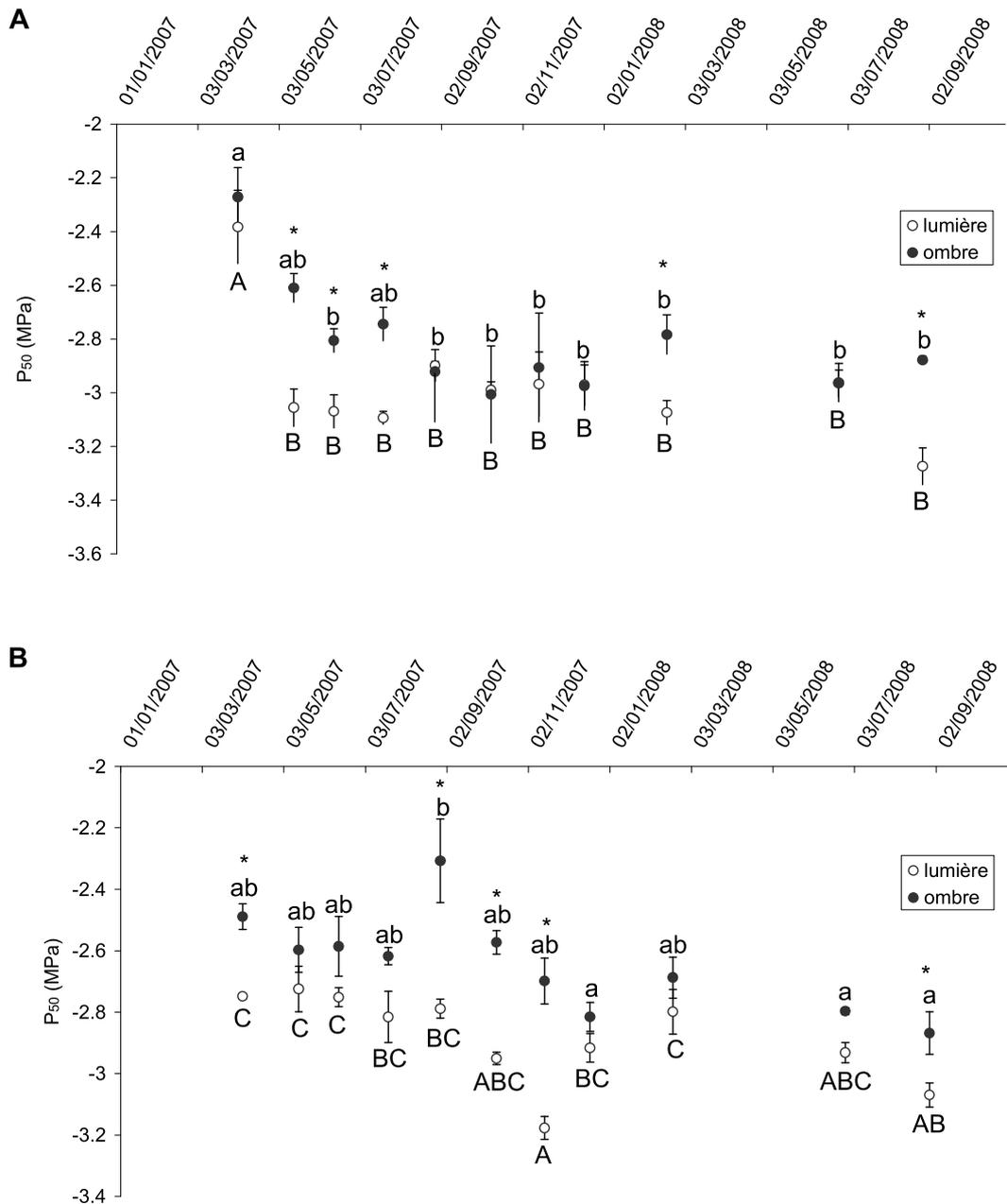


Figure 13 : Vulnérabilité à la cavitation au cours du temps de branches d'ombre (cercles noirs) et de branches de lumière (cercles blancs) pour deux arbres (A et B). Les valeurs de  $P_{50}$  ont été déterminées lors de 11 journées de prélèvements (d'avril 2007 à août 2008). Les données sont des moyennes ( $\pm$  Ecart type) pour 3 à 5 branches. Les lettres renseignent les différences significatives entre les branches d'ombre et les branches de lumière à  $p < 0.050$  (Test de Tuckey).

*Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation entre des populations le long d'un gradient altitudinal et d'un gradient latitudinal.*

Les valeurs de  $P_{50}$  diffèrent significativement entre la plupart des populations poussant en France (Figure 14) selon un gradient nord-est sud-est. La population venant du centre de la France a une valeur de  $P_{50}$  intermédiaire en comparaison avec les deux populations du nord (-3.77 MPa) et la population du sud (-2.40 MPa). La plus grande différence (1.37 MPa) est trouvée entre les populations du Mont Ventoux (sud) et de Graoully (nord). De façon assez inattendue, les valeurs de  $P_{50}$  des hêtres poussant dans le nord sont plus négatives que celles des hêtres poussant dans le centre et le sud de la France. Dans le site du centre de la France, la vulnérabilité à la cavitation est similaire, que l'on étudie des branches d'arbres jeunes ou d'arbres adultes. Cela nous indique que l'âge des arbres ne joue que de façon mineure sur la détermination du  $P_{50}$  chez le hêtre. La figure 15 montre que les populations situées sur la face sud du Mont Ventoux le long d'un gradient altitudinal ne diffèrent pas statistiquement en termes de vulnérabilité à la cavitation. Au contraire les populations de la face nord du Mont Ventoux ont des différences de  $P_{50}$  dans certain cas.

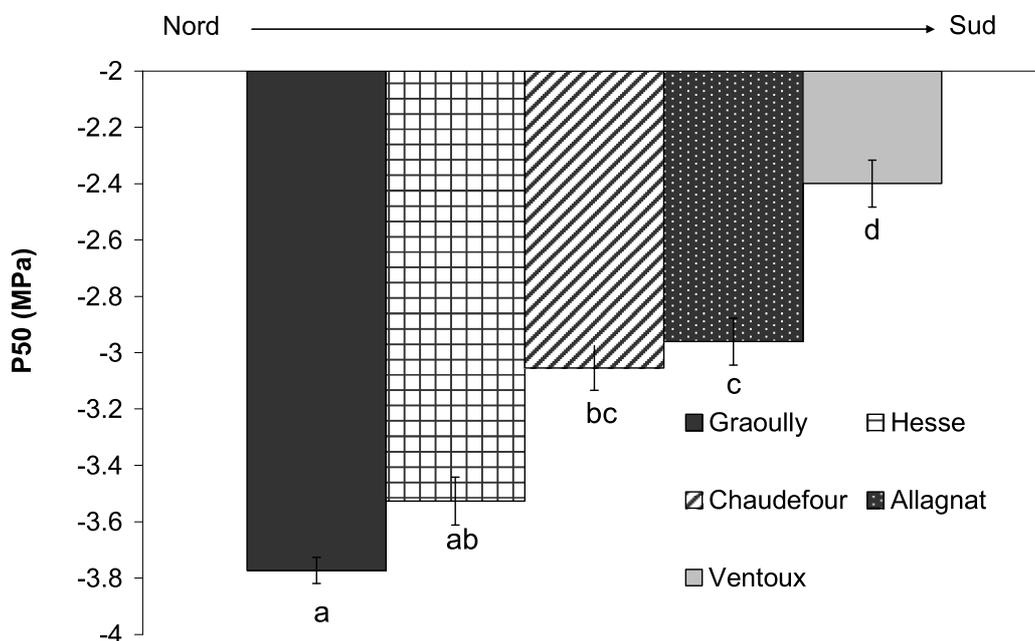


Figure 14 : Résistance à la cavitation de populations de hêtres distribuées le long d'un gradient latitudinal. Les valeurs de  $P_{50}$  ont été déterminées sur des arbres provenant de Graoully, Hesse, Allagnat, Chaudefour et du Mont Ventoux. Les données sont des moyennes ( $\pm$  Ecart type) pour 8 à 50 branches. Il n'y a eu qu'un échantillon par arbre. Les lettres renseignent les différences significatives entre les sites à  $p < 0.050$  (Test de Tuckey).

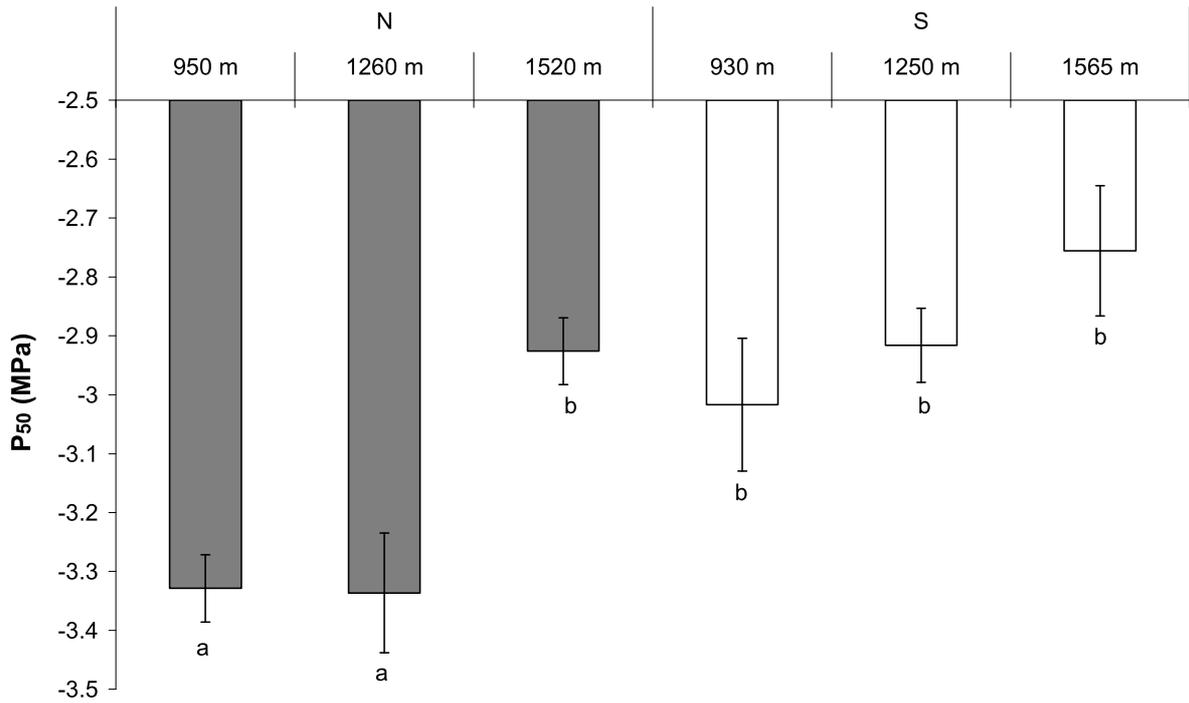


Figure 15 : Resistance à la cavitation des populations de hêtres des faces Nord (Barres grises) et Sud (Barres blanches) du Mont Ventoux le long d'un gradient altitudinal. Les données sont des moyennes ( $\pm$  Ecart type) pour 6 branches. Il n'y a eu qu'un échantillon par arbre. Les lettres renseignent les différences significatives entre les sites à  $p < 0.050$  (Test de Tuckey).

## Discussion

Nous avons montré que la vulnérabilité à la cavitation chez *Fagus sylvatica* L. varie avec l'exposition des tiges à la lumière, les tiges « d'ombre » sont plus vulnérables à la cavitation que les tiges de « lumière » (Figure 12). Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Cochard *et al.*, 1999 ; Barigah *et al.*, 2006). Cochard *et al.* (1999) ont montré que les branches « d'ombres » sont plus vulnérables à la cavitation, aussi bien chez des jeunes hêtres que chez des hêtres adultes. Barigah *et al.* (2006) ont observé, chez plusieurs espèces, (*Betula pendula*, *Acer pseudoplatanus*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur* et *Quercus petraea*) que les arbres poussant à l'ombre (4% de l'ensoleillement maximal) sont plus vulnérables à la cavitation que les arbres poussant en pleine lumière. Nous pensons que les arbres en pleine lumière sont plus résistants à la cavitation car ils doivent soutenir une conductance stomatique et un taux de transpiration au niveau des feuilles, plus importantes que les arbres se trouvant à l'ombre. En effet un plus fort rayonnement induit une transpiration plus importante. Nous avons observé des différences entre les segments de tige ayant une exposition à la lumière différente (Figure 13a, 13b). Ces observations suggèrent que l'exposition à la lumière des tiges ou des branches joue un rôle majeur dans leur architecture hydraulique. Raimondo *et al.* (2009) ont travaillé sur deux génotypes d'oliviers (Leccino Minerva et Leccino Dwarf) et ont montré que la lumière influence l'architecture hydraulique des arbres. En effet les arbres poussant en pleine lumière possèdent plus de vaisseaux que les arbres poussant à l'ombre (50% de l'ensoleillement maximal). Par ailleurs le diamètre moyen de ces vaisseaux est également plus important chez les arbres en pleine lumière. Sur un hybride de peuplier (*Populus trichocarpa* x *deltoïdes*, clone H11-11), Plavcova *et al.* (2011) ont mis en évidence que les arbres poussant à la lumière ont un diamètre hydraulique ( $d_h$ ) supérieur à ceux poussant à l'ombre. Plavcova *et al.* (2011) ont analysé l'effet de la lumière sur la porosité des membranes des ponctuations. Il apparaît que le diamètre moyen des pores présents dans la membrane des ponctuations est plus important chez les arbres poussant à l'ombre que chez ceux poussant à la lumière.

Nous nous sommes également intéressés aux variations saisonnières de la vulnérabilité à la cavitation. Notre étude s'est déroulée sur 20 mois, afin de rencontrer des conditions environnementales différentes entre l'été et l'hiver, entre la période feuillée et la période non feuillée. Pendant la période sans feuille, la demande évaporative est supposée être plus faible et la teneur en eau du sol plus importante. On aurait donc pu s'attendre à avoir des différences

de vulnérabilité à la cavitation au cours de l'année. Ce qui n'est pas le cas, car les changements dans l'anatomie du xylème ne peuvent se produire que lors de la formation du bois. Par ailleurs nous avons constaté qu'il n'y a pas de modification de la vulnérabilité à la cavitation au cours des 10 semaines de stockage dans le noir et à l'humidité (Figure 11b). Cela s'explique par le fait que la vulnérabilité à la cavitation est conditionnée par les conditions environnementales prépondérantes lors de la formation des vaisseaux du xylème. Ceci est confirmé par une étude récente qui a montré que des clones de peupliers poussant sous différents régimes hydriques présentaient des différences de vulnérabilité à la cavitation (Awad *et al.*, 2010). Awad *et al.* (2010) ont fait pousser des clones de peuplier hybride (*Populus tremula* x *Populus alba*) sous trois régimes hydriques différents, et ont montré que les clones sous le régime hydrique le moins favorable étaient les moins vulnérables à la cavitation. Ce faisceau d'observation indique que la vulnérabilité à la cavitation est donc bien conditionnée par l'environnement lors de la formation des vaisseaux. Ainsi, un événement climatique comme une gelée tardive ou une petite sécheresse ayant lieu au printemps au moment de la formation du bois et des vaisseaux, peut directement influencer sur les cellules subissant une différenciation et donc modifier la vulnérabilité à la cavitation des conduits du xylème.

Dans cette étude, nous avons montré une grande variabilité de la vulnérabilité à la cavitation du hêtre. La vulnérabilité à la cavitation varie en fonction des gradients géographiques et dans une moindre mesure des gradients altitudinaux (Figure 14 et 15). La plus grande différence est trouvée entre deux populations de deux sites différents (1.37 MPa) (Figure 14). On peut penser que cette variabilité intra-spécifique peut être attribuée à la grande amplitude écologique du hêtre, ou bien que c'est justement cette variabilité intra-spécifique qui a permis au hêtre d'occuper une large gamme d'habitats. En effet l'aire de répartition du hêtre est importante en Europe, on le trouve aussi bien au sud des pays scandinaves où les hivers sont rigoureux, qu'en Italie sous un climat méditerranéen plus sec (Figure 7). Cependant, *Pinus sylvestris*, qui possède comme le hêtre une large aire de distribution et qui est à peu près aussi sensible que le hêtre ( $P_{50} = -3.5$  MPa pour le pin sylvestre et  $P_{50} = -3.6$  MPa pour le hêtre, Figure 6), a montré une variabilité limitée de la vulnérabilité à la cavitation entre et au sein de populations (Martinez-Vilalta *et al.*, 2009). Les différences entre les populations de hêtre peuvent être dues à la plasticité phénotypique en fonction des conditions environnementales ou à la variabilité génétique. D'après Hamrick (2004), pour la plupart des traits physiologiques il y a peu de variabilité génétique entre les

populations. Ceci suggère que les facteurs environnementaux jouent un rôle majeur dans les variations de vulnérabilité à la cavitation observées entre populations. Nous avons trouvé que les populations de hêtre du nord-est de la France étaient plus résistantes à la cavitation que les populations du sud-est (Figure 14). Bien que nous ne connaissions pas parfaitement l'origine génétique des différentes populations, ces résultats sont inattendus. En effet les populations du sud de la France se trouvent à la limite naturelle de l'aire de distribution du hêtre sous climat méditerranéen (Parelle *et al.*, 2006). Cette aire est caractérisée par ses longues sécheresses, ce qui n'est pas favorable à la croissance et la survie des hêtres. Des études portant sur le hêtre (Garcia-Plazaola & Becerril, 2000 ; Rose *et al.*, 2009) ont montré une plus grande tolérance à la sécheresse des populations du sud parallèlement à une augmentation du ratio entre la masse de racine et la masse de tige pour les arbres matures de ces populations. Garcia-Plazaola & Becerril (2000) ont montré que la tolérance au stress hydrique est principalement liée à des adaptations morphologiques, à savoir la réduction de la surface foliaire et une diminution du ratio surface foliaire / racine fine. Rose *et al.* (2009) ont observé qu'une population marginale de hêtres poussant sous un climat subcontinental à continental avec de fortes probabilités de sécheresse en été est mieux adaptée à la sécheresse qu'une population poussant sous climat sub-océanique au centre de l'Allemagne. Les hêtres de la population marginale ont des faines avec une masse beaucoup plus importante, ce qui augmente les chances de survivre à une sécheresse durant la première année de croissance. Les arbres de la population marginale conservent un plus haut ratio masse de racine / masse de tige sous stress hydrique que les arbres de la population du centre de l'Allemagne. On peut expliquer la discordance que nous avons observée entre la vulnérabilité à la cavitation et la localisation des populations par le fait que la vulnérabilité à la cavitation n'est pas le seul trait à intervenir dans la résistance à la sécheresse et que d'autres processus ont pu être privilégiés. On peut faire le même constat avec *Populus euphratica*, une des espèces les plus vulnérables à la cavitation ( $P_{50} = - 0.70$  MPa), qui est pourtant capable de pousser sous des climats arides. Hukin *et al.* (2005) explique cette capacité par le fait que *Populus euphratica* est capable d'accéder aux nappes d'eau profondes. On peut supposer que les plus faibles valeurs de  $P_{50}$  observées dans les populations du nord-est de la France, peuvent résulter d'une acclimatation aux gelées tardives et donc à l'embolie hivernale. L'environnement peut en effet, avoir un impact sur la structure du xylème lors de sa formation (Plavcova *et al.* 2011).

En conclusion, nous avons observé que d'une part la vulnérabilité à la cavitation ne varie pas beaucoup au cours de la saison (Figure 13), et que d'autre part il n'y a pas de

modification de la vulnérabilité à la cavitation au cours des 10 semaines de stockage dans le noir et à l'humidité (Figure 11b). Cela peut s'expliquer par le fait que la vulnérabilité à la cavitation est conditionnée par les conditions environnementales prépondérantes lors de la formation des vaisseaux du xylème. Nous avons aussi montré qu'il existe une variabilité à la cavitation entre les arbres poussant sur les deux faces d'exposition du Mont Ventoux. Cette variabilité est supérieure à la variabilité observée le long d'un gradient altitudinal. Il semble donc que l'exposition à la lumière joue un rôle prépondérant. En effet les populations poussant à 1520 m d'altitude sur la face nord du Mont Ventoux ont des vulnérabilités à la cavitation similaires aux hêtres poussant sur toute la face sud du Mont Ventoux. On peut supposer que les populations de la face sud et celles qui se trouvent presque au sommet sont assez bien exposées au soleil contrairement aux populations de la face nord. Les effets dus à l'exposition et à l'altitude sont complexes et impliquent de nombreux facteurs covariants, tels que la topographie, le sol, les variables climatiques comme les précipitations, l'ensoleillement et le vent (Austin et al., 1996).

## Article 1 :

Papier publié dans Tree Physiology en 2010.

### **Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L. : phenotypic and environmental sources of variability**

Séphane HERBETTE, Rémi WORTEMANN, Hosam AWAD, Roland HUC, Hervé COCHARD et Tété Sevérien BARIGAH.

#### Summary :

Xylem vulnerability to cavitation is a key parameter in understanding drought resistance of trees. We determined the xylem water pressure causing 50% loss of hydraulic conductivity ( $P_{50}$ ), a proxy of vulnerability to cavitation, and we evaluated the variability of this trait at tree and population levels for *Fagus sylvatica*. We checked for the effects of light on vulnerability to cavitation of stem segments together with a time series variation of  $P_{50}$ . Full sunlight-exposed stem segments were less vulnerable to cavitation than shade-exposed ones. We found no clear seasonal change of  $P_{50}$ , suggesting that this trait was designed for a restricted period.  $P_{50}$  varied for populations settled along a latitudinal gradient, but not for those sampled along an altitudinal gradient. Moreover, mountainside exposure seemed to play a major role in the vulnerability to cavitation of beech populations, as we observed the differences along north-facing sides but not on south-facing sides. Unexpectedly, both north-facing mountainside and northern populations appeared less vulnerable than those grown on the southern mountainside or in the South of France. These results on beech populations were discussed with respect to the results at within-tree level.

Keywords: drought tolerance, European beech, hydraulic, phenotypic plasticity, populations, xylem embolism.



## 2<sup>nde</sup> partie : Variabilité génétique et plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation

Ayant déterminé des sources de variation de la vulnérabilité à la cavitation dans la première partie, nous allons maintenant nous intéresser aux parts de la variabilité génétique et de la plasticité phénotypique dans la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Wortemann *et al.* 2011).

### *La variabilité génétique neutre*

La variabilité génétique neutre a été abordée par l'analyse de 90 géotypes issus de six populations. L'AMOVA (analyse de la variance moléculaire) (Excoffier & Lischer, 2010) montre que 89% de la variabilité génétique est expliquée par les variations intra-populationnelles avec une relativement petite différenciation génétique entre populations. Les marqueurs chloroplastiques ne révèlent aucune structure géographique ni de différences entre les populations. Si nous avons détecté des différences dans la vulnérabilité à la cavitation du xylème entre les populations, alors elles auraient pu être attribuées à de l'adaptation par sélection naturelle, ce qui n'est pas le cas.

### *Variabilité de la vulnérabilité à la cavitation du xylème au sein et entre populations.*

La variabilité de la vulnérabilité à la cavitation chez le hêtre est déterminée par l'établissement de courbes de vulnérabilité de dix individus de 17 populations établies dans la plantation française de Lyons-la-Forêt. Le  $P_{50}$  moyen pour toutes les populations est relativement constant (de -2.8 à -3.2 MPa avec un CV de 4.12 %) et n'est pas significativement différent entre populations ( $F = 1.21$ ,  $p = 0.27$ ) (Figure 16). Il est intéressant de noter qu'aucune corrélation n'a été observée entre ces valeurs de  $P_{50}$  et la moyenne des précipitations annuelles des zones d'origine des populations ( $r^2 = 0.0159$ ,  $p = 0.62$ ) (tableau 2). De même, aucune différence significative n'a été détectée entre les populations dans les deux autres plantations comparatives (plantation espagnole  $F = 1.49$ ;  $p = 0.22$  et plantation

slovaque  $F = 1.08$ ;  $p = 0.38$ ; Figure 17). Toutefois, dans les 3 plantations, au sein de chaque population, on trouve un éventail de valeur de  $P_{50}$  important (CV de 12.6 %), avec une différence pouvant aller jusqu'à 1 MPa entre les deux individus extrêmes d'une population.

*Plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation du xylème.*

Les valeurs de  $P_{50}$  mesurées sur différentes branches de lumière d'un même arbre sont proches, ce qui indique une relativement faible variabilité au sein d'un même arbre (CV moyen 9.6 %). Etant donné que la variabilité intra-arbre (CV = 9.6 %) est inférieure à la variabilité existante entre les arbres d'une même population (CV = 12.9 %), on considère que les différences entre les arbres d'une population donnée sont significatives. La plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation est déterminée en comparant les courbes de vulnérabilité de 15 à 20 individus de six populations plantées dans les trois sites différents (Espagne, Slovaquie et France), avec des conditions climatiques différentes (tableau 2). Des différences significatives ( $F = 20.62$ ,  $p = 0.00$ ) ont été trouvées entre les plantations concernant la vulnérabilité à la cavitation de l'ensemble des populations (Figure 17b). Cependant, l'existence d'une interaction plantation-population ( $F = 2.45$ ,  $p = 0.01$ ) indique que cet effet plantation est variable suivant la population (Figure 17a). Globalement, nos résultats indiquent que 82.4% de la variance totale du  $P_{50}$  est intra-populationnelle, que 10.5% de cette variance est attribuable à un effet site, et que 6.2% de la variance est du à une interaction population-site et seulement 0.9% de la variance est du à un effet population (Tableau 4).

	df	MS	F	p	% var
Plantation	2	2.063	20.61	0.000000	10.5%
Population	5	0.068	0.68	0.639834	0.9%
Plantation × Population	10	0.245	2.45	0.007869	6.2%
Intra-population	324	0.100			82.4%

Tableau 4 : ANOVA à deux facteurs de la vulnérabilité à la cavitation des six populations des trois plantations. Avec df : le degré de liberté, MS : l'erreur quadratique moyenne, F : la valeur statistique, p : la probabilité, et %var : la part de la variance totale.

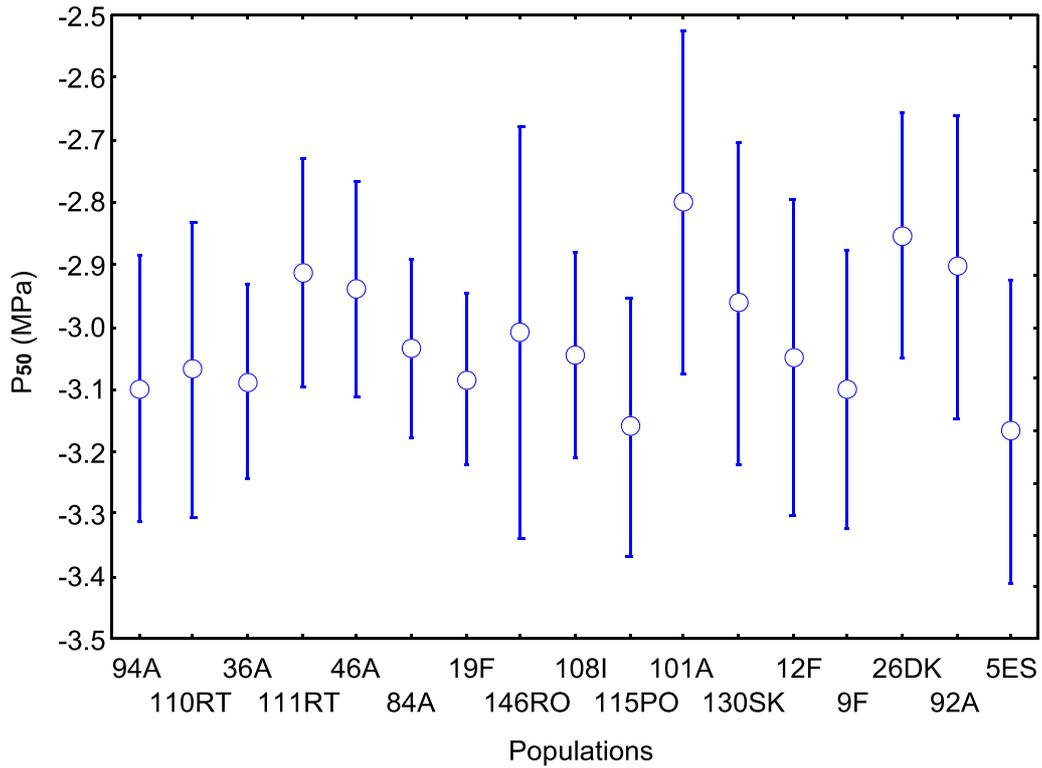


Figure 16 :  $P_{50}$  moyen de chacune des 17 populations, les cercles représentent la moyenne et les barres l'intervalle de confiance à 95%. Les informations concernant les populations ainsi que leurs localisations sont indiquées dans le tableau 2.

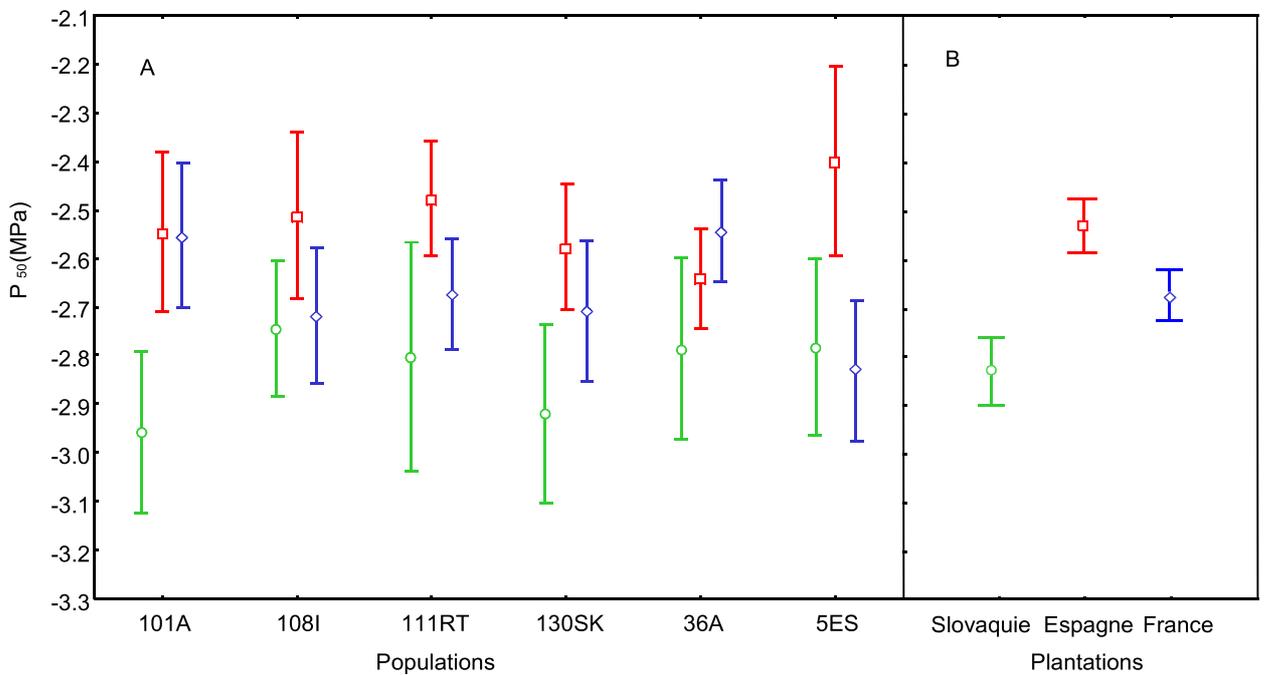


Figure 17 : Moyenne de  $P_{50}$  par population (A) et par plantation (B), les barres représentent l'intervalle de confiance à 95 %. Les valeurs de  $P_{50}$  du site espagnol sont en rouge, celles du site slovaque en vert et celles du site français en bleu.

## *Discussion*

Dans cette étude nous avons exploité des plantations comparatives. Ce type de dispositif est intéressant pour mettre en évidence la variabilité génétique d'un trait donné. En effet, les populations étant soumises au même environnement, la variabilité environnementale et par conséquent la variabilité phénotypique de ce trait sont minimisées. Nous considérons donc que la variabilité entre populations, mesurée dans une même plantation, reflète les différences génétiques entre les différentes populations pour la vulnérabilité à la cavitation. Nos résultats montrent qu'il n'existe pas de différences significatives de la vulnérabilité à la cavitation entre les populations (Tableau 4). Ces résultats sont en accord avec ceux de Corcuera *et al.* (2011). Ces auteurs ont étudié la vulnérabilité à la cavitation de six populations de pins maritimes et montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les populations en ce qui concerne le  $P_{50}$  (Anova  $F = 1.82$   $p = 0.1125$ ). Lamy *et al.* (2011) ont également travaillé sur le pin maritime et ont testé six populations. Ils n'ont pas trouvé de différences significatives entre les populations concernant la vulnérabilité à la cavitation ; ils obtiennent un coefficient de variation de la vulnérabilité à la cavitation entre populations de 1%. Pour expliquer cette absence de variabilité entre populations, Lamy *et al.* (2011) ont proposé que le manque de différenciation génétique pour la vulnérabilité à la cavitation entre des populations de pins, était une indication d'une « sélection stabilisante », canalisant ce trait et amortissant sa variation génétique. La « sélection stabilisante » est un mode de sélection naturelle qui élimine les individus au phénotype extrême. On peut supposer l'existence d'un même mécanisme chez le hêtre.

Dans notre étude nous avons observé une grande variabilité des valeurs de  $P_{50}$  au sein de chaque population (au moins 80% de la variabilité totale). Nos résultats sur la vulnérabilité à la cavitation indiquent que l'absence de différence significative entre populations peut s'expliquer par une importante variabilité intra-populationnelle. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Hamrick (2004), qui a observé que pour la plupart des traits les différences entre les populations sont limitées, et que ces traits présentent une forte variabilité intra-populationnelle. Dans son étude sur plus de 200 espèces d'arbres, Hamrick (2004) observe que plus de 90% de la diversité génétique est intra-populationnelle. Nos conclusions sont étayées par notre analyse de la diversité génétique des ADN chloroplastiques qui montre que la majorité de la variabilité génétique neutre est située au sein de chaque population, et qu'il y a peu de variabilité génétique pour ces marqueurs entre les populations. Ces résultats sont

cohérents avec ceux que l'on peut trouver dans la littérature. Leonardi & Menozzi (1995) ont étudié la variabilité génétique de 21 populations de hêtre en Italie grâce à une analyse par électrophorèse de 9 systèmes enzymatiques. Ils ont montré que la différenciation génétique entre populations est faible, 95% de la variabilité étant trouvée au sein des populations. Papageorgiou *et al.* (2008) et Hatziskakis *et al.* (2009) ont analysé la variation génétique du hêtre en Grèce en utilisant des marqueurs microsatellites chloroplastiques (ccmp4 , ccmp7 et ccmp10). Ces deux études mettent en évidence un haut niveau de diversité génétique au sein des populations. Buiteveld *et al.* 2007 ont travaillé sur la diversité génétique du hêtre en Europe à l'aide de marqueurs microsatellites (FS1-15, FS4-46, FS1-25 et mfc5, d'après Pastorelli *et al.*, 2003). Les populations sont situées aux Pays-Bas en Allemagne, en Autriche, en Italie et en France. La majorité de la diversité génétique est observée en intra-population et une petite, mais significative, différenciation existe entre les populations ( $F_{st} = 0.058$ ). Borghetti *et al.* (1993) parviennent à des conclusions différentes suite à l'analyse de 4 populations de hêtre en Italie à l'aide de 10 marqueurs enzymatiques. Ils trouvent que les populations sont significativement différentes. Une autre étude arrive à des conclusions intermédiaires, qui ne s'opposent pas à nos observations. En effet, Magri *et al.* (2006) analysent des populations de hêtre en Europe en utilisant à la fois des données génétique et paléobotaniques. Il apparaît que les populations de hêtre du centre, de l'est et du nord de l'Europe ont une structure génétique très homogène. Par contre les populations de hêtre du sud de l'Europe ne sont pas homogènes et des différences significatives apparaissent entre les populations du sud de la France, de l'Italie, de l'Espagne et de la péninsule des Balkans.

Nous avons mis en évidence que des populations de hêtres cultivées dans des sites différents présentent une vulnérabilité à la cavitation contrastée. On peut supposer que ces variations ne sont pas causées par un biais génétique, car le même pool de semences a été réparti au hasard entre les différents sites. Elles reflètent probablement d'avantage la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation du hêtre. La vulnérabilité à la cavitation chez les arbres est connue pour présenter une importante plasticité phénotypique en réponse aux variations environnementales. Dans une couronne de hêtre par exemple, le régime lumineux a un fort impact sur la vulnérabilité à la cavitation de la branche (Cochard *et al.*, 1999 ; Herbette *et al.*, 2010). De même, la vulnérabilité à la cavitation peut être influencée par la sécheresse du sol (Beikircher & Mayr, 2009 ; Awad *et al.* 2010). Beikircher *et al.* (2009) se sont intéressés à la vulnérabilité à la cavitation de *Ligustrum vulgare* et *Viburnum lantana* dans des conditions hydriques contrastées. Ils ont trouvé que les plants stressés sont plus

résistants à la cavitation que ceux s'étant développé sur un milieu bien irrigué. Awad *et al.* (2010) ont étudié la vulnérabilité à la cavitation d'un hybride de peuplier *Populus tremula* x *Populus alba*, sous trois régimes hydriques différents. Sous régime hydrique favorable (70-100 % de la capacité au champ), les peupliers sont plus vulnérables à la cavitation ( $P_{50} = -1.82$  MPa) que ceux poussant sous stress hydrique modéré (40-75 % de la capacité au champ), avec un  $P_{50}$  de -2.03 MPa. Les arbres les plus stressés (25-45 % de la capacité au champ) sont les moins vulnérables à la cavitation ( $P_{50} = -2.45$  MPa). Dans notre étude, « l'effet plantation » représente environ 10% de la variabilité totale du  $P_{50}$ . Les arbres plantés en Espagne sont les plus vulnérables à la cavitation, et ceux cultivés en Slovaquie les moins vulnérables. Nous n'avons pas pu clairement attribuer cette plasticité aux variables climatiques à notre disposition. En effet, la plantation espagnole a reçu plus de précipitations que les deux autres (France, Slovaquie), mais la différence est minime entre ces deux dernières plantations. Cela indique que la plasticité phénotypique du hêtre est sous contrôle environnemental complexe, et que d'autres travaux sont nécessaires pour comprendre comment les conditions pédoclimatiques locales façonnent la structure et la fonction du xylème. En effet, la structure du xylème peut être affectée par différents paramètres environnementaux. Wodzicki (2001) suggère que la qualité de l'air influe sur la densité du bois. Dans les zones où l'air est pollué (oxydes de soufre et oxydes d'azote), les pins sylvestres ont un bois moins dense que ceux de zones moins polluées ; cet effet est d'autant plus important que les arbres sont jeunes. Par ailleurs, l'effet de la température sur l'anatomie du bois d'*Eucalyptus grandis* a été analysé (Thomas *et al.*, 2007). En plaçant les eucalyptus sous différents régimes de températures (10, 20, 25, 30 et 35°C), il apparaît que le nombre de vaisseaux diminue avec l'augmentation de la température. De plus, la proportion de vaisseaux de xylème avec un diamètre supérieur à 45  $\mu\text{m}$  augmente entre le traitement à 10°C et le traitement à 25°C, cette densité diminue ensuite avec l'augmentation de la température et devient nulle à 35°C. L'effet d'un stress salin sur la différenciation du xylème de *Populus canescens* a aussi été suivi (Escalante-Pérez *et al.* 2009). Le stress salin provoque une augmentation du nombre de vaisseaux formés (150 vaisseaux /  $\text{mm}^2$  pour les plantes stressées contre 60 vaisseaux /  $\text{mm}^2$  pour les contrôles). Par contre la taille de la lumière des vaisseaux est moins importante sous stress salin (200  $\mu\text{m}$  en condition de stress contre 350  $\mu\text{m}$  chez les témoins).

La plasticité de la vulnérabilité à la cavitation que nous avons observée chez le hêtre peut être en partie sous contrôle génétique, comme le suggère la faible mais significative interaction existant entre site et population (6% de la variance totale). Fichot *et al.* (2010), ont également montré que la plasticité phénotypique chez le peuplier est fortement dépendante du génotype. Dans cette dernière étude le degré de plasticité au sein des populations ne pouvait pas non plus être relié aux variables climatiques locales.



## Article 2 :

Papier publié dans Tree Physiology en 2011.

# **Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe**

Rémi WORTEMANN, Stéphane HERBETTE, Tété Sévérien BARIGAH, Boris FUMANAL, Ricardo ALIA, Alexis DUCOUSSO, Dusan GOMORY, Patricia ROECKEL-DREVET et Hervé COCHARD

## Summary :

Xylem cavitation resistance is a key physiological trait correlated with species tolerance to extreme drought stresses. Little is known about the genetic variability and phenotypic plasticity of this trait in natural tree populations. Here we measured the cavitation resistance of 17 *Fagus sylvatica* populations representative of the full range of the species in Europe. The trees were grown in three field trials under contrasting climatic conditions. Our findings suggest that the genotypic variability of cavitation resistance is high between genotypes of a given population. By contrast, no significant differences were found for this trait across populations, the mean population cavitation resistance being remarkably constant in each trial. We found a significant site effect and a significant site × population interaction, suggesting that cavitation resistance has a high phenotypic plasticity and that this plasticity is under genetic control. The implications of our findings for beech forest management in a context of climate change are discussed.

Keywords : common garden experiment, *Fagus sylvatica* L., genetic variability, P<sub>50</sub>, phenotypic plasticity, vulnerability to cavitation.



### 3<sup>ème</sup> partie : Relations entre vulnérabilité à la cavitation et d'autres traits physiologiques

La vulnérabilité à la cavitation est un paramètre de résistance à la sécheresse, mais à lui seul il ne permet pas d'identifier les populations de hêtre les mieux adaptées à la sécheresse. D'autres paramètres doivent donc être pris en considération. En effet, la résistance des plantes à la sécheresse est pilotée par un ensemble complexe de traits interagissant entre eux, comme la conductivité hydraulique, la résistance à la cavitation, le diamètre de vaisseaux, la surface foliaire, le contrôle stomatique ou encore la profondeur d'enracinement, etc... (Pinol & Sala, 2000 ; Martines-Vilalta *et al.*, 2002 ; Ackerly, 2004). Actuellement nous connaissons bien la variabilité de ces traits entre espèces (Pockman & Sperry, 2000 ; Maherali *et al.*, 2004 ; Jacobsen *et al.* 2007a,b). Les connaissances sur les relations et interactions entre ces différents traits sont aujourd'hui largement basées sur des études à l'échelle inter-spécifique. Les espèces résistantes à la cavitation ont un bois plus dense (Maherali *et al.*, 2004 ; Jacobsen *et al.* 2007). L'interaction entre efficacité et sûreté du xylème est également rapportée ; plus le système hydraulique est efficace, moins il est résistant à la cavitation (Hacke *et al.*, 2009). Toutes ces relations sont peu étudiées au niveau intra-spécifique, néanmoins quelques études récentes existent (Martinez-Vilalta *et al.*, 2009 ; Fichot *et al.* 2010 ; Lauri *et al.*, 2011 ; Sterck *et al.*, 2011). Notre étude s'inscrit dans la même logique de compréhension de ces relations entre traits au niveau intra-spécifique et porte sur l'espèce *Fagus sylvatica* L..

Pour commencer, nous sommes partis d'un modèle conceptuel (Figure 18) illustrant les différentes relations et interactions putatives entre les différents traits que nous avons mesurés dans notre étude : la résistance à la cavitation ( $P_{50}$ ), la conductivité spécifique (Ks), le diamètre hydraulique (Dh), la densité du bois ( $\rho_{\text{bois}}$ ) et la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta$ ) qui est un proxy de l'efficacité d'utilisation de l'eau (Tableau 5). Ce modèle conceptuel est adapté de celui proposé par Sterck *et al.* (2011). Pour produire ce modèle, nous avons émis des hypothèses concernant les relations pouvant exister entre les différents paramètres testés.

Nous supposons que le diamètre hydraulique est corrélé à la densité du bois et qu'il influence directement la conductivité spécifique (Zimmermann 1983). Nous supposons de plus que lorsque le diamètre hydraulique augmente, la conductivité spécifique augmente également au contraire de la densité du bois.

Si l'hypothèse du « germe rare » est correcte (Choat *et al.*, 2003, 2004 ; Wheeler *et al.*, 2005 ; Hacke *et al.*, 2009), nous nous attendons à ce que les branches présentant un diamètre hydraulique plus important soient les plus vulnérables à la cavitation (Pittermann *et al.*, 2006 ; Hacke *et al.*, 2009 ; Markesteijn *et al.*, 2011). Les vaisseaux de fort diamètre ont une surface de paroi plus étendue donc, un nombre de ponctuation plus important. Ainsi, la présence de grands pores est plus probable augmentant alors le risque de cavitation. (Choat *et al.* 2003,2004). Si les relations entre la densité du bois et la vulnérabilité à la cavitation sont validées, les branches qui ont la densité de bois la plus importante doivent être moins vulnérables à la cavitation (Hacke *et al.*, 2001 ; Maherali *et al.*, 2004 ; Pratt *et al.*, 2007 a,b).

Enfin, nous avons testé si des relations existent entre la discrimination isotopique du carbone et les autres paramètres. Nous nous attendons à une relation positive entre la conductivité hydraulique spécifique et la discrimination isotopique du carbone. En effet, un  $K_s$  élevé peut favoriser des conductances stomatiques élevées et, par conséquent, une discrimination du carbone 13 plus forte. Nous pensons qu'il existe une interaction entre la vulnérabilité à la cavitation et la discrimination isotopique du carbone. Les arbres les moins vulnérables à la cavitation devraient être les arbres ayant la discrimination isotopique du carbone la plus importante. En effet, nous pensons que les arbres les moins vulnérables sont capables de supporter les plus fortes tensions dans le xylème et donc une transpiration importante. Si la transpiration est importante, la conductance stomatique l'est également (Mengistu *et al.*, 2011 ; Patane 2011) et donc la discrimination isotopique du carbone doit être élevée. Or, plus une plante a une discrimination isotopique élevée, moins son efficacité d'utilisation de l'eau est importante (Guehl *et al.*, 1995 ; Cregg *et al.*, 2000 ; Ducrey *et al.*, 2008).

Pour tester ces hypothèses, nous avons exploité les plantations française, slovaque et espagnole (Tableau 2). Les analyses de vulnérabilité à la cavitation, ainsi que celles de la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta$ ) et de la densité du bois ( $\rho_{\text{bois}}$ ), ont été réalisées sur 15 à 20 arbres issus de 6 populations, et ceci dans les trois plantations. Les analyses anatomiques et d'efficacité hydraulique ont été effectuées sur un moins grand nombre d'individus (3 à 5) par population. Cette limitation du nombre d'individus est due au temps important nécessaire pour réaliser ces analyses.

Symbole	Définition	Unités
$\Delta$	Discrimination isotopique du carbone	‰
$P_{50}$	Tension causant 50% de perte de conductivité	MPa
Dh	Diamètre hydraulique	$\mu\text{m}$
Ks	Conductivité spécifique	$\text{Kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}$
$\rho_{\text{bois}}$	Densité du bois	$\text{g cm}^{-3}$

Tableau 5 : Liste des paramètres étudiés.

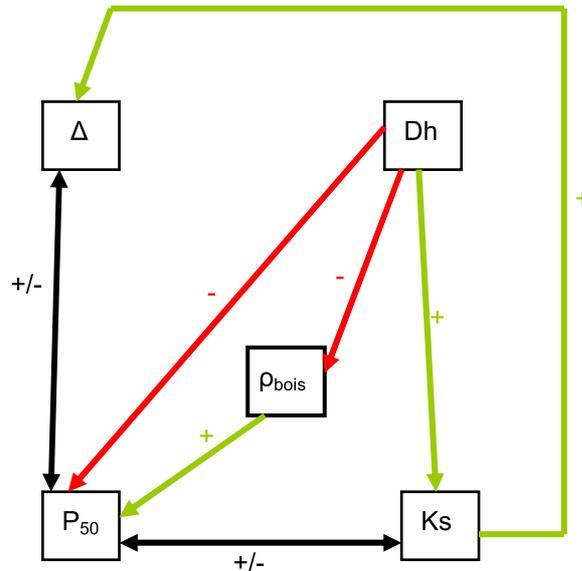


Figure 18 : Modèle conceptuel des relations entre les différents paramètres ( $P_{50}$ ,  $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks). Les relations positives sont en vert les négatives en rouge et les interactions en noir.

Paramètres	Anova			
	CV inter	CV intra	F	$p$
$P_{50}$	-13%	-12.5%	19.39	0.000
$\Delta$	4%	3.8%	3.90	0.021
$\rho_{\text{bois}}$	8%	7.5%	151.30	0.000
Dh	13%	13%	24.45	0.000
Ks	46%	46.6%	15.70	0.000

Tableau 6 : Variations observées entre populations et au sein des populations (exprimées à l'aide de coefficients de variation CV inter et CV intra respectivement) et résultats de l'ANOVA à un facteur testant l'effet site.

	P <sub>50</sub>	$\Delta$	$\rho_{\text{bois}}$	Dh	Ks
P <sub>50</sub>	1.00				
$\Delta$	-0.17	1.00			
$\rho_{\text{bois}}$	0.02	-0.05	1.00		
Dh	0.19	0.02	-0.36	1.00	
Ks	0.09	0.05	-0.32	0.83	1.00

Tableau 7 : Matrice de corrélation entre les différents traits testés (P<sub>50</sub>,  $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks) avec  $p < 0.050$ , en rouge les relations significatives.

### *Variations des différents traits.*

Pour chacun des traits nous avons effectué une ANOVA à un facteur afin de tester l'effet site ; nous avons également calculé pour chacun des paramètres un coefficient de variation en inter-population et en intra-population (Tableau 6). Pour tous les paramètres testés (P<sub>50</sub>,  $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks), nous avons pu mettre en évidence un effet site significatif (Tableau 6), ce qui implique que pour chacun de ces traits la plasticité phénotypique est une source de variabilité. Parmi les différents traits testés, la conductivité spécifique est particulièrement variable puisque son coefficient de variation est proche de 50%, aussi bien à l'échelle intra-populationnelle qu'à l'échelle inter-populationnelle. La vulnérabilité à la cavitation et le diamètre hydraulique montrent une variabilité proche de 10 % (CV = 13%). La densité du bois et la discrimination isotopique du carbone varient peu (CV < 10%) (Tableau 6). Il y a très peu de différences entre les coefficients de variation mesurés au niveau intra-populationnel et ceux mesurés au niveau inter-populationnel.

### *Relations entre les différents traits*

La vulnérabilité à la cavitation n'a aucune relation significative avec l'un des autres traits testés ( $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks) à  $p < 0.050$ . Aucune relation significative n'a pu être mise en évidence entre la discrimination isotopique du carbone et les autres paramètres (P<sub>50</sub>,  $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks). Le diamètre hydraulique est corrélé négativement avec la densité du bois (-0.36 à  $p < 0.050$ ). La conductivité hydraulique est également corrélée négativement avec la densité du bois (-0.32 à  $p < 0.050$ ). Nous avons détecté une corrélation positive entre le diamètre hydraulique et la conductivité hydraulique spécifique (Tableau 7).

## Discussion

Nous avons observé des coefficients de variation (CV) différents entre les traits testés, indiquant que ces traits ne varient pas de la même manière. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Martinez-Vilalta *et al.* (2009). Ces auteurs ont travaillé sur le pin sylvestre et ont rapporté des valeurs de coefficients de variabilité proches des nôtres. Par exemple, pour la discrimination isotopique du carbone ils obtiennent un CV intra-population de 3.39 %, tandis que nous obtenons un CV de 3.8 %. Ils obtiennent un CV important pour la conductivité spécifique (CV = 36.79 %), ce qui est également notre cas (CV = 46 %). De même, les CV de la vulnérabilité à la cavitation et de la densité du bois sont également similaires d'une étude à l'autre. De plus, un effet site est détecté pour les différents paramètres dans les deux études. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Sterck *et al.* (2011). Ils ont réalisé une étude sur 12 populations de pin sylvestre et ont mesuré 9 paramètres différents (dont  $P_{50}$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ , Dh, Ks). Ils constatent que tous ces paramètres varient considérablement entre les sites. Ces différences entre sites signifient que les différents paramètres testés présentent une plasticité phénotypique. Il a d'ailleurs été montré que la vulnérabilité à la cavitation est un paramètre plastique (Fichot *et al.*, 2010 ; Awad *et al.*, 2010). Awad *et al.* (2010) ont observé qu'un clone de peuplier présentait des valeurs de  $P_{50}$  significativement différentes en fonction de la contrainte hydrique appliquée lors de sa croissance. Fichot *et al.* (2010) ont obtenu les mêmes résultats avec un hybride de peuplier (*Populus deltoides* x *Populus nigra*). Nous avons montré qu'il y avait une différence significative entre les sites concernant la discrimination isotopique du carbone, ce qui est en accord avec la littérature (Lauteri *et al.*, 2004 ; Brendel *et al.*, 2008). Chez *Castanea sativa*, Lauteri *et al.* (2004) ont observé une plasticité phénotypique de la discrimination isotopique du carbone, et ont démontré que les populations originaires des milieux secs sont les plus plastiques pour ce paramètre. Brendel *et al.* (2008) ont travaillé avec une famille de *Quercus robur* et ont montré une large variabilité phénotypique de la discrimination isotopique du carbone. Cette plasticité phénotypique est également observée pour les traits hydrauliques (Dh et Ks), ainsi que pour la densité du bois.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux relations pouvant exister entre les différents paramètres ; la première hypothèse que nous avons posée était que le diamètre hydraulique influe directement sur la conductivité spécifique. Cette hypothèse est vérifiée puisqu'il existe une relation significative entre le diamètre hydraulique et la conductivité spécifique (Tableau 7). Ceci est cohérent avec la loi Hagen-Poiseuille selon laquelle l'efficacité hydraulique augmente avec la puissance 4 du diamètre des vaisseaux (Equation

15, Tyree & Zimmermann 2002). Lauri *et al.* (2011) observent également une relation positive entre le diamètre hydraulique et la conductivité spécifique ( $r = 0.51$  à  $p < 0.010$ ) chez une descendance de pommiers. Sterck *et al.* (2011) sont arrivés aux mêmes observations chez le pin sylvestre ( $p < 0.050$ ).

La deuxième hypothèse était que le diamètre hydraulique est corrélé à la densité du bois. Nous vérifions également cette hypothèse, en effet plus le diamètre hydraulique est important, moins le bois est dense (tableau 6). Ceci était attendu car pour une surface donnée de vaisseau, un diamètre hydraulique plus important signifie une surface de lumière du vaisseau plus importante pour une surface de paroi de vaisseau moins importante donc une densité du bois moins importante. Cette conclusion est cohérente avec les études de Fichot *et al.* (2010) et Martinez-Vilalta *et al.* (2009). Fichot *et al.* (2010) ont observé que chez l'hybride *Populus deltoides* x *Populus nigra*, lorsque le diamètre hydraulique diminue, la densité du bois augmente ( $p < 0.050$ ). De même, Martinez-Vilalta *et al.* (2009) ont observé une relation négative entre le diamètre des trachéides et la densité du bois chez le pin sylvestre.

Nous avons ensuite vérifié l'existence de la relation, entre les différents paramètres hydrauliques et la vulnérabilité à la cavitation. Nous avons supposé qu'une densité du bois plus importante induisait une plus forte résistance à la cavitation. Nos résultats ne concordent pas avec cette hypothèse puisque l'on n'observe aucune relation significative entre la vulnérabilité à la cavitation et la densité du bois (Tableau 6). Ces résultats sont surprenant au regard de certaines études (Hacke *et al.*, 2001 ; Jacobsen *et al.*, 2005 ; Pratt *et al.*, 2007b ; Jacobsen *et al.*, 2009 ). Pratt *et al.* (2007b) ont travaillé sur 9 espèces ligneuses et montrent une relation significative entre le  $P_{50}$  et la densité du bois ( $r^2 = 0.79$ ). A partir de 15 espèces ligneuses Jacobsen *et al.* (2009) ont observé une relation significative entre le  $P_{50}$  et la densité du bois ( $r^2 = 0.40$  à  $p < 0.050$ ). Il apparaît que les espèces les moins vulnérables à la cavitation sont celles qui ont le bois le plus dense. La densité du bois est directement liée à l'épaisseur des parois, plus les parois sont épaisses plus le bois est dense. D'après les auteurs, l'augmentation de l'épaisseur des parois des vaisseaux permet une résistance mécanique plus importante aux tensions présentes dans le xylème, et une plus grande résistance à la cavitation. Cependant nos résultats sont en accord avec Fichot *et al.* (2010), qui ne trouvent pas non plus de relation entre la densité du bois et la vulnérabilité à la cavitation chez des hybrides de peuplier (*Populus deltoides* x *Populus nigra*). Il est intéressant de noter que les études de Hacke *et al.* (2001), Jacobsen *et al.* (2005, 2009) et Pratt *et al.* (2007) ont été effectuées au niveau inter-spécifique alors que notre étude et celle de Fichot *et al.* (2010) ont

été réalisées au niveau intra-spécifique. Cela peut signifier que la densité du bois et la vulnérabilité à la cavitation sont au moins partiellement découplées, si on se place à une échelle d'étude plus restreinte (Fichot *et al.* 2010).

Nous avons supposé qu'il existait une relation entre la conductivité hydraulique et la vulnérabilité à la cavitation ainsi qu'entre le diamètre hydraulique et la vulnérabilité à la cavitation. Dans les deux cas, nous ne détectons aucune relation significative entre ces paramètres (Tableau 7). Ces résultats sont en désaccord avec Tyree *et al.* (1994) qui ont mis en évidence un impact négatif du diamètre des vaisseaux, donc du diamètre hydraulique, sur la vulnérabilité à la cavitation. Leur étude portait sur une soixantaine d'espèces d'arbres et buisson. A partir de 18 espèces de conifères, Pittermann *et al.* (2006) ont montré une relation significative entre la conductivité hydraulique et la vulnérabilité à la cavitation ( $r^2 = 0.60$  à  $p < 0.050$ ). De plus, Markesteijn *et al.* (2011) constatent qu'il existe une relation positive entre la vulnérabilité à la cavitation et la conductivité spécifique ( $r^2 = 0.65$  à  $p < 0.050$ ). Leur étude portait sur 13 espèces d'arbres. Hacke *et al.* (2009) ont travaillé sur 22 espèces ligneuses et ont montré que les arbres ayant les plus gros diamètres de vaisseaux étaient les moins résistants à la cavitation ( $r^2 = 0.47$  à  $p < 0.001$ ). Tous ces auteurs expliquent ces relations par l'existence d'un compromis entre la sûreté hydraulique et l'efficacité hydraulique. L'hypothèse du « germe rare » est une explication possible à la relation entre la vulnérabilité à la cavitation et la taille des vaisseaux. Les gros vaisseaux ayant une surface de ponctuation plus importante, la probabilité d'y trouver un pore de grande taille est plus importante, ce qui augmente aussi la vulnérabilité à la cavitation. C'est encore une fois la différence d'échelle d'étude (inter-spécifique et intra-spécifique) qui pourrait expliquer les apparentes contradictions entre les études. En effet, Maherali *et al.* (2006) en étudiant 14 espèces d'arbres (3 conifères et 11 angiospermes dont 7 espèces de chênes) montrent une relation significative entre la conductivité spécifique (Ks) et le P<sub>50</sub> ( $r = -0.77$  à  $p < 0.001$ ). Leurs résultats indiquent également une relation entre le P<sub>50</sub> et le diamètre hydraulique des vaisseaux ( $r = -0.80$  à  $p < 0.001$ ). Cependant, Maherali *et al.* (2006) indiquent aussi que ces relations ne sont plus significatives ( $p < 0.050$ ) lorsqu'ils placent leur étude au niveau d'un seul genre (*Quercus* sp.). Ils suggèrent que les relations détectées entre la vulnérabilité à la cavitation et les caractéristiques du xylème sont dues aux grandes différences en diamètre et en longueur des vaisseaux entre les différents genres. Cette hypothèse conforte nos résultats puisque nous avons travaillé au sein d'une seule espèce. De plus, Fichot *et al.* (2010) ont montré des résultats similaires aux nôtres sur l'hybride de peuplier *Populus deltoides* x *Populus Nigra*. Ils

n'observent aucune relation significative entre la vulnérabilité à la cavitation et la conductivité spécifique ( $p < 0.010$ ). Nos résultats ne mettent pas non plus en évidence un compromis entre l'efficacité hydraulique (Dh et Ks) et la résistance à la cavitation ( $P_{50}$ ) du xylème. De même, sur une descendance de pommiers, Lauri *et al.* (2011) n'ont pas mis en évidence de trade-off entre l'efficacité hydraulique (Dh, Ks) et la sûreté hydraulique ( $P_{50}$ ).

D'après l'hypothèse du germe d'air, l'embolie induite par la sécheresse est reliée aux propriétés membranaires au niveau de la zone de contact entre deux vaisseaux, et non pas liée au diamètre des conduits du xylème (Choat *et al.*, 2003 ; Wheeler *et al.*, 2005 ; Jansen *et al.*, 2009). Choat *et al.* (2003) ont travaillé sur quatre espèces d'arbres et ont montré que la vulnérabilité à la cavitation était corrélée à la taille des pores présents dans la membrane des ponctuations. Plus les pores sont petits, plus l'arbre est résistant à la vulnérabilité à la cavitation. *Cochlospermum gillivrae* Benth. a des pores de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre et un  $P_{50}$  de -1.43 MPa, alors que le  $P_{50}$  de *Austromyrtus bidwilli* Benth. est de -5.12 MPa et le diamètre moyen des pores est de 60  $\mu\text{m}$ . Wheeler *et al.* (2005) ont travaillé sur 16 espèces d'arbres et ont montré qu'il n'y a pas de relation entre le diamètre des vaisseaux et le  $P_{50}$ . Par contre, ils ont mis en évidence une relation entre la surface des ponctuations et la surface des vaisseaux. Plus le nombre de ponctuations est important plus l'arbre est vulnérable à la cavitation. Cependant, nous avons estimé l'efficacité du xylème en mesurant les caractéristiques des vaisseaux à partir de coupes transversales du xylème. Nous n'avons donc pas intégré la conductivité des ponctuations au niveau des jonctions entre les vaisseaux. En ne prenant pas en compte ce paramètre, la relation pouvant exister entre la vulnérabilité à la cavitation et les différents paramètres d'efficacité de transport du xylème est probablement masquée. Ceci pourrait aussi expliquer l'absence de relation entre la vulnérabilité à la cavitation et le diamètre hydraulique d'une part et la conductivité hydraulique d'autre part.

Pour finir, nous avons émis l'hypothèse qu'une relation existait entre la vulnérabilité à la cavitation et la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta$ ). Cependant, nous n'avons observé aucune relation entre ces deux paramètres. Martinez-Vilalta *et al.* (2009) ont trouvé une faible relation positive entre le  $P_{50}$  et  $\Delta$  dans des populations de pins sylvestres, tandis que Maherali *et al.* (2006) n'en ont montré aucune chez 14 espèces d'arbres. Au contraire, Ducrey *et al.* (2008) ont rapporté une forte relation négative entre  $P_{50}$  et  $\Delta$  dans leur étude sur le cèdre du Liban. Fichot *et al.* (2010) ne détectent aucune relation significative entre ces deux paramètres, sauf dans les conditions de stress hydrique où une relation positive ( $r = 0.68$ ) est détectée ( $p = 0.062$ ). Il semble que la coordination fonctionnelle entre la vulnérabilité à la

cavitation et la discrimination isotopique ne soit pas claire ; la discrimination isotopique étant dépendante des échanges gazeux et plus exactement de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et de la conductance stomatique (Guehl *et al.*, 1995 ; Cregg *et al.*, 2000 ; Ducrey *et al.*, 2008). Sur *Pinus ponderosa*, Cregg *et al.* (2000) ont trouvé une corrélation significative entre  $\Delta$  et le rapport A/gs ( $r = - 0.61$  à  $p < 0.001$ ) ; ce rapport correspond au rapport entre l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et la conductance stomatique. Ducrey *et al.* (2008) ont montré que, chez le cèdre du Liban,  $\Delta$  est corrélé au rapport A/gs. En fait, la direction et la force de la relation, entre la vulnérabilité à la cavitation et la discrimination isotopique du carbone, peut dépendre de la variation de la capacité photosynthétique par rapport à la conductance stomatique, ce qui influe sur  $\Delta$ . En effet, Ducrey *et al.* (2008) ont montré que c'est principalement la conductance stomatique qui est liée à  $\Delta$  ( $r^2 = 0.61$  à  $p < 0.050$ ), la relation entre l'assimilation de CO<sub>2</sub> et  $\Delta$  n'étant pas significative. Par contre, Maherali *et al.* (2006) observent que c'est surtout l'assimilation de CO<sub>2</sub> qui est liée à la discrimination isotopique du carbone ( $r = -0.65$  à  $p < 0.050$ ). La relation entre  $\Delta$  et la conductance stomatique est également significative, mais seulement à  $p < 0.10$ . La relation entre  $\Delta$  et P<sub>50</sub> peut également dépendre de la structure du xylème car, comme nous l'avons dit précédemment, la taille des pores au niveau des punctuations peut influencer la vulnérabilité à la cavitation (Choat *et al.*, 2003 ; Wheeler *et al.*, 2005 ; Jansen *et al.*, 2009).

Au départ nous étions partis d'un modèle conceptuel (Figure 18) et nous avons vérifié une à une les hypothèses que nous avons émises. Les relations existantes entre la conductivité spécifique, le diamètre hydraulique et la densité du bois au niveau inter-spécifique ont été vérifiées au niveau intra-spécifique dans notre étude. Par contre nous constatons que les relations et les compromis entre la vulnérabilité à la cavitation et les paramètres hydrauliques (Dh, K<sub>S</sub>,  $\rho_{\text{bois}}$ ) qui existent à l'échelle inter-spécifique, ne sont pas vérifiés à l'échelle intra-spécifique. La relation entre la vulnérabilité à la cavitation et la discrimination isotopique du carbone est complexe. Notre étude n'a pas permis de déterminer le sens de cette relation ni son intensité. Le bilan de cette étude est également présenté sous forme d'un modèle conceptuel (Figure 19). Ces résultats à l'échelle intra-spécifique ne nous permettent pas d'identifier un trade-off entre l'efficacité hydraulique et la sûreté du xylème. Cette absence de trade-off signifie qu'il est plausible de trouver des arbres qui sont à la fois résistants à la cavitation et efficaces dans l'utilisation de l'eau. Identifier de tels arbres serait très intéressant dans des programmes de sélection. Les forestiers auraient alors à leur disposition des arbres

résistants à la sécheresse et auraient la possibilité de maintenir le hêtre dans son aire de répartition actuelle malgré les changements climatiques annoncés.

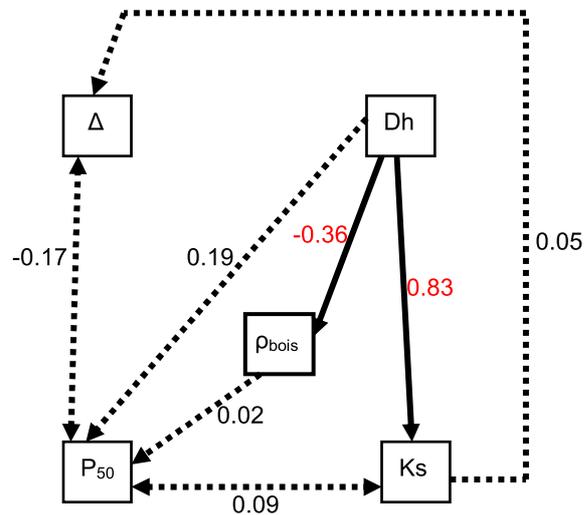


Figure 19 : Modèle conceptuel des relations entre les différents paramètres testés à l'échelle intra-spécifique ( $P_{50}$ ,  $\Delta$ ,  $\rho_{\text{bois}}$ ,  $D_h$ ,  $K_s$ ). Les relations significatives sont représentées par des traits pleins et les relations non significatives sont représentées par des traits en pointillés. Les nombres correspondent aux corrélations, celles qui sont en rouge sont celles qui sont significatives à  $p < 0.050$ .

## Conclusions et perspectives



## ***Conclusions et perspectives***

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier la vulnérabilité à la cavitation du hêtre. Dans ce cadre nous avons voulu répondre à plusieurs questions.

La première était de définir quelles étaient les sources de variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Nous avons testé les variations dues à la méthodologie de mesure de la vulnérabilité à la cavitation. Notre étude a montré que les variations de vulnérabilité à la cavitation au cours du temps sont faibles. Néanmoins, il est préférable d'éviter de récolter les échantillons durant la période de formation du bois. Par ailleurs il est possible de conserver les échantillons sans modifier les mesures, durant au moins un mois. Cela signifie qu'une étude à grande échelle est possible. Nos résultats montrent également que la vulnérabilité à la cavitation peut être variable, aussi bien au sein d'un même arbre qu'entre populations *in situ*. La vulnérabilité à la cavitation semble au moins partiellement régie par les conditions environnementales (sécheresses précoces, gelées tardives, l'exposition à la lumière) présentes lors de la formation du bois et de la différenciation des vaisseaux de xylème.

Nous avons ensuite cherché à décrire la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation au niveau intra-spécifique. Plus particulièrement, l'objectif était de déterminer quelle est la part de la variabilité génétique et la part de la plasticité phénotypique dans la variation de ce caractère. Nos résultats indiquent que la vulnérabilité à la cavitation varie considérablement au sein de chaque population de hêtre. Ils indiquent également que la différenciation génétique entre populations est faible. De plus, il apparaît que la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation est importante entre les plantations, et que le degré de cette plasticité peut varier entre les populations. Cela suggère que l'importante variabilité phénotypique mesurée *in natura* dans la première partie de l'étude (figure 14), est plus probablement causée par la plasticité phénotypique que par la variabilité génétique entre les populations. Cela signifie que les hêtres ont la capacité d'acclimater leurs traits hydrauliques aux conditions pédo-climatiques locales. Ces conclusions sont conformes avec celles récemment formulées chez le pin (Martinez-Vilalta *et al.*, 2009 ; Corcuera *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que ces résultats concordent entre deux espèces pourtant assez éloignées phylogénétiquement et physiologiquement. Par exemple, le hêtre tolère l'ombre alors que le pin est héliophile ; le pin est plutôt une espèce de début de succession alors que le hêtre est une espèce de fin de succession. Ceci suggère que nos

résultats sont peut être génériques et pourraient s'appliquer à de nombreuses espèces d'arbres européens.

Nous avons vu qu'il était illusoire de penser pouvoir identifier des populations de hêtre résistantes à la sécheresse à partir de la vulnérabilité à la cavitation, mais qu'il fallait prendre en compte de nombreux traits physiologiques. Ainsi, nous avons étudié les relations existantes entre la vulnérabilité à la cavitation, des paramètres d'efficacité hydraulique et la discrimination isotopique du carbone. Nous n'avons pas mis en évidence de preuves de relations entre la vulnérabilité à la cavitation et d'autres traits physiologiques. Les populations provenaient toutes de l'aire de répartition du hêtre, donc de zones où les conditions pédo-climatiques sont favorables à la croissance du hêtre. Avec des populations situées en limite de l'aire de répartition, où les conditions environnementales ne sont pas optimales, on travaillerait avec des populations ayant subi une pression de sélection plus importante. Chez ces arbres, les relations que nous voulions mettre en évidence seraient peut être exacerbées, et nous pourrions trouver parmi ces arbres des écotypes de hêtre résistants à la sécheresse. Toutefois, la résistance à la sécheresse des arbres implique de très nombreux paramètres pouvant interagir entre eux. Il est aujourd'hui difficile de comprendre pourquoi des relations mises en évidence à l'échelle interspécifique ne sont pas observées à l'échelle intraspécifique.

Néanmoins notre étude donne des informations importantes pour la gestion des forêts de hêtre dans le contexte des changements climatiques. En effet il est peu réaliste d'espérer identifier un écotype résistant à la sécheresse à partir d'un seul trait physiologique, il faut prendre en compte de nombreux traits. Cependant, l'absence de trade-off entre l'efficacité hydraulique et la résistance à la cavitation nous indique qu'il est plausible d'identifier des arbres à la fois résistants à la cavitation et ayant une grande efficacité hydraulique. Des arbres ayant ces capacités pourraient correspondre à des arbres résistants à la sécheresse. Nos travaux montrent aussi que les hêtres ont la capacité d'adapter leur système hydraulique aux conditions pédo-climatiques locales. En effet, le hêtre a montré une grande plasticité phénotypique pour chacun des traits étudiés dans cette thèse ce qui est une information intéressante pour les forestiers. Cela signifie que si les effets des changements globaux sont progressifs, on peut alors penser que les hêtres seront capables de s'acclimater progressivement aux nouvelles conditions environnementales.

Afin de poursuivre ces travaux, il serait important d'élucider la signification fonctionnelle et écologique d'une telle variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Pour aller dans ce sens, il faudrait démontrer expérimentalement que les géotypes les plus résistants à la cavitation sont bien ceux qui sont les plus résistants à la sécheresse. Pour ce faire il serait intéressant de travailler en conditions contrôlées, afin de pouvoir maîtriser l'environnement dans lequel les arbres poussent. On pourrait utiliser des « chambres phytotroniques » dans lesquelles on est capable de contrôler l'état hydrique des pots, le rayonnement, l'humidité de l'air et la teneur en CO<sub>2</sub> de l'air. Ainsi on pourrait faire varier les conditions environnementales à notre convenance en jouant sur un seul ou une combinaison de plusieurs paramètres environnementaux. Ce genre d'étude permettrait de déterminer quel paramètre environnemental ou quelle combinaison de paramètres a le plus d'impact sur la vulnérabilité à la cavitation. Cette étude serait encore plus complète en travaillant avec des arbres dont nous connaissons l'origine génétique. Si des géotypes résistants à la cavitation sont identifiés comme étant également plus performants en conditions de sécheresse extrême, ils pourront être privilégiés comme semencier pour régénérer les forêts de hêtre.

Dans la résistance à la cavitation la structure du xylème, et plus exactement la structure des ponctuations, a une grande importance. La formation du tissu vasculaire est donc une étape clef de la mise en place de la résistance à la cavitation. Ainsi, nous pourrions étudier le fonctionnement cambial pour mieux connaître la mise en place du tissu vasculaire et déterminer quelles sont les conditions pédo-climatiques qui ont le plus d'impact sur la formation du tissu.

Comme nous l'avons dit précédemment, les hêtres ont la capacité d'acclimater leurs traits hydrauliques aux conditions pédo-climatiques locales. Cependant, on connaît encore assez mal les relations entre l'acclimatation et le pédo-climat. Il serait important de définir quel « driver climatique » est à prendre en considération plutôt qu'un autre, et quelles compensations fonctionnelles les arbres mettent en place. L'arbre le moins vulnérable à la cavitation est-il le plus performant en terme de croissance? Nous pourrions développer une modélisation intégrée du fonctionnement hydrique/hydraulique/carboné de l'arbre.

Enfin, nous avons également montré que nos résultats étaient cohérents avec ceux obtenus sur le pin. Cependant trop peu d'étude ont été effectuées pour généraliser ces résultats aux espèces d'arbres des forêts tempérées. Il serait donc important de poursuivre ce genre d'étude sur d'autres espèces, en particulier celles qui composent nos forêts tempérées.



# Bibliographie



## ***Bibliographie***

- Ackerly, D.D. 2004.** Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs*. 74:25-44.
- Alder, N.N., W.T. Pockman, J.S. Sperry and S. Nuismer 1997.** Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany*. 48:665-674.
- 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.
- Austin, M.P., J.G. Pausas and A.O. Nicholls 1996.** Patterns of tree species richness in relation to environment in southeastern New South Wales, Australia. *Australian Journal of Ecology*. 21:154-164.
- Awad, H., T. Barigah, E. Badel, H. Cochard and S. Herbette 2010.** Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*. 139:280-288.
- Barigah, T.S., T. Ibrahim, A. Bogard, B. Faivre-Vuillin, L.A. Lagneau, P. Montpied and E. Dreyer 2006.** Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiology*. 26:1505-1516.
- Beikircher, B. and S. Mayr 2009.** Intraspecific differences in drought tolerance and acclimation in hydraulics of *Ligustrum vulgare* and *Viburnum lantana*. *Tree Physiology*. 29:765-775.
- 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* L. *Functional Ecology*. 7:713-720.
- Bréda, N., R. Huc, A. Granier and E. Dreyer 2006.** Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Science*. 63:625-644.
- Brendel, O., D. Le Thiec, C. Scotti-Saintagne, C. Bodenes, A. Kremer and J.M. Guehl 2008.** Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes*. 4:263-278.
- Brodribb, T.J. and H. Cochard 2009.** Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology*. 149:575-584.
- Buiteveld, J., G.G. Vendramin, S. Leonardi, K. Kamer and T. Geburek 2007.** Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. *Forest Ecology and Management*. 247:98-106.

- Cai, J. and M.T. Tyree 2010.** The impact of vessel size on vulnerability curves: data and models for within-species variability in saplings of aspen, *Populus tremuloides* Michx. *Plant Cell and Environment*. 33:1059-1069.
- Choat, B., M. Ball, J. Lully and J. Holtum 2003.** Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology*. 131:41-48.
- Choat, B., S. Jansen, M.A. Zwieniecki, E. Smets and N.M. Holbrook 2004.** Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vestured pits. *Journal of Experimental Botany*. 55:1569-1575.
- Choat, B., A.R. Cobb and S. Jansen 2008.** Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New Phytologist*. 177:608-625.
- Christman, M.A., J.S. Sperry and F.R. Adler 2009.** Testing the 'rare pit' hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist*. 182:664-674.
- Cochard, H. and M.T. Tyree 1990.** Xylem Dysfunction in *Quercus* - vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal-changes in embolism. *Tree Physiology*. 6:393-407.
- Cochard, H., N. Breda, A. Granier and G. Aussenac 1992.** Vulnerability to air-embolism of 3 European Oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Quercus pubescens* Willd, *Quercus robur* L). *Annales Des Sciences Forestieres*. 49:225-233.
- Cochard, H., N. Breda and A. Granier 1996.** Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: Evidence for stomatal control of embolism? *Annales Des Sciences Forestieres*. 53:197-206.
- Cochard, H., D. Lemoine and E. Dreyer 1999.** The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell and Environment*. 22:101-108.
- Cochard, H. 2002.** A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant Cell and Environment*. 25:815-819.
- Cochard, H., L. Coll, X. Le Roux and T. Ameglio 2002.** Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiology*. 128:282-290.
- Cochard, H., S. Coste, B. Chanson, J.M. Guehl and E. Nicolini 2005a.** Hydraulic architecture correlates with bud organogenesis and primary shoot growth in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Tree Physiology*. 25:1545-1552.
- Cochard, H., G. Damour, C. Bodet, I. Tharwat, M. Poirier and T. Ameglio 2005b.** Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum*. 124:410-418.

- Cochard, H. 2006.** Cavitation in trees. *Comptes Rendus Physique*. 7:1018-1026.
- Cochard, H., T. Barigah, E. Herbert and F. Caupin 2007.** Cavitation in plants at low temperature: is sap transport limited by the tensile strength of water as expected from Briggs' Z-tube experiment? *New Phytologist*. 173:571-575.
- Cochard, H., S.T. Barigah, M. Kleinhentz and A. Eshel 2008.** Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *Journal of Plant Physiology*. 165:976-982.
- Cochard, H., S. Herbette, T. Barigah, E. Badel, M. Ennajeh and A. Vilagrosa 2010.** Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant Cell and Environment*. 33:1543-1552.
- Corcuera, L., H. Cochard, E. Gil-Pelegrin and E. Notivol 2011.** Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism ( $P_{50}$ ) under severe drought. *Trees*. doi:10.1007/s00468-011-0578-2.
- Cordero, R.A. and E.T. Nilsen 2002.** Effects of summer drought and winter freezing on stem hydraulic conductivity of *Rhododendron* species from contrasting climates. *Tree Physiology*. 22:919-928.
- Craig H. 1957.** Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica and Cosmochimica Acta*. 12 : 133-149.
- Cregg, B.M., J.M. Olivas-Garcia and T.C. Hennessey 2000.** Provenance variation in carbon isotope discrimination of mature ponderosa pine trees at two locations in the Great Plains. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere*. 30:428-439.
- Cruziat, P., H. Cochard and T. Ameglio 2002.** Hydraulic architecture of trees: main concepts and results. *Annals of Forest Science*. 59:723-752.
- Cruziat, P. and M.T. Tyree 1990.** The rise of sap in trees. *Recherche*. 21:406-413.
- Dalla-Salda, G., A. Martinez-Meier, H. Cochard and P. Rozenberg 2011.** Genetic variation of xylem hydraulic properties shows that wood density is involved in adaptation to drought in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)). *Annals of Forest Science*. 68:747-757.
- Dixon H.H. and J. Joly 1895.** On the ascent of sap. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*. 186:563-576.
- Dreyfus, P. 2008.** Dynamics of Silver fir, Beech and Pines in the Mediterranean mountains: from modelling to decision-making. *Revue Forestiere Francaise*. 60:233-249.

- Ennajeh, M., T. Tounekti, A.M. Vadel, H. Khemira and H. Cochard 2008.** Water relations and drought-induced embolism in olive (*Olea europaea*) varieties 'Meski' and 'Chemlali' during severe drought. *Tree Physiology*. 28:971-976.
- Escalante-Perez, M., S. Lautner, U. Nehls, A. Selle, M. Teuber, J.P. Schnitzler, T. Teichmann, P. Fayyaz, W. Hartung, A. Polle, J. Fromm, R. Hedrich and P. Ache 2009.** Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus x canescens*). *Planta*. 229:299-309.
- Ewers, B.E., R. Oren and J.S. Sperry 2000.** Influence of nutrient versus water supply on hydraulic architecture and water balance in *Pinus taeda*. *Plant Cell and Environment*. 23:1055-1066.
- 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.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer 2010.** Arlequin suite ver 3.5 : A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10:564-567.
- Farquhar, G.D., M.H. O'Leary and J.A. Berry 1982.** On the relationship between carbon isotope discrimination and the inter-cellular carbon-dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 9:121-137.
- Farquhar, G.D. and R.A. Richards 1984.** Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*. 11:539-552.
- Fichot, R., T.S. Barigah, S. Chamaillard, D. Le Thiec, F. Laurans, H. Cochard and F. Brignolas 2010.** Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides x Populus nigra* hybrids. *Plant Cell and Environment*. 33:1553-1568.
- Fichot, R., S. Chamaillard, C. Depardieu, D. Le Thiec, H. Cochard, T.S. Barigah and F. Brignolas 2011.** Hydraulic efficiency and coordination with xylem resistance to cavitation, leaf function, and growth performance among eight unrelated *Populus deltoides x Populus nigra* hybrids. *Journal of Experimental Botany*. 62:2093-2106.
- Gaskin, J.F., D.Y. Zhang and M.C. Bon 2005.** Invasion of *Lepidium draba* in the western United States: distributions and origins of chloroplast DNA haplotypes. *Molecular Ecology*. 14:2331-2341.
- Garcia-Plazaola, J.I. and J.M. Becerril 2000.** Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees-Structure and Function*. 14:339-343.
- Granier, A., E. Ceschia, C. Damesin, E. Dufrene, D. Epron, P. Gross, S. Lebaube, V. Le Dantec, N. Le Goff, D. Lemoine, E. Lucot, J.M. Ottorini, J.Y. Pontailler and B.**

- Saugier 2000.** The carbon balance of a young Beech forest. *Functional Ecology*. 14:312-325.
- Guehl, J.M., C. Fort and A. Ferhi 1995.** Differential response of leaf conductance, carbon-isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in Maritime Pine and Pedunculate Oak plants. *New Phytologist*. 131:149-157.
- 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.
- Hacke, U. and J.S. Sperry 2001.** Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 4:97-115.
- Hacke, U.G., J.S. Sperry, J.K. Wheeler and L. Castro 2006.** Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology*. 26:689-701.
- Hacke, U.G. and S. Jansen 2009.** Embolism resistance of three boreal conifer species varies with pit structure. *New Phytologist*. 182:675-686.
- Hamilton, M.B. 1999.** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*. 8:521-523.
- Hamrick, J.L. 2004.** Response of forest trees to global environmental changes. *Forest Ecology and Management*. 197:323-335.
- Harvey, H.P. and R. van den Driessche 1997.** Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiology*. 17:647-654.
- Hatziskakis, S., A.C. Papageorgiou, O. Gailing and R. Finkeldey 2009.** High chloroplast haplotype diversity in Greek populations of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biology*. 11:425-433.
- Herbette, S., R. Wortemann, H. Awad, R. Huc, H. Cochard and T.S. Barigah 2010.** Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology*. 30:1448-1455.
- Holste, E.K., M.J. Jerke and S.L. Matzner 2006.** Long-term acclimatization of hydraulic properties, xylem conduit size, wall strength and cavitation resistance in *Phaseolus vulgaris* in response to different environmental effects. *Plant Cell and Environment*. 29:836-843.
- Hukin, D., H. Cochard, E. Dreyer, D.L. Thiec and M.B. Bogeat-Triboulot 2005.** Cavitation vulnerability in roots and shoots: does *Populus euphratica* Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? *Journal of Experimental Botany*. 56:2003-2010.
- IPCC. 2007.** Climate Change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability, summary for policymakers. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://www.ipcc.ch/SPM2feb07.pdf>.

- Jacobsen, A.L., Ewers F.W., Pratt R.B., Paddock W.A. and Davis S.D. 2005.** Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiology*. 139:546-556.
- Jacobsen, A.L., Pratt R.B., Ewers F.W. and Davis S.D. 2007a.** Cavitation resistance among 26 chaparral species of southern California. *Ecological Monographs*. 77:99-115.
- Jacobsen, A.L., Agenbag L., Esler K.J., Pratt R.B., Ewers F.W. and Davis S.D. 2007b.** Xylem density, biomechanics and anatomical traits correlate with water stress in 17 evergreen shrub species of the Mediterranean-type climate region of South Africa. *Journal of Ecology*. 95:171-183.
- Jacobsen, A.L., K.J. Esler, R.B. Pratt and F.W. Ewers 2009.** Water stress tolerance of shrubs in Mediterranean-type climate regions: convergence of fynbos and succulent karoo communities with California shrub communities. *American Journal of Botany*. 96:1445-1453.
- Jansen, S., B. Choat and A. Pletsers 2009.** Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany*. 96:409-419.
- Lamy, J., L. Bouffier, R. Burlett, C. Plomion, H. Cochard and S. Delzon 2011.** Uniform selection as the primary evolutionary force of cavitation resistance across a species range. *PloS ONE*. 6:e23476.
- Lauri, P.-E., O. Gorza, H. Cochard, S. Martinez, J.-M. Celton, V. Ripetti, M. Lartaud, X. Bry, C. Trotter and E. Costes 2011.** Genetic determinism of anatomical and hydraulic traits within an apple progeny. *Plant, cell & environment*. 34:1276-90.
- Lauteri, M., A. Pliura, M.C. Monteverdi, E. Brugnoli, F. Villani and G. Eriksson 2004.** Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of *Castanea sativa* Mill. originating from contrasting localities. *Journal of Evolutionary Biology*. 17:1286-1296.
- Lemoine, D., A. Granier and H. Cochard 1999.** Mechanism of freeze-induced embolism in *Fagus sylvatica* L. *Trees-Structure and Function*. 13:206-210.
- Leonardi, S. and P. Menozzi 1995.** Genetic-variability of *Fagus sylvatica* L in Italy - the role of postglacial recolonization. *Heredity*. 75:35-44.
- Li, C.Y. and K.Y. Wang 2003.** Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell. populations :377-385.
- Li, Y., J.S. Sperry, H. Taneda, S.E. Bush and U.G. Hacke 2008.** Evaluation of centrifugal methods for measuring xylem cavitation in conifers, diffuse- and ring-porous angiosperms. *New Phytologist*. 177:558-568.
- Magri, D., G.G. Vendramin, B. Comps, I. Dupanloup, T. Geburek, D. Gomory, M. Latalowa, T. Litt, L. Paule, J.M. Roure, I. Tantau, W.O. van der Knaap, R.J. Petit and J.L. de Beaulieu 2006.** A new scenario for the Quaternary history of

- European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist*. 171:199-221.
- Maherali, H., W.T. Pockman and R.B. Jackson 2004.** Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology*. 85:2184-2199.
- Maherali, H., C.F. Moura, M.C. Caldeira, C.J. Willson and R.B. Jackson 2006.** Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment*. 29:571-583.
- Martinez-Vilalta, J., E. Prat, I. Oliveras and J. Pinol 2002.** Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Oecologia*. 133:19-29.
- Martinez-Vilalta, J., H. Cochard, M. Mencuccini, F. Sterck, A. Herrero, J.F.J. Korhonen, P. Llorens, E. Nikinmaa, A. Nole, R. Poyatos, F. Ripullone, U. Sass-Klaassen and R. Zweifel 2009.** Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist*. 184:353-364.
- Markesteyn, L., L. Poorter, H. Paz, L. Sack and F. Bongers 2011.** Ecological differentiation in xylem cavitation resistance is associated with stem and leaf structural traits. *Plant Cell and Environment*. 34:137-148.
- 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.
- McElrone, A.J., W.T. Pockman, J. Martinez-Vilalta and R.B. Jackson 2004.** Variation in xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytologist*. 163:507-517.
- Meinzer, F.C., D.M. Johnson, B. Lachenbruch, K.A. McCulloh and D.R. Woodruff 2009.** Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*. 23:922-930.
- Mengistu, T., F.J. Sterck, M. Fetene, W. Tadesse and F. Bongers 2011.** Leaf gas exchange in the frankincense tree (*Boswellia papyrifera*) of African dry woodlands. *Tree Physiology*. 31:740-750.
- Milburn J.A. 1966.** The conduction of sap 1. Water conduction and cavitation in water stressed leaves. *Planta*. 69:34-42.
- Morgensen, H.L. 1996.** The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *American Journal of Botany*. 83:383-404.
- Neufeld, H.S., D.A. Grantz, F.C. Meinzer, G. Goldstein, G.M. Crisosto and C. Crisosto 1992.** Genotypic variability in vulnerability of leaf xylem to cavitation in water-stressed and well-irrigated Sugarcane. *Plant Physiology*. 100:1020-1028.
- Novaes, R.M.L., J.G. Rodrigues and M.B. Lovato 2009.** An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*. 8:86-96.

- Ouborg, N.J., Y. Piquot and J.M. Van Groenendael 1999.** Population genetics, molecular markers, and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology*. 87:551-568
- Pammenter, N.W. and C. Vander Willigen 1998.** A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology*. 18:589-593.
- Papageorgiou, A.C., A. Vidalis, O. Gailing, I. Tsiripidis, S. Hatziskakis, S. Boutsios, S. Galatsidas and R. Finkeldey 2008.** Genetic variation of beech (*Fagus sylvatica* L.) in Rodopi (NE Greece). *European Journal of Forest Research*. 127:81-88.
- Parelle, J., J.P. Roudaut and M. Ducrey 2006.** Light acclimation and photosynthetic response of beech (*Fagus sylvatica* L.) saplings under artificial shading or natural Mediterranean conditions. *Annals of Forest Science*. 63:257-266.
- Patane, C. 2011.** Leaf Area Index, Leaf Transpiration and Stomatal Conductance as Affected by Soil Water Deficit and VPD in Processing Tomato in Semi Arid Mediterranean Climate. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 197:165-176.
- Pastorelli, R., M.J.M. Smulders, W.P.C. Van't Westende, B. Vosman, R. Giannini, C. Vettori and G.G. Vendramin 2003.** Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Notes*. 3:76-78.
- Piboule, A., C. Collet, H. Frochot and J.F. Dhote 2005.** Reconstructing crown shape from stem diameter and tree position to supply light models. I. Algorithms and comparison of light simulations. *Annals of Forest Science*. 62:645-657.
- Pickard W.F. 1981.** The ascent of sap in plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 37:181-229.
- Pinol, J. and A. Sala 2000.** Ecological implications of xylem cavitation for several Pinaceae in the Pacific Northern USA. *Functional Ecology*. 14:538-545.
- Pita, P., A. Gasco and J.A. Pardos 2003.** Xylem cavitation, leaf growth and leaf water potential in *Eucalyptus globulus* clones under well-watered and drought conditions. *Functional Plant Biology*. 30:891-899.
- Pittermann, J., J.S. Sperry, U.G. Hacke, J.K. Wheeler and E.H. Sikkema 2006a.** Inter-tracheid pitting and the hydraulic efficiency of conifer wood: The role of tracheid allometry and cavitation protection. *American Journal of Botany*. 93:1265-1273.
- Pittermann, J., J.S. Sperry, J.K. Wheeler, U.G. Hacke and E.H. Sikkema 2006b.** Mechanical reinforcement of tracheids compromises the hydraulic efficiency of conifer xylem. *Plant Cell and Environment*. 29:1618-1628.
- Plavcova, L., U.G. Hacke and J.S. Sperry 2011.** Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant Cell and Environment*. 34:501-513.

- Pockman, W.T. and J.S. Sperry 2000.** Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany*. 87:1287-1299.
- Pratt, R.B., A.L. Jacobsen, F.W. Ewers and S.D. Davis 2007a.** Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine Rhamnaceae species of the California chaparral. *New Phytologist*. 174:787-798.
- Pratt, R.B., A.L. Jacobsen, K.A. Golgotiu, J.S. Sperry, F.W. Ewers and S.D. Davis 2007b.** Life history type and water stress tolerance in nine California chaparral species (Rhamnaceae). *Ecological Monographs*. 77:239-253.
- Raimondo, F., P. Trifilo, M.A. Lo Gullo, R. Buffa, A. Nardini and S. Salleo 2009.** Effects of reduced irradiance on hydraulic architecture and water relations of two olive clones with different growth potentials. *Environmental and Experimental Botany*. 66:249-256.
- Rose, L., C. Leuschner, B. Kockemann and H. Buschmann 2009.** Are marginal beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances a source for drought tolerant ecotypes? *European Journal of Forest Research*. 128:335-343.
- Sperry, J.S., J.R. Donnelly and M.T. Tyree 1988.** A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant Cell and Environment*. 11:35-40.
- Sperry, J.S. and U.G. Hacke 2004.** Analysis of circular bordered pit function - I. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany*. 91:369-385.
- Sperry, J.S., K.L. Nichols, J.E.M. Sullivan and S.E. Eastlack 1994.** Xylem embolism in ring-porous, diffuse-porous, and coniferous trees of northern Utah and interior Alaska. *Ecology*. 75:1736-1752.
- Sperry, J.S. and W.T. Pockman 1993.** Limitation of transpiration by hydraulic conductance and xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant Cell and Environment*. 16:279-287.
- Sperry, J.S. and M.T. Tyree 1988.** Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology*. 88:581-587.
- Sterck, F., J. Martinez-Vilalta, M. Mencuccini, H. Cochard, P. Gerrits, U. Sass-Klaassen, R. Zweifel, A. Herrero, J. Korhonen and P. Llorens 2011.** Coordination of functional branch traits in Scots pines across Europe. *Functional Ecology*. In press.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17:1105-1109.
- Thomas, D.S., K.D. Montagu and J.P. Conroy 2007.** Temperature effects on wood anatomy, wood density, photosynthesis and biomass partitioning of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Tree Physiology*. 27:251-260.

- Tyree, M.T. and M.A. Dixon 1983.** Cavitation events in *Thuja occidentalis* L. Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood can be measured. *Plant Physiology*. 72:1094-1099.
- Tyree, M.T. and J.S. Sperry 1989.** Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 40:19-38.
- Tyree, M.T., H. Cochard, P. Cruiziat, B. Sinclair and T. Ameglio 1993.** Drought-induced leaf shedding in Walnut - Evidence for vulnerability segmentation. *Plant Cell and Environment*. 16:879-882.
- Tyree, M.T., S.D. Davis and H. Cochard 1994.** Biophysical Perspectives of Xylem Evolution - Is There a Trade-off of Hydraulic Efficiency for Vulnerability to Dysfunction. *Iawa Journal*. 15:335-360.
- Tyree, M.T. and M.H. Zimmermann 2002.** *Xylem structure and the ascent of sap*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Tyree, M.T., H. Cochard and P. Cruiziat 2003.** The water-filled versus air-filled status of vessels cut open in air: the 'Scholander assumption' revisited. *Plant Cell and Environment*. 26:613-621.
- Weising, K. and R.C. Gardner 1999.** A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*. 42:9-19.
- Wheeler, J.K., J.S. Sperry, U.G. Hacke and N. Hoang 2005.** Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell and Environment*. 28:800-812.
- Wodzicki, T.J. 2001.** Natural factors affecting wood structure. *Wood Science and Technology*. 35:5-26.
- Zimmermann M.H. 1983.** *Xylem structure and the ascent of sap*. 1<sup>ère</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin.

## Sites web consultés

**EUFORGEN** [référence du 11 octobre 2011],  
[http://www.euforgen.org/distribution\\_maps.html](http://www.euforgen.org/distribution_maps.html).

**IFN** [référence du 11 octobre 2011], <http://www.ifn.fr/spip/spip.php?article520>

**INRA Nancy** [référence du 11 octobre 2011],  
[http://www.nancy.inra.fr/la\\_sciences\\_et\\_vous/dossiers\\_scientifiques/rechauffement\\_climatique\\_et\\_forets\\_francaises/le\\_hetre](http://www.nancy.inra.fr/la_sciences_et_vous/dossiers_scientifiques/rechauffement_climatique_et_forets_francaises/le_hetre)

# Annexes



## Annexe 1 : Protocole d'isolement de l'ADN de bois d'après Novaes *et al.* (2009)

1. Quantité de matériel végétal : 125 mg pour écorce/bois congelé.
2. Broyage dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.
3. Ajouter 1mL de tampon d'extraction CTAB, 20  $\mu$ l de 2-mercaptoethanol et 35  $\mu$ l de protéinase K (1 mg/ml).
4. Mélanger.
5. Ajouter 70  $\mu$ l de SDS 10% (w/v).
6. Mélanger jusqu'à ce que le mélange soit homogène.
7. Transférer le mélange en tube de 2 ml (dans le cas où des fibres seraient persistantes dans le mélange, les retirer).
8. Incuber 1 heure à 60°C en mélangeant occasionnellement.
9. Lorsque les tubes sont stabilisés à température ambiante, ajouter 600  $\mu$ l de Chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) dans chaque tube et homogénéiser en retournant doucement les tubes pendant 5 min.
10. Centrifuger 15 min à 15000 rpm et transférer les surnageants dans de nouveaux tubes de 2 ml.
11. Ajouter 140  $\mu$ l de CTAB 10% (w/v) et 280  $\mu$ l de NaCl 5 M. Mélanger doucement en inversant les tubes.
12. Répéter les étapes 9 et 10.
13. Précipiter l'ADN en ajoutant 1 volume d'isopropanol froid (-20°C) et incuber les tubes à -20°C pendant la nuit.
14. Centrifuger 10 min à 15000 rpm et éliminer le surnageant.
15. Laver le culot à l'éthanol 70° froid (-20°C) deux à trois fois.
16. Après élimination de l'éthanol, sécher le culot (15 min à 37°C) et dissoudre le culot dans 30  $\mu$ l de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) contenant 10  $\mu$ g/ml de RNaseA (Laisser agir la RNaseA 2 h à 37°C).

Tampon d'extraction CTAB :

CTAB 2%, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 100 mM pH8, EDTA 20 mM pH8, PVP 2%

## Annexe 2 : Mode opératoire de la plate-forme GENTYANE

**Mode opératoire rédigé par S. Contamine et L. Jaffrelo et validé par C. Poncet (UMR GDEC, INRA Clermont Ferrand)**

### 1. Objet

Ce mode opératoire définit l'ensemble des étapes à respecter pour réaliser du génotypage en plaque 384, à partir de marqueurs de type microsatellites (SSR), soit en marquage direct, soit en marquage M13, à partir d'ADN déjà extrait.

### 2. Matériels

- Plaque 384 PCR Fourtitude (FrameStar 384 - 4ti-0384/C)
- Plaque 96, 0,8mL Storage (Thermoscientific - Cat.AB-0765)
- Plaque PCR96 Biorad (réf : HSS9601)
- Plaque 384 Deep Well Storage (Thermoscientific – Cat.AB-0765)
- Films thermosoudables PeelSeal de Dutscher (016279F)
- Robot Hamilton Microlab Star
- Robot Beckman Coulter Biomek<sup>®</sup>3000
- Thermocycler Veriti 384 Well (Applied Biosystems)
- Robot Beckman Coulter Biomek Fx<sup>P</sup>
- Séquenceur 96 capillaires 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems)

### 3. Réactifs chimiques et biologiques

- AmpliTaq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix (AB-life technologies) conditionné par pot de 5mL (4398881) et 50mL (4398886), stocké à -20°C
- Oligo M13 couplé aux différentes fluorescences (FAM, VIC, NED, PET) (Part No.450017)
- Plaques contenant le mélange formamide + ladder, stockées à -20°C.
- H<sub>2</sub>O milliQ

### 4. Contraintes de la méthode

- L'ADN doit être dosé et normalisé à une concentration finale de **10ng/μl** et réparti dans des plaques 96 PCR ou des plaques 96 Storage de 0,8mL.
- Il est conseillé de ne pas recongeler le mix PCR après une première décongélation.
- Les manipulations pré-PCR se déroulent en salle « mix », et les manipulations post-PCR, en salle « séquenceur ».
- Penser à réserver les appareils sur les plannings.

### 5. Contenu du mode opératoire

#### 5.1 Répartition de l'ADN en plaque 384

Le robot de pipetage Hamilton Star permet de répartir **2,5μL** d'ADN à 10ng/μl, dans des plaques 384 PCR, selon l'ordre de distribution suivant: A1, B1, A2, B2.  
Les plaques doivent être centrifugées.

#### 5.2 Préparation et distribution du mix PCR

- Pour la préparation des mix de primers, se reporter au tableau suivant :

Volume final désiré	SSR amorces marquées		SSR extension M13	
	500µl	1000µl	500µl	1000µl
volume d'amorce non marquée à 100 µM (en µL)	50	100	50	100
volume amorce marquée à 100 µM (en µL)	50	100	5	10
H2O milliQ (en µL)	400	800	445	890

	concentration finale de chaque primer (en µM)	
	SSR amorces marquées	SSR extension M13
amorce non marquée	10	10
amorce marquée	10	1

- Pour la préparation des mix, se reporter au tableau suivant (volume mort compris) :

			2 mkers/quart	1 mker/quart	2 mkers/plaque	1 mker/plaque	2 plaques	3 plaques	
SSR	support distribution	PCR96	PCR96	SDW0.8	SDW0.8	SDW0.8	SDW0.8		
		nombre d'individus	1	62	110	218	410	820	1230
	SSR amorces marquées	Master Mix	5	310	550	1090	2050	4100	6150
		primer mix	0.5	31	55	109	205	410	615
		H2O	2	124	220	436	820	1640	2460
		volume total	7.5	465	825	1635	3075	6150	9225
		volume à distribuer/puits		55	100	200	380	380	380
	ADN	2.5	-	-	-	-	-	-	
	SSR extension M13	Master Mix	5	310	550	1090	2050	4100	6150
		primer mix	0.5	31	55	109	205	410	615
		primer M13 marqué	0.05	3.1	5.5	10.9	20.5	41	61.5
		H2O	1.95	120.9	214.5	425.1	799.5	1599	2398.5
		volume total	7.5	465	825	1635	3075	6150	9225
	volume à distribuer/puits		55	100	200	380	380	380	
ADN	2.5	-	-	-	-	-	-		

Il est possible de rajouter du GC enhancer pour améliorer la PCR dans le cas de primers riches en GC. Dans ce cas, le protocole de préparation de mix est le suivant :

SSR Marquage direct	1 individu	SSR marquage M13	1 individu
ADN	2.5	ADN	2.5
Master Mix	5	Master Mix	5
GC Enhancer	0.4	GC Enhancer	0.4
Primer Mix	0.5	Primer Mix	0.5
H2O qsp10µl	1.6	Primer M13 marqué (100µM)	0.05
<b>Volume final</b>	<b>10</b>	H2O qsp10µl	1.55
		<b>Volume final</b>	<b>10</b>

- Les plaques doivent être thermoscellées et centrifugées.

### 5.3 PCR

L'amplification est réalisée sur les thermocycleurs avec le programme suivant, nommé « projet extérieur SSR » :

	95°C	10min	
7x	95°C	30s	-1°C/cycle
	62°C	30s	
	72°C	30s	
30x	95°C	30s	
	55°C	30s	
	72°C	30s	
8x	95°C	30s	
	56°C	30s	
	72°C	30s	
	72°C	5min	
	15°C	∞	

#### ***5.4 Dilution et multiplexage***

Les produits d'amplification sont dilués et multiplexés au Biomeck Fx<sup>P</sup> tête 384, dans une plaque storage 384. La loi de dilution généralement utilisée correspond à 3µL de chaque produit PCR + 190µL d'eau MQ.

2µL de ces produits dilués sont déposés dans une plaque contenant de la formamide et du ladder (5µL).

#### ***5.6 Lancement au capillaire***

Il est conseillé de dénaturer les produits d'amplification de la plaque avant de la lancer au séquenceur (étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes puis choc thermique sur les thermocycleurs).

Il faut ensuite renseigner une feuille de route pour lancer la plaque au séquenceur. Un outil est disponible pour la générer automatiquement, sous : L:\COMMUN\01 - Sample Sheets, « Sample sheet generator ». La feuille de route remplie sera alors stockée sous cet emplacement.

## Annexe 3 : Protocole de coloration des tissus végétaux

**Protocole rédigé par P. Conchon (UMR PIAF, INRA Clermont Ferrand).**

### Coupe

La pratique est nécessaire pour obtenir de bonnes coupes, mais quelques directives peuvent être données. La lame du couteau et de la surface de coupe doivent former un angle d'environ 15° pour les feuillus et environ 8 ° pour les résineux.

L'épaisseur optimale de fines sections:

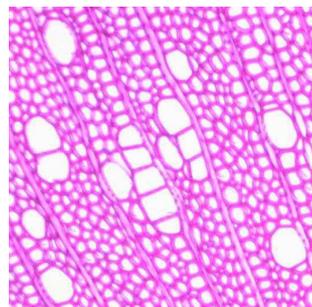
Sections transversales: 15µm en général; 10µm pour les espèces à petits pores.

Sections radiales: 15µm pour la structure des murs de rayons; 25µm pour la perforation et épaissements spirales.

Sections tangentielles: 15µm.

### Coloration à la safranine (pour étudier les parois cellulaires)

- Produits :
- l'eau de javel ou dakin à 0.5% (5g/l hypochlorite de sodium),
  - acide acétique 1%,
  - safranine à 1%,
  - alcool 50%, 70% et 100%,
  - eukitt.



Pour étudier les parois cellulaires, le contenu cellulaire est détruit et ensuite on colore à la safranine les parois ;

Plonger dans l'eau de javel ou dakin à 0.5% (5g/l hypochlorite de sodium) pendant 15-30 minutes, puis dans une solution d'acide acétique 1% afin de neutraliser l'eau de javel ;

Rincer à l'eau 2-3 ;

Colorer avec une solution de safranine à 1% pendant 3-5 minutes ;

Rincer une fois avec de l'eau ;

Rincer une fois avec de l'alcool 50% et 70% jusqu'à ce que l'excès de colorant disparaisse ;

Rincer une fois avec de l'alcool à 100% ;

Sécher presque complètement au papier Jeophef,

Monter sur lamelle avec eukitt (résine synthétique) et appliquer environ 50 gr. de pression sur la lamelle et durcir la résine par séchage dans un four 50-60 ° C pendant 24 heures.

## Annexe 4 : Protocole de mesure de la densité du bois

Protocole rédigé par P. Conchon (UMR PIAF, INRA Clermont Ferrand).

### Généralité

La « densité » du bois, ou encore masse volumique, est le rapport entre la masse du bois et son volume. On distingue :

- la « densité absolue », peu utilisée, qui est la - densité de la masse ligneuse anhydre (bois réduit en poudre et aggloméré), indépendante de l'essence,  $\rho = 1530 \text{ kg.m}^{-3}$  (densité : 1,53) ;
- la densité du bois sec à l'air, que l'on appelle « densité du bois », est le rapport entre la masse et le volume de l'échantillon conditionné à environ 12 p. 100 de taux d'humidité ;
- l'« infradensité du bois », rapport entre la masse du bois anhydre et le volume saturé en eau ou « volume vert » de l'échantillon.

La densité est plus élevée dans le duramen (bois de cœur) que dans l'aubier, en bas de l'arbre plutôt qu'à son sommet, et, pour les cernes, dans le bois d'été que dans le bois de printemps. Elle est plus élevée dans les feuillus que dans les résineux.

### Mesure

#### 1. Mise en saturation (48h)

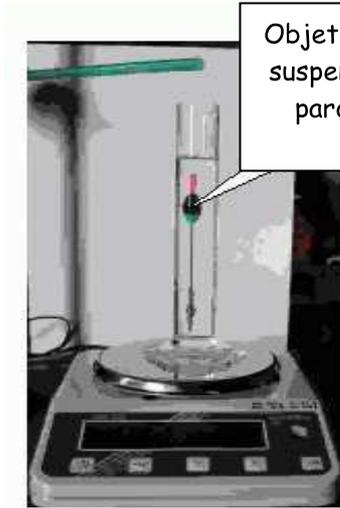
Dans une enceinte à vide (dessiccateur), faire varier de manière cyclique la pression entre 40mBar et 1 bar, de façon à expulser l'air emprisonné dans les pores du bois, ces cavités étant ensuite remplies par l'air du récipient Cette opération dure 48h.



## 2. Détermination du volume d'après le principe d'Archimède ( $V_{sat}$ )

« Tout corps plongé dans un liquide reçoit de la part de ce liquide une poussée verticale, dirigé du bas vers le haut, égale au poids du volume du liquide déplacé.»

Remplir un récipient d'eau pure (MilliQ) et réaliser le montage suivant :



Objet totalement immergé  
suspendu sans toucher les  
parois de l'éprouvette

Peser le récipient contenant l'eau pure et tarer ensuite la balance pour faire le 0. Immerger ensuite l'échantillon, la masse ainsi obtenue correspond à la masse du volume d'eau déplacé et donc au volume de l'échantillon.

## 3. Détermination de la masse anhydre ( $M_{anh}$ )

Peser l'échantillon après séchage à 102°C pendant 48h.

## 4. Détermination de l'infradensité

Il est alors possible de déterminer l'infradensité du bois ou densité théorique minimale correspondant à la masse volumique basale :

$$\rho_i = \frac{m_{anh}}{V_{sat}} \quad , \text{ avec } m_{anh} \text{ en kg et } V_{sat} \text{ en m}^3$$





## Résumé

Cette thèse visait à étudier la variabilité génétique et plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez le hêtre (*Fagus sylvatica* L.). A cette fin, nous avons tout d'abord testé les variations dues à la méthodologie de mesure de la vulnérabilité à la cavitation. Notre étude a montré que les variations de vulnérabilité à la cavitation au cours du temps sont faibles. Néanmoins, il est préférable d'éviter de récolter les échantillons durant le début de la période de formation du bois. Par ailleurs il est possible de conserver au frais les échantillons sans dégrader les mesures durant au moins un mois. Nos résultats montrent également que la vulnérabilité à la cavitation peut être variable aussi bien au sein d'un même arbre qu'entre populations *in situ*. Ensuite, nous avons voulu déterminer la part de plasticité phénotypique de la part de variabilité génétique dans la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Pour cela nous avons étudié 17 populations de hêtre venant de toute l'Europe et poussant dans une plantation comparative. Parmi les 17 populations 6 d'entre elles ont été étudiées dans trois plantations comparatives différentes (France, Espagne et Slovaquie). Nos résultats indiquent que chez le hêtre la vulnérabilité à la cavitation varie considérablement au sein de chaque population. Ils indiquent également que l'on observe peu de différenciation génétique entre populations. Les résultats montrent également que la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation est importante entre les plantations, et que le degré de cette plasticité peut varier d'une population à l'autre. Pour finir, nous avons regardé s'il existait des relations entre la vulnérabilité à la cavitation et des paramètres d'efficacité hydraulique ainsi qu'avec l'efficacité d'utilisation de l'eau. Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence des preuves d'un trade-off entre l'efficacité et la sureté du xylème.

Mots clefs : *Fagus sylvatica* L., efficacité d'utilisation de l'eau, plantations comparatives, plasticité phénotypique, variabilité génétique, vulnérabilité à la cavitation

## Summary

This work aimed at studying the genetic variability and the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation in beech (*Fagus sylvatica* L.). We tested the variations due to the methodology of measuring vulnerability to cavitation. Our study showed that the variations in vulnerability to cavitation over time are low. However, it's better to avoid collecting samples during the period of initial wood formation. Furthermore it's possible to store samples without degrading measures for during one month. Our results also show that vulnerability to cavitation can be variable both within the same tree and between populations *in situ*. We determined the proportion of phenotypic plasticity and the proportion of genetic variability in the variability of vulnerability to cavitation. For this we studied 17 beech populations from all Europe and growing in a common garden. Among the 17 populations 6 of them have been studied in three different common gardens (France, Spain and Slovakia). Our results indicate that for beech, vulnerability to cavitation varies considerably within populations. They also indicate that there are few genetic differentiations between populations. The results show that the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation is important among common garden, and the degree of this plasticity can vary between populations. To complete our study, we looked at the relationships between vulnerability to cavitation and hydraulic efficiency parameters and with the water use efficiency. Our results do not reveal evidence of relationships vulnerability to cavitation and other physiological traits.

Keywords: common garden experiment, *Fagus sylvatica* L., genetic variability, hydraulic traits, phenotypic plasticity, vulnerability to cavitation, water use efficiency



## Résumé

Cette thèse visait à étudier la variabilité génétique et plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation chez le hêtre (*Fagus sylvatica* L.). A cette fin, nous avons tout d'abord testé les variations dues à la méthodologie de mesure de la vulnérabilité à la cavitation. Notre étude a montré que les variations de vulnérabilité à la cavitation au cours du temps sont faibles. Néanmoins, il est préférable d'éviter de récolter les échantillons durant le début de la période de formation du bois. Par ailleurs il est possible de conserver au frais les échantillons sans dégrader les mesures durant au moins un mois. Nos résultats montrent également que la vulnérabilité à la cavitation peut être variable aussi bien au sein d'un même arbre qu'entre populations *in situ*. Ensuite, nous avons voulu déterminer la part de plasticité phénotypique de la part de variabilité génétique dans la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation. Pour cela nous avons étudié 17 populations de hêtre venant de toute l'Europe et poussant dans une plantation comparative. Parmi les 17 populations 6 d'entre elles ont été étudiées dans trois plantations comparatives différentes (France, Espagne et Slovaquie). Nos résultats indiquent que chez le hêtre la vulnérabilité à la cavitation varie considérablement au sein de chaque population. Ils indiquent également que l'on observe peu de différenciation génétique entre populations. Les résultats montrent également que la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation est importante entre les plantations, et que le degré de cette plasticité peut varier d'une population à l'autre. Pour finir, nous avons regardé s'il existait des relations entre la vulnérabilité à la cavitation et des paramètres d'efficacité hydraulique ainsi qu'avec l'efficacité d'utilisation de l'eau. Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence des preuves d'un trade-off entre l'efficacité et la sureté du xylème.

Mots clefs : *Fagus sylvatica* L., efficacité d'utilisation de l'eau, plantations comparatives, plasticité phénotypique, variabilité génétique, vulnérabilité à la cavitation

## Summary

This work aimed at studying the genetic variability and the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation in beech (*Fagus sylvatica* L.). We tested the variations due to the methodology of measuring vulnerability to cavitation. Our study showed that the variations in vulnerability to cavitation over time are low. However, it's better to avoid collecting samples during the period of initial wood formation. Furthermore it's possible to store samples without degrading measures for during one month. Our results also show that vulnerability to cavitation can be variable both within the same tree and between populations *in situ*. We determined the proportion of phenotypic plasticity and the proportion of genetic variability in the variability of vulnerability to cavitation. For this we studied 17 beech populations from all Europe and growing in a common garden. Among the 17 populations 6 of them have been studied in three different common gardens (France, Spain and Slovakia). Our results indicate that for beech, vulnerability to cavitation varies considerably within populations. They also indicate that there are few genetic differentiations between populations. The results show that the phenotypic plasticity of vulnerability to cavitation is important among common garden, and the degree of this plasticity can vary between populations. To complete our study, we looked at the relationships between vulnerability to cavitation and hydraulic efficiency parameters and with the water use efficiency. Our results do not reveal evidence of relationships vulnerability to cavitation and other physiological traits.

Keywords: common garden experiment, *Fagus sylvatica* L., genetic variability, hydraulic traits, phenotypic plasticity, vulnerability to cavitation, water use efficiency