



Etude structurelle et fonctionnelle de la plasticité de la vulnérabilité à l'embolie chez le peuplier

Cédric Lemaire

► To cite this version:

Cédric Lemaire. Etude structurelle et fonctionnelle de la plasticité de la vulnérabilité à l'embolie chez le peuplier. Biologie végétale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2019. Français. NNT : 2019CLFAC081 . tel-02613009

HAL Id: tel-02613009

<https://theses.hal.science/tel-02613009>

Submitted on 19 May 2020

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.



**École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie &
Environnement**

Université Clermont-Auvergne

*UMR PIAF – Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en
environnement Fluctuant*

Étude structurelle et fonctionnelle de la plasticité de la vulnérabilité à l'embolie chez le peuplier

Cédric Lemaire

Thèse

Spécialité : Biologie végétale

Soutenue le 11 décembre 2019

Membres du jury

Rapporteurs : Patrick Fonti, Chercheur, WSL, Birmensdorf (Suisse)
Didier Le Thiec, Directeur de Recherches, INRA, Nancy
Florence Volaire, Chargée de Recherches, INRA, Montpellier

Présidente du jury : Patricia Roeckel-Drevet, Professeure, Université Clermont-Auvergne

Examinatrice : Nicole Brunel-Michac, Ingénieure d'Études, Université Clermont-Auvergne

Directeur de thèse : Stéphane Herbette, Maître de Conférences, Université Clermont-Auvergne

Résumé

Les dépérissements forestiers causés par des sécheresses intenses mettent en lumière la vulnérabilité des forêts face aux changements climatiques. Les arbres sont en limite de dysfonctionnement hydraulique du fait d'une marge de sécurité hydraulique faible. Leur comportement dans un contexte de changement climatique dépendra donc, au moins en partie, de la variabilité phénotypique d'un paramètre clé dans la résistance à la sécheresse des arbres, la vulnérabilité du xylème à la cavitation. Des études précédentes ont montré que ce trait est soumis à plasticité phénotypique. L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer l'impact de cette plasticité dans le fonctionnement hydraulique et d'en identifier les bases structurelles, un préalable à la recherche de déterminants génétiques sur ce trait.

Des plants de peupliers ont été cultivés dans des conditions de croissance contrastées pour l'eau et la lumière dans le but d'induire de la plasticité sur la vulnérabilité à la cavitation. Des mesures réalisées sur différents traits fonctionnels indiquent que ce sont principalement des variations de surface foliaire et de résistance à la cavitation qui varient en réponse à une contrainte hydrique. Les simulations d'un modèle de fonctionnement hydraulique (SurEau) confirme l'importance de ces deux traits dans la réponse à la sécheresse, en particulier de la résistance à la cavitation. La recherche de déterminants structuraux de la plasticité pour ce trait a été conduite aux niveaux du xylème, des dimensions des vaisseaux et de l'ultrastructure des ponctuations, grâce à plusieurs techniques de microscopie (M.E.B., M.E.T., optique), et à la tomographie à rayons X. Les résultats montrent que l'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation repose sur un changement de l'organisation du xylème et des dimensions des vaisseaux, alors que la structuration des ponctuations reste constante. La microtomographie à rayons X permet de révéler l'importance de la connectivité entre vaisseaux pour améliorer la résistance à l'embolie. En outre, une plasticité pour ce trait est aussi observée sur des feuilles de peupliers ou sur des tiges de blé, appelant à la recherche de déterminants structuraux du xylème primaire, et plus généralement des espèces herbacées.

Mots-clefs : Anatomie, Cavitation, Embolie, Fonctionnement, Hydraulique, Ponctuation, Plasticité, Peuplier, Sécheresse, Vaisseaux, Xylème.

Abstract

Forest vulnerability against climate change is highlighted by the forest diebacks caused by intense droughts. Trees are functioning at their limit of hydraulic failure due to a little hydraulic safety margin. Their behaviour in a context of climate change is, at least partially, linked with phenotypic variability of a key parameter in drought resistance: the xylem vulnerability to cavitation. Previous studies have shown this trait to be under phenotypic plasticity. The main objective of this thesis is to study the consequences of this plasticity in the hydraulic functioning and to identify its structural basis, which is the priority for the search of the genetic determinants for this trait.

Poplar saplings were cultivated under grown in contrasted water availability or light exposure in order to induce acclimation in cavitation resistance. The measurements of several functional traits reveal that the leaf area and the cavitation resistance vary the most as response of drought. Simulations using a model (SurEau) confirm the importance of these two traits in drought response, in particular for cavitation resistance. The search of structural determinants was conducted at three levels: xylem, vessel dimensions and pit ultrastructure using several microscopy techniques (S.E.M., T.E.M., optical) and X-ray microtomography. The results show that acclimation of vulnerability to cavitation relies on changes in xylem and vessel dimensions while pit structure remains constant. X-ray microtomography reveals the importance of connectivity between vessels to improve embolism resistance. Plasticity for this trait was also observed on poplar leaves and wheat stems. This calls for research of structural determinants for the primary xylem, and more generally for herbaceous species.

Keywords: *Anatomy, Cavitation, Drought, Embolism, Functioning, Hydraulic, Pit, Plasticity, Poplar, Vessel, Xylem*

Remerciements

Éric Badel, Nicole Brunel-Michac, Hervé Cochard, Mylène Durand-Tardif, Régis Fichot, Christine Horlow, Françoise Laurans et Jacques Le Gouis, je vous remercie pour vos précieux conseils et regard critique en tant que membres de mon comité de thèse.

Merci à Nicole Brunel-Michac, Patrick Fonti, Didier Le Thiec, Patricia Roeckel-Drevet et Florence Volaire d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci aux équipes Corses du SERME et particulièrement Yann Quilichini de m'avoir accueilli pendant une semaine dans vos locaux.

Merci également à tous les personnes composant le PIAF pour ces années que vous m'avez offertes. Le piaf étant un collectif, je ne peux pas citer tout le monde ~~ce qui est, avouons-le, une pirouette très pratique pour éviter d'oublier quelqu'un !~~ Que vous soyez permanent, toujours présent ou parti depuis ; que vous soyez les petites mains précaires de la Recherche, stagiaire, doc ou post doc ; que vous soyez visiteur, étranger ou non : cette pensée est pour vous. Merci de participer à faire du PIAF un lieu accueillant et convivial, que ce soit par l'entraide ou l'une des multiples discussions (parfois très, parfois pas du tout) sérieuses que nous avons eu. Un grand merci à tous ceux qui ont été présents à chaque étape de ce projet, pour tous ces moments de vie partagés ensemble. Le PIAF est un endroit où « collectif » n'est pas une notion abstraite et où chacun est attentif aux autres. Je ne pouvais rêver mieux ! Merci à tous de m'avoir fait une place parmi vous le temps de cette thèse. Je vous quitte à regrets, mais ne vous en faites pas, je connais l'heure (10h30), je connais l'adresse. À bientôt !

Bénédict, Louise merci d'avoir animé ces années clermontoises. Ce n'est qu'un au revoir, à bientôt, ailleurs et dans d'autres contextes.

À mes proches, amis et famille de Bordeaux et d'ailleurs, merci pour votre soutien à distance, d'avoir été là alors que j'étais loin.

Myrto, toi qui as vu ce projet évoluer pas à pas, tu as su me soutenir à chaque instant. Il n'aurait pas été possible de vivre ces moments aussi bien sans toi. Φιλιά πολλά σερη μου.

Lia, ... oui, j'avais dit que je ne citerai pas de noms du PIAF mais que serait une règle si elle n'avait pas ses exceptions ! Après trois années à passer chaque jour vissés sur nos chaises l'un en face de l'autre, ça va être étrange de ne plus te croiser tous les matins. Pour les discussions, les fous rires, les coups de main et tout ce qui fait de cette thèse un bon souvenir, un grand merci. Aller courage, maintenant c'est à ton tour de jouer !

Enfin Stéphane, le dernier mot est pour toi. Merci pour cet encadrement. Attentif, pédagogue, patient, bienveillant, tu m'as fait confiance en me laissant toute l'autonomie que je pouvais imaginer, tout en étant extrêmement réactif, répondant présent à chaque fois que j'en avais besoin (et parfois, avant même que j'en aie besoin !). C'est un jeu d'équilibriste que tu maîtrises à la perfection ! Bravo et merci pour tout.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	1
Synthèse bibliographique	2
I. L'arbre en situation de sécheresse	2
1) Vulnérabilité face à la sécheresse	2
2) Limiter les pertes en eau : la fermeture stomatique	3
3) Face à une sécheresse qui se prolonge, l'arbre risque-t-il de mourir... de faim ? ...	5
4) La mortalité en situation de sécheresse	5
II. Fonctionnement hydraulique	7
1) Le continuum hydrique sol - plante - atmosphère	7
2) La tension-cohésion	8
3) Le potentiel hydrique	9
III. Dysfonctionnement hydraulique.....	13
1) Cavitation d'un liquide sous tension.....	13
2) Diffusion de l'embolie dans le xylème	15
3) Formation de l'embolie : le premier évènement de cavitation	17
4) Mesure de la vulnérabilité à la cavitation	18
5) Irréversibilité de l'embolie ?	22
6) La segmentation hydraulique, cloisonner l'embolie	23
IV. Vulnérabilité à la cavitation des arbres.....	25
1) Variabilité inter-spécifique	25
2) Variabilité intra-spécifique	27
V. Structure du xylème.....	30
1) Les éléments conducteurs	31
2) Organisation des vaisseaux	34
3) Les connexions entre éléments conducteurs : les ponctuations	35
4) Formation des éléments conducteurs	38
VI. Déterminants structuraux de la vulnérabilité à la cavitation	41
1) Déterminants à l'échelle inter-spécifique	41
2) Déterminants à l'échelle intra-spécifique	43
VII. Contexte et objectifs de la thèse	44
1) Une thèse inscrite dans un projet d'équipe	44
2) Contexte de la thèse	45
3) Objectifs de la thèse	45
Chapitre 1 : Déterminants structuraux de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation...	48
I. Résumé de l'article soumis à <i>Annals of Botany</i>	48
II. Abstract.....	50
III. INTRODUCTION	51
IV. MATERIAL AND METHODS.....	53
1) Plant material and growth conditions	53
2) Hydraulic traits:	55
3) Light microscopy	57

4)	Vessel length	57
5)	Transmission Electron Microscopy	59
6)	Scanning Electron Microscopy	59
7)	Calculation of supplemental traits	60
8)	Modelling pit membrane strain	61
9)	Measurement of individual vessel VC using X-Ray microtomography	62
10)	Statistical analysis	63
V.	RESULTS	64
VI.	DISCUSSION.....	66
VII.	LITERATURE CITED	71
VIII.	Conclusion du premier chapitre	74
Chapitre 2 :	Implication de traits fonctionnels dans la réponse à la sécheresse	76
I.	INTRODUCTION.....	76
II.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	78
1)	Dispositif expérimental :.....	78
2)	Vulnérabilité à la cavitation sur tiges.....	79
3)	Potentiel de perte de turgescence	80
4)	Mesure de la conductance minimale.....	81
5)	Vulnérabilité à la cavitation des feuilles	81
6)	Simulations avec le modèle SurEau	82
7)	Statistiques	83
III.	RÉSULTATS.....	83
IV.	DISCUSSION :.....	86
Discussion générale		91
I.	Sources de variation de la résistance à la cavitation et leurs bases structurelles	91
1)	La plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation ne repose pas sur les ponctuations.	91
2)	Autres sources de variation de la structure du xylème à l'échelle intra-spécifique.....	93
II.	Vulnérabilité à la cavitation ou vulnérabilité à l'embolie ?.....	94
III.	Qu'en est-il des autres types de xylème ?.....	95
IV.	Impacts fonctionnel et écologique de l'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation	98
Références		100
Annexes		a
I.	Recherche de plasticité de la vulnérabilité à la cavitation du blé : matériel et méthodes a	
II.	Plasticity of xylem vulnerability to cavitation and its structural determinants in <i>Populus tremula x alba</i>	c

Liste des abréviations

A_p	Surface moyenne de ponctuation par vaisseau
A_v	Surface moyenne de vaisseau
D_a	Diamètre moyen des ouvertures des ponctuations
D_p	Diamètre moyen des ponctuations
D_v	Diamètre moyen des vaisseaux
E	Transpiration
F_c	Fraction moyenne de paroi en contact entre vaisseaux
F_p	Fraction moyenne de ponctuations en contact entre vaisseaux
F_{pf}	Fraction des champs de ponctuations occupés par des ponctuations
GI	Indice de groupement des vaisseaux
GS	Taille d'un groupe de vaisseaux
g_{min}	Conductance minimale
g_s	Conductance stomatique
HSM	Marges de sûreté hydrauliques
K_h	Conductivité hydraulique théorique
K_s	Conductivité hydraulique spécifique
MET / TEM	Microscopie électronique à transmission
MEB / SEM	Microscopie électronique à balayage
LA	Surface foliaire
LD	Condition de culture « <i>full-Light, Droughted</i> »
L_p	Profondeur moyenne des chambres de ponctuation
L_v	Longueur médiane des vaisseaux
LW	Condition de culture « <i>full-Light, well-Watered</i> »
$P_{50} / P_{12} / P_{88}$	Potentiel hydrique induisant 50, 12, 88 % de perte de conductance
P_c	Potentiel de cavitation d'un vaisseau
PLC	Pourcentage de perte de conductance
RWC	Contenu relatif en eau
SI	Indice de solitarité des vaisseaux
SW	Condition de culture « <i>Shaded, well-Watered</i> »
t_{HF}	Temps avant dysfonctionnement hydraulique
T_m	Épaisseur de la paroi de ponctuation
VC	Vulnérabilité à la cavitation
VE	Vulnérabilité à l'embolie
VPD	Déficit de pression de vapeur
Ψ	Potentiel hydrique
Ψ_{min}	Potentiel hydrique minimum
Ψ_{pd}	Potentiel hydrique de base
Ψ_{TLP}	Potentiel de perte de turgescence

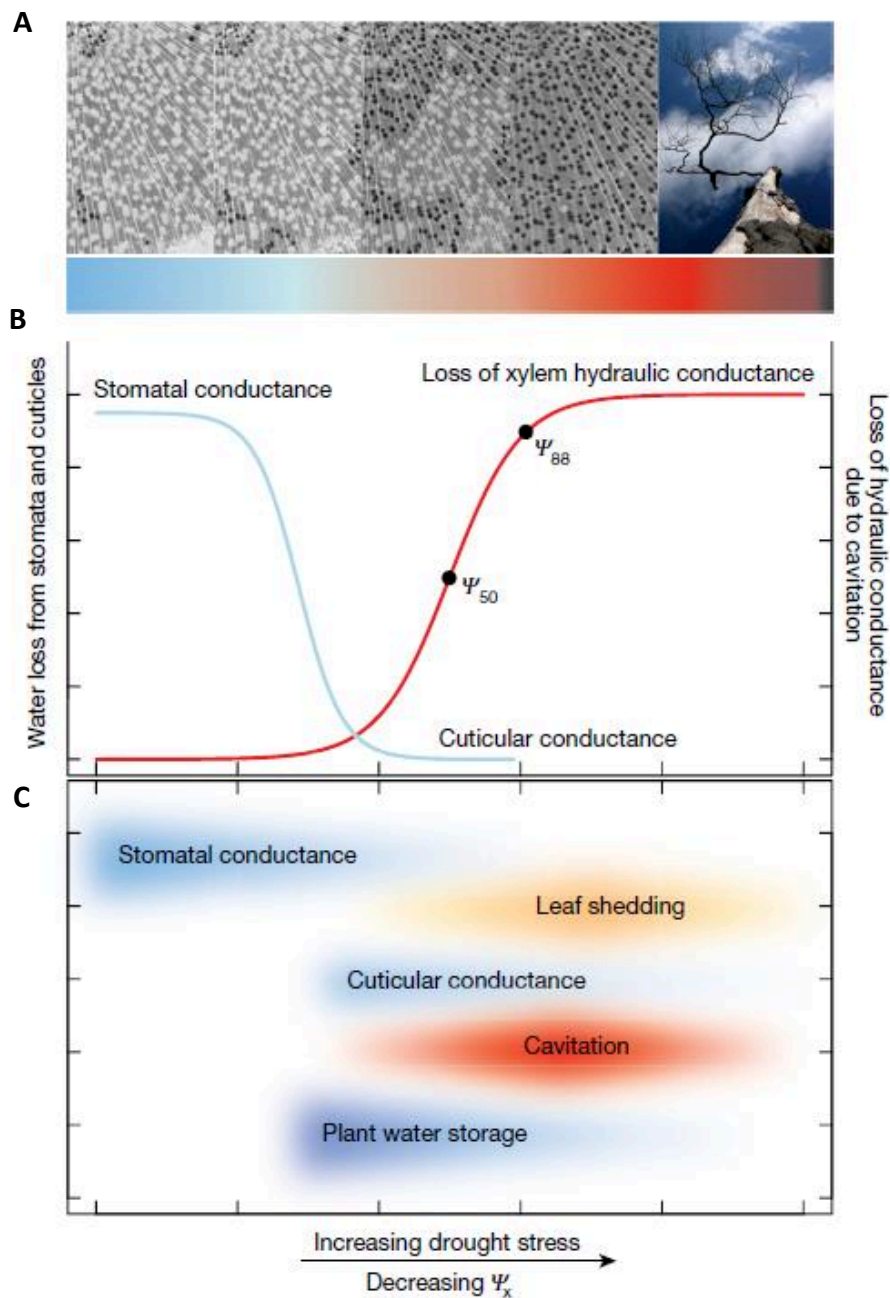


Figure 1 : Réponse de la plante face à une sécheresse. **A** : Embolie du xylème avec l'augmentation du stress hydrique. Le dégradé de couleurs représente la diminution des potentiels hydriques. Les vaisseaux fonctionnels (en blanc) cavitent et se remplissent d'air (en noir), jusqu'à la mort de l'individu. **B** : Évolution de la conductance stomatique et de la perte de conductance en fonction de la diminution des potentiels hydriques. **C** : Dynamique des réponses fonctionnelles de l'arbre face à une sécheresse s'intensifiant (Choat *et al.*, 2018).

Synthèse bibliographique

I. L'arbre en situation de sécheresse

1) Vulnérabilité face à la sécheresse

Les plantes consomment de très grandes quantités d'eau. Un arbre de 20 mètres consomme entre 10 et 200 l d'eau par jour, avec même des observations dépassant les 400 l par jour (Jordan & Kline, 1977 ; Wullschleger *et al.*, 1998). Seule une petite partie de cette eau est effectivement utilisée pour le métabolisme, la majorité étant évapotranspirée dans l'atmosphère.

Les conséquences d'une diminution de la quantité d'eau disponible dans le sol peuvent être dramatiques pour les arbres. Il a été montré dans une méta analyse que de nombreux dépérissements forestiers sont liés à la sécheresse ou à la chaleur (Allen *et al.*, 2010). Cette étude montre que tous les biomes sont impactés par la sécheresse et qu'un déficit hydrique par rapport à une situation considérée comme normale pour le biome en question peut conduire à de la mortalité. Face aux changements climatiques à venir, il est indispensable de comprendre les mécanismes à l'origine de la mortalité de la plante en situation de sécheresse (Allen *et al.*, 2015 ; Choat *et al.*, 2018). Une des conséquences des changements climatiques se fait déjà sentir à l'heure actuelle en France. Les communautés végétales, sont constituées d'espèces préférant des températures plus chaudes en comparaison aux espèces relevées dans les mêmes communautés 10 ans auparavant (Martin *et al.*, 2019). Ce changement s'observe surtout pour les espèces annuelles. Cela pose la question de la survie des arbres, qui peuvent avoir des durées de vie très longues, et donc la problématique du comportement des populations naturelles. La plasticité phénotypique est un mécanisme qui permet à un individu de modifier son phénotype pour s'acclimater à de nouvelles conditions environnementales et ainsi maintenir (voire augmenter) sa valeur sélective dans ce nouvel environnement. Ce mécanisme pourrait permettre aux arbres de survivre dans un environnement plus contraint au niveau hydrique (Choat *et al.*, 2012 ; Allen *et al.*, 2015). Dans cette thèse, nous étudierons quels sont les paramètres

anatomiques qui sont à l'origine de la plasticité phénotypique de la tolérance à une sécheresse extrême.

Les causes de la mortalité en situation de sécheresse ont été identifiées et sont le résultat de dysfonctionnement hydraulique : du fait des contraintes hydriques, les forces de tension dans le xylème augmentent, jusqu'à provoquer la rupture des colonnes d'eau (Tyree *et al.*, 2002 ; Adams *et al.*, 2017). La rupture des colonnes d'eau provoque l'apparition d'une bulle d'air dans le système, on parle alors de cavitation. Les vaisseaux ainsi remplis d'air sont dits embolisés et ne sont plus fonctionnels. Si le pourcentage de vaisseaux impactés par l'embolie est trop élevé, le système vasculaire ne peut plus approvisionner les tissus en eau, provoquant la mort de l'individu (Fig. 1) (Tyree *et al.*, 2002 ; Adams *et al.*, 2017 ; Choat *et al.*, 2018). La tolérance à la cavitation du xylème est donc la dernière protection qu'a un arbre avant la discontinuité hydraulique entre le houppier et les racines, qui entraîne la mort de l'individu. Ce trait est primordial car c'est lui qui déterminera la différence entre une plante qui survie ou qui succombe à la sécheresse. Afin de retarder l'échéance, il est possible pour un arbre de construire un xylème plus tolérant aux forces de tension, donc à la cavitation. La résistance à la sécheresse a souvent été exprimée par le trait du « P_{50} », c'est-à-dire les forces de tension nécessaires pour induire 50 % de perte de conductance dans le xylème ; et ce trait est aujourd'hui le plus utilisé pour comparer les espèces ou variétés pour leur résistance à la sécheresse (Cochard *et al.*, 2008).

Pour étudier la question de la plasticité de la résistance à la cavitation, nous utiliserons une espèce modèle, le peuplier. Cette espèce a été retenue car c'est une espèce vulnérable à la cavitation dont la croissance est rapide (Cochard *et al.*, 2007), chez laquelle la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation a déjà été mise en évidence (Awad *et al.*, 2010 ; Plavcová & Hacke, 2012). De plus, le séquençage du génome facilite les études moléculaires et autorise la production de mutants (Awad *et al.*, 2012 ; Allario *et al.*, 2018). Nous utiliserons un hybride, *Populus tremula x alba*, déjà utilisé par l'unité dans des recherches précédentes (Awad *et al.*, 2010 ; Niez *et al.*, 2019), car sa multiplication clonale *in vitro* est maîtrisée en routine dans le laboratoire.

2) Limiter les pertes en eau : la fermeture stomatique

En cas de sécheresse, les arbres ont toute une diversité de réponses afin de limiter les pertes en eau et ainsi d'épuiser les réserves en eau du sol. L'un des principaux outils de contrôle

des relations hydriques dont disposent les plantes sont les stomates (Fig 1). Les stomates sont des pores à la surface des feuilles qui permettent l'entrée du CO₂ et la sortie d'H₂O. En les fermant, les plantes peuvent contrôler la conductance hydraulique ou le niveau d'embolie dans leur xylème (Meinzer & Grantz, 1990 ; Jones & Sutherland, 1991). Il y a de ce fait coordination entre fermeture stomatique et cavitation du xylème (Sparks & Black, 1999 ; Brodribb *et al.*, 2003).

En situation de sécheresse, les plantes font face à un compromis concernant la fermeture stomatique : soit elles ferment leurs stomates afin de limiter les pertes en eau et contrôler les forces de tension de leur xylème, se privant ainsi des entrées de CO₂ nécessaires à leur métabolisme ; soit elles gardent leurs stomates ouverts mais s'exposent ainsi au risque de dysfonctionnement hydraulique lorsque les réserves en eau du sol seront épuisées ou que les forces de tension seront trop importantes (Tardieu & Simonneau, 1998 ; McDowell *et al.*, 2008). En effet, du fait de leur petite taille, les molécules d'eau s'échappent beaucoup plus vite que le CO₂ n'entre par les stomates : le ratio entre eau perdue et CO₂ fixé est appelé *efficience de l'utilisation de l'eau* (WUE) (Viets, 1962). La WUE des plantes à métabolisme classique (dites « C3 ») est très faible : pour 1 mole d'eau évaporée seule 0,5 à 1,5 mmol de CO₂ sont fixées (Nobel, 1991).

La stratégie de fermeture stomatique en fonction de l'intensité du stress a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et les auteurs ont décrit deux stratégies en fonction de la fermeture stomatique : iso- ou anisohydrique (Tardieu & Simonneau, 1998). Une espèce qui ferme ses stomates afin de maintenir son niveau de stress (aussi appelé *potentiel hydrique*) constant malgré la diminution de la demande évaporative au cours d'une journée ou saison sera qualifiée d'isohydrique tandis qu'une espèce favorisant le maintien des échanges gazeux et donc ne fermant pas ses stomates au cours d'une journée ou saison sera qualifiée d'anisohydrique (Tardieu & Simonneau, 1998). À titre d'exemple, le peuplier est considéré comme une espèce isohydrique même si certains génotypes ont un comportement anisohydrique (Attia *et al.*, 2015). Mais des auteurs appellent aujourd'hui à dépasser ce concept, remis en cause par une méta-analyse (Martínez-Vilalta *et al.*, 2014) et discuté par des revues récentes (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017, Hochberg *et al.*, 2018). Au-delà de ces deux stratégies définies arbitrairement, on retrouve surtout un degré d'iso ou d'anisohydrie lorsque la stratégie de fermeture stomatique d'une espèce tend vers l'une de ces deux stratégies (Martínez-Vilalta & Garcia-Forner, 2017). Une des critiques qui est faite est qu'en se basant uniquement sur le niveau de stress hydrique subit par la plante pour fermer ses stomates sans prendre en compte la tolérance de la plante pour la sécheresse, ce concept range les espèces dans des catégories

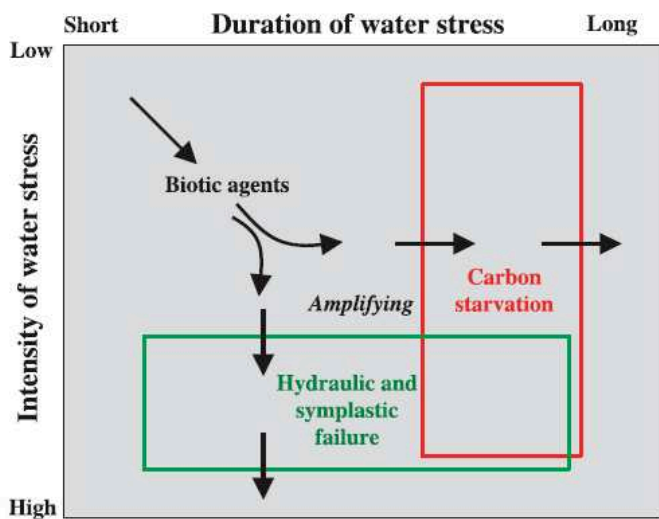
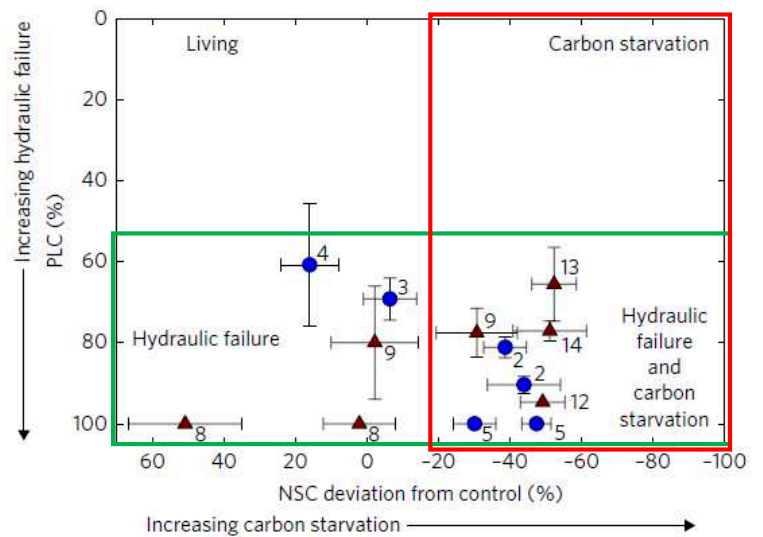
A**B**

Figure 2 : Dysfonctionnement hydraulique et famine carbonée. **A** : Représentation conceptuelle du mécanisme conduisant à la mort de l'arbre en fonction de l'intensité et de la durée de la sécheresse. **B** : Réponse physiologique en lien avec le dysfonctionnement hydraulique (PLC, Niveau d'embolie) et la famine carbonée (réserves en sucres, NSC) de plants soumis à une sécheresse létale. Issu d'une méta-analyse ; chaque point représente les résultats d'une étude pour une espèce. Cercles bleus, angiospermes ; triangles rouges, gymnospermes. Cadre vert, résultats compatibles avec le dysfonctionnement hydraulique ; cadre rouge, résultats compatibles avec la famine carbonée (A. McDowell *et al.*, 2008 ; B. d'après Adams *et al.*, 2017).

arbitraires et éloignées des observations expérimentales. Par exemple, un changement de stratégie (de aniso- vers isohydrique) a pu être observé suivant l'intensification d'un stress hydrique pour un cultivar de vigne (Charrier *et al.*, 2018). Le débat concernant l'utilisation de ce concept est toujours en cours (Ratzmann *et al.*, 2019).

3) Face à une sécheresse qui se prolonge, l'arbre risque-t-il de mourir... de faim ?

Lorsqu'il y a fermeture stomatique, les plantes vivent sur leurs réserves en carbone stocké sous forme de sucres. En cas de sécheresse prolongée, celles-ci doivent parfois en arriver à l'autolyse (respiration de défense) pour survivre. Dans une revue faisant date, McDowell *et al.* (2008) expliquent que la fermeture stomatique prolongée peut mener à la mort de l'individu (Fig. 2). On parle alors de famine carbonée (ou *carbon starvation*). Cette hypothèse a été étouffée par Sala *et al.*, (2010) qui précisent que pour éviter la *famine carbonée* la plante peut diminuer ses besoins en carbone. En réponse à une sécheresse, il y a ainsi à une diminution de la respiration racinaire sous l'effet de la diminution de la teneur en eau du sol (Bryla *et al.*, 1997 ; 2001) et à une diminution de la respiration (Atkin & Macherel, 2009). En cas extrême, on observe de la mortalité foliaire et racinaire fines (Rojas-Jiménez *et al.*, 2007). Toutes ces réponses conduisent à réduire la demande en carbone donc retarde le risque de *famine carbonée* (Sala *et al.*, 2010). De plus, Sala *et al.*, (2010) ajoutent que la plante peut mourir de *famine carbonée* même si les réserves en eau ne sont pas totalement épuisées, par exemple si la plante, trop affaiblie, est incapable de mobiliser ses réserves stockées. Il serait donc possible pour un individu de mourir de *famine carbonée* tout en disposant encore de réserves de sucres. O'Brien *et al.*, (2014) ont montré l'importance des réserves en sucres dans la survie à une sécheresse extrême. Toutefois, des dispositifs expérimentaux testant spécifiquement ce compromis ainsi qu'une méta-analyse récente montre que le dysfonctionnement hydraulique est systématiquement présent lors de la mort de l'individu (Fig. 2) (Hartmann *et al.*, 2013 ; Sevanto *et al.*, 2014 ; Adams *et al.*, 2017). Ces résultats montrent l'importance de prendre en compte la tolérance à la cavitation lorsque l'on étudie la résistance à la sécheresse.

4) La mortalité en situation de sécheresse

Depuis plusieurs décennies, il a été montré que l'embolie constitue un facteur pouvant mener à la mort des individus (Tyree *et al.*, 2002), même si les mécanismes expliquant la mort

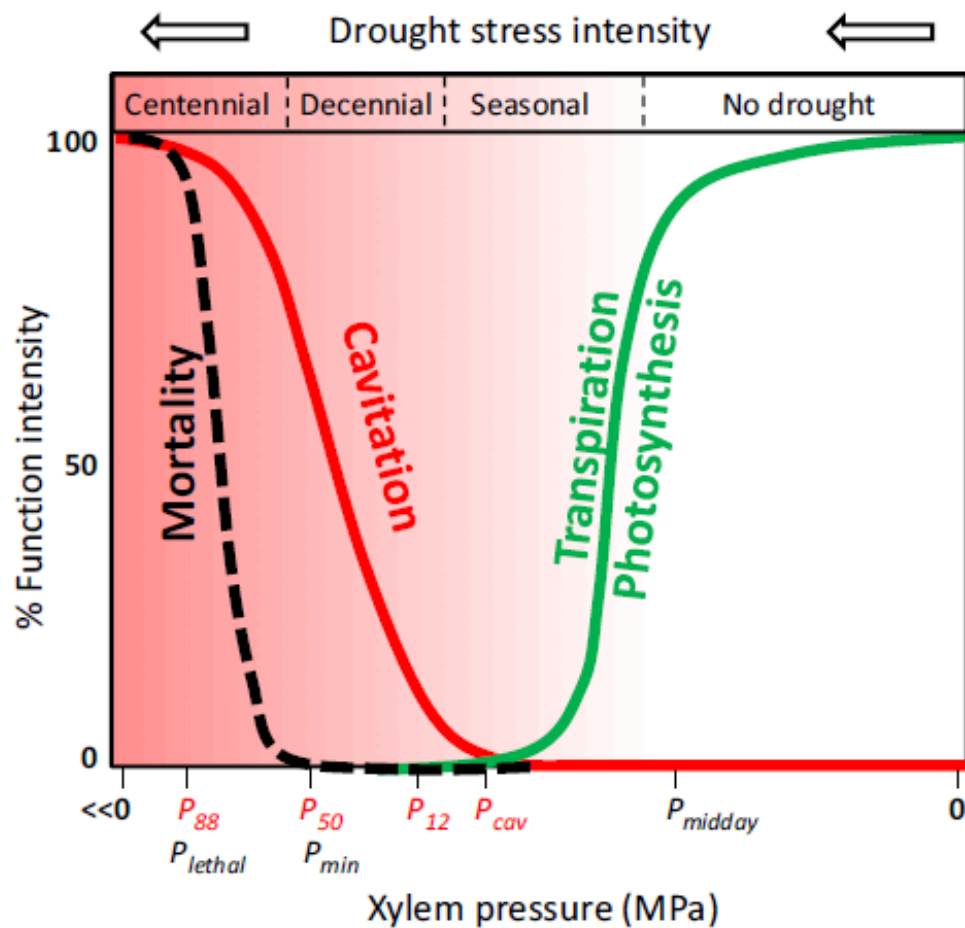


Figure 3 : Réponse fonctionnelle de l'arbre face à une sécheresse intense. Le bandeau supérieur renseigne sur la fréquence de chaque évènement (Delzon & Cochard, 2014).

de l'arbre lors d'un dysfonctionnement hydraulique sont, aujourd'hui encore, mal connus. S'il peut être intéressant de comprendre quels sont les mécanismes en jeu lors de la mortalité sous l'effet d'un stress hydrique, connaître les seuils entraînant la mort des individus est suffisant pour comprendre la capacité de survie des peuplements forestiers (Allen *et al.*, 2015 ; Choat *et al.*, 2018). En ce sens, le niveau d'embolie à partir duquel certains individus ne reprennent pas leur croissance même lors d'une reprise de l'arrosage (aussi appelé *point de non-retour*) a été quantifié récemment à 90 % de perte de conductance pour les angiospermes (Barigah *et al.*, 2013) et 50 % pour les conifères (Brodribb *et al.*, 2009 ; bien que ce seuil soit toujours l'objet de débats : Hammond *et al.*, 2019). Ainsi, l'embolie est un paramètre majeur lorsque l'on s'intéresse à la survie des plantes à une sécheresse.

Afin de rendre compte de la stratégie hydrique des espèces en réponse à la sécheresse, les auteurs ont développé un nouveau concept en tenant compte de leur tolérance à la cavitation. Il s'agit de la Marge de Sécurité Hydraulique, définie comme étant l'écart séparant le potentiel hydrique le plus bas, mesuré sur le terrain, du potentiel hydrique pour lequel on a le dysfonctionnement hydraulique (Meinzer *et al.*, 2009). Cet écart est exprimé en mégapascal, l'unité servant à décrire l'intensité d'un stress hydrique (voir partie II.3. *Le potentiel hydrique*). Ainsi, certaines espèces ferment leurs stomates en limite de dysfonctionnement hydraulique tandis que d'autres ont une marge de sécurité plus importante les rendant moins vulnérables face à une sécheresse. Pour de très nombreuses espèces en revanche, la marge de sécurité est similaire quel que soit le biome considéré, en moyenne de 2 MPa, signe qu'il y a une convergence évolutive sur ce paramètre (Choat *et al.*, 2012).

Dans le même temps, il est important de garder à l'esprit que les sécheresses capables d'induire de tels niveaux d'embolie sont des événements extrêmes, donc peu communs (Fig. 3) (Cochard & Delzon, 2013 ; Delzon & Cochard, 2014). Par exemple, une sécheresse intense peut laisser le système hydraulique des arbres intacts si les mécanismes de contrôle sont suffisants (Dietrich *et al.*, 2019). Cependant, lorsque l'un de ces événements extrêmes se produit c'est tout un peuplement qui est affecté, comme cela a pu être le cas lors de sécheresses au Texas et en Californie où plusieurs millions d'arbres sont morts (Asner *et al.*, 2016 ; Moore *et al.*, 2016). Du fait de la marge de sécurité hydraulique similaire quel que soit le biome (Choat *et al.*, 2012), ces dépérissements de peuplements entiers ont lieu dans tous les biomes de la planète, y compris dans des milieux que l'on pourrait penser épargnés, comme les forêts tropicales humides (Allen *et al.*, 2010 ; pour un recensement récent de ce type d'événements à travers le monde : Hartmann *et al.*, 2018). Les modèles prévoient que les climats futurs

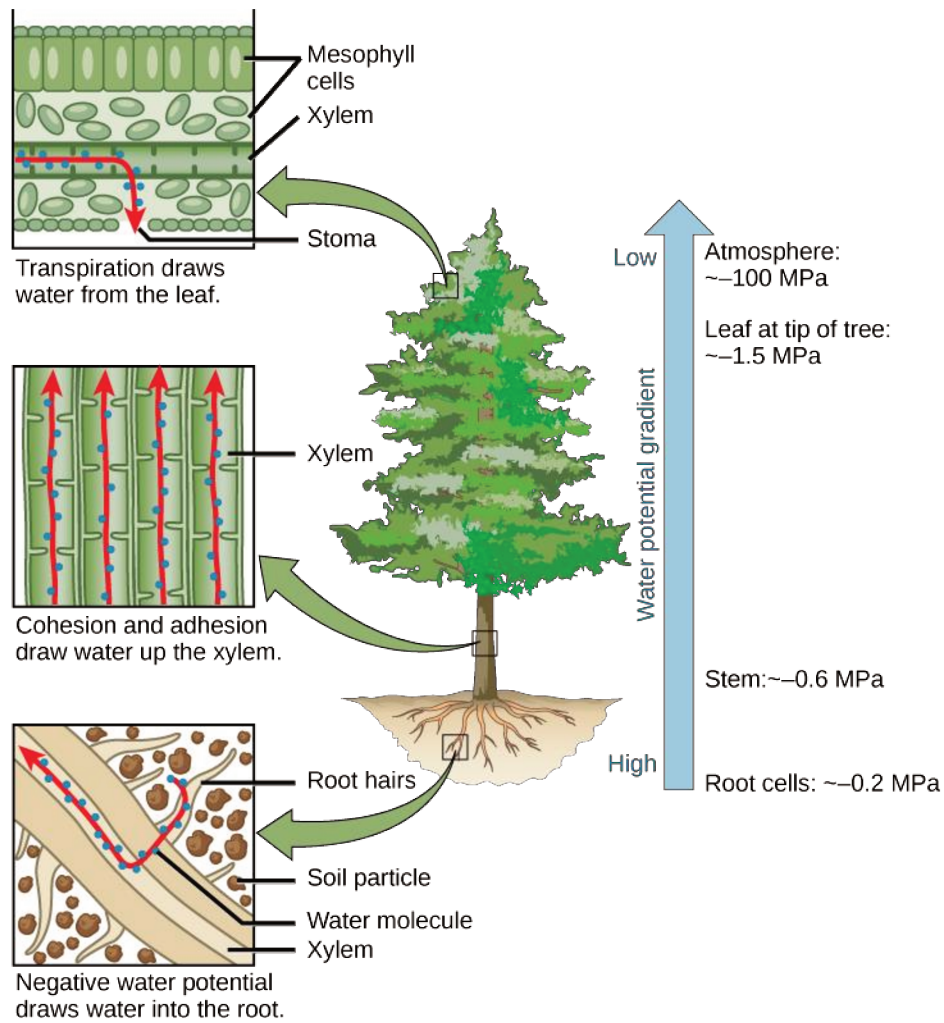


Figure 4 : Ascension de la sève dans un arbre.

imposeront aux arbres des contraintes plus fortes, ce qui rend nécessaire leur capacité à ajuster leurs mécanismes de contrôle des relations hydriques et de tolérance à la sécheresse (Cochard 2019 ; Brodribb *et al.*, 2019). Dès lors, comprendre la capacité des arbres à s'acclimater à des conditions plus stressantes sur le plan hydrique en augmentant leur résistance à la cavitation est essentiel pour anticiper les modifications de composition des massifs forestiers sous un climat changeant.

Avant de nous pencher sur la variabilité de la résistance à la cavitation, aussi bien lorsque l'on compare les espèces que dans le cas de la variabilité à l'échelle intra-spécifique, nous devons nous pencher tout d'abord sur les relations hydriques des plantes et le transport de l'eau dans le xylème ; puis sur les mécanismes de formation et de propagation de la cavitation dans le xylème.

II. Fonctionnement hydraulique

Comprendre le phénomène de la cavitation chez les plantes va nous demander quelques rappels concernant le fonctionnement hydraulique et le transport de l'eau.

Comme pour tout être vivant, l'eau est d'une importance primordiale chez les plantes car nécessaire à leur métabolisme. Chez les plantes, l'eau répond à des enjeux supplémentaires : refroidissement des feuilles chauffées par la photosynthèse, transport d'éléments minéraux puisés dans le sol. L'eau et les sels minéraux sont puisés dans le sol par les racines puis transportés jusqu'aux feuilles par un tissu spécialisé, le xylème (Fig. 4). Ce flux ascendant est appelé « sève brute ». Dans les feuilles, la majorité de l'eau est transpirée par les stomates. La fraction restante de sève brute se charge en sucres issus de la photosynthèse, devenant ainsi de la « sève élaborée ». Puis elle est transportée de façon basipète par le phloème afin d'assurer la nutrition carbonée de tous les tissus de la plante. Dans cette étude, nous nous intéresserons principalement au transport de l'eau sous forme de sève brute dans le xylème.

1) Le continuum hydrique sol - plante - atmosphère

L'absorption de l'eau au niveau des racines se fait au niveau des cellules de l'épiderme et de leurs poils absorbants par osmose inverse (Fig. 5). Son acheminement jusqu'au xylème

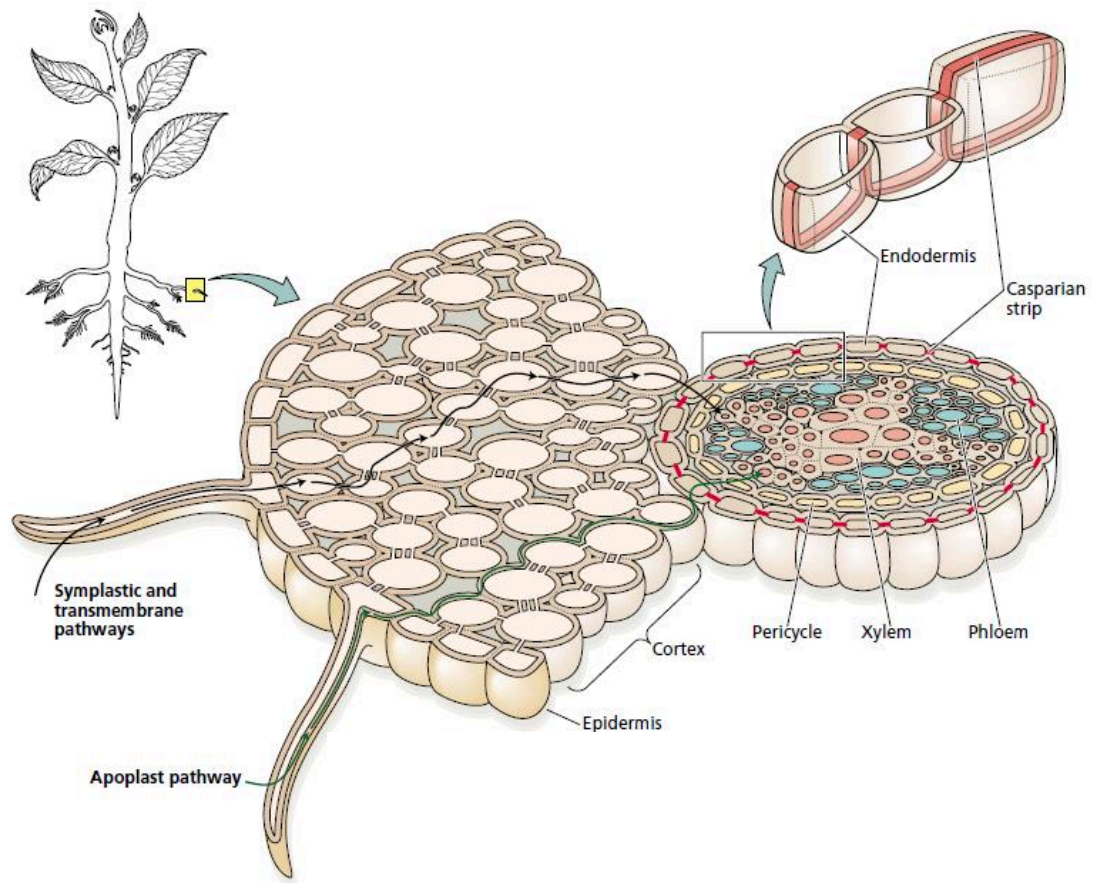


Figure 5: Absorption de l'eau par les racines. Les voies symplasmiques et apoplasmiques sont représentées respectivement en noir et vert. Entre le cortex et le péricycle, le cadre de Caspary (en rouge) force l'eau à emprunter la voie symplasmique (Taiz & Zeiger, 2010).

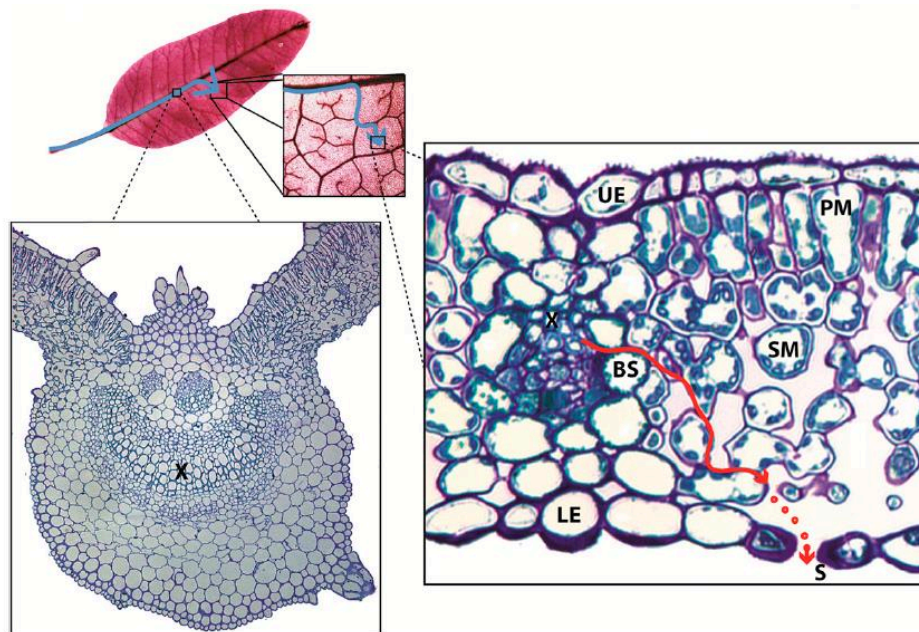


Figure 6: Trajet de l'eau dans les feuilles. En bleu, trajet dans le xylème ; en rouge, trajet dans la voie symplasmique dans les cellules du mésophile. Trait plein, eau liquide ; Trait en tirets, vapeur d'eau. X, xylème ; S, stomate (Scoffoni *et al.*, 2017).

de la racine à travers le cortex se fait par diffusion passive et peut suivre trois voies appelées apoplasmique, symplasmique et transmembranaire (Scott & Priestley, 1928 ; Newman, 1976 ; Steudle, 2000). Dans la voie apoplasmique, principalement utilisée, l'eau circule dans l'épiderme et le cortex via les parois pectocellulosiques des cellules et les espaces intercellulaires, sans jamais traverser de membrane plasmique. Puis la circulation dans les parois est bloquée par le Cadre de Caspary, où les cellules de l'endoderme présentent un cadre composé de cires hydrophobes, la subérine, qui empêche le passage de l'eau. Avec les solutés, elle est contrainte de traverser la membrane plasmique, ce qui permet à la plante de filtrer les sels absorbés. Dans la voie symplasmique, l'eau circule de cellule en cellule en passant par les plasmodesmes, des canaux traversant la paroi des cellules végétales et permettant de ce fait une connexion directe entre les cytoplasmes de cellules adjacentes. En utilisant la voie symplasmique, l'eau n'a pas à franchir de paroi cellulaire ainsi que la forte résistance qui y est associée. Enfin, la dernière voie est la voie transmembranaire, où l'eau passe de cellule en cellule en traversant les membranes cellulaires grâce à des protéines transmembranaires, les aquaporines (Javot *et al.*, 2003).

L'eau est ainsi transportée suivant ces trois voies jusqu'au xylème, puis par le xylème jusqu'aux feuilles (Fig. 6). Elle passe alors la paroi des cellules du mésophylle puis est évaporée dans la chambre sous-stomatique. Enfin, par diffusion due à la différence de concentration de vapeur entre la chambre sous-stomatique et l'atmosphère, l'eau gazeuse passe le stomate (Darwin, 1916 ; Jeffereys, 1918 ; Larmor, 1918). Aussi, l'on parle de *continuum hydrique* entre le sol, la plante et l'atmosphère (van den Honert, 1948 ; Vaadia *et al.*, 1961).

Le trajet de l'eau dans la plante se fait contre la force de gravité : il existe donc une force à l'origine de cette montée.

2) La tension-cohésion

Un tube très fin permettrait une montée de l'eau en utilisant les forces de capillarité mais cette montée s'oppose à une résistance due aux forces de frottement (Fig. 7.A). À l'inverse, un tube de diamètre plus important qui ne permet pas d'utiliser les forces de capillarité offrira une résistance au flux bien moindre. Afin de maximiser la conductance de leurs tissus conducteurs, les plantes ont choisi la seconde option (Fig. 7.B) (Sperry 2011). En conséquence, elles doivent utiliser d'autres mécanismes que la capillarité comme force motrice pour la montée de la sève.

La théorie de la tension cohésion explique aussi bien la force permettant la montée de l'eau contre la gravité que le maintien de l'intégrité de la colonne d'eau (Dixon & Joly, 1895).

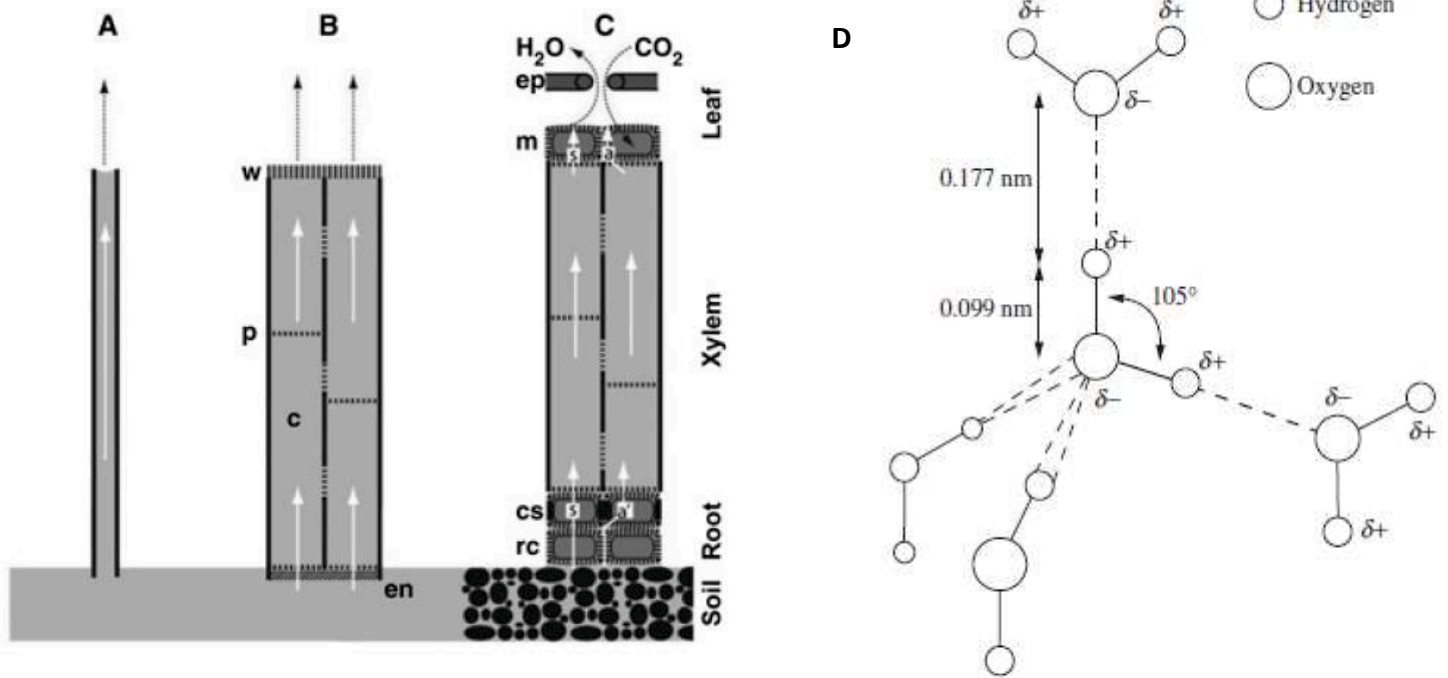


Figure 7: Mécanisme de tension-cohésion. **A** : Montée de l'eau dans un tube fin par capillarité. **B** : montée de l'eau par tension-cohésion dans des vaisseaux de plus gros diamètres (c), une configuration plus proche du fonctionnement des plantes. *en*, endoderme ; *p*, ponctuations; *w*: pores dans les parois cellulaires. **C** : représentation complexifiée par l'ajout de cellules vivantes (voie symplasmique) : *rc*, cortex ; *cs*, cadre de Caspary ; *m*, mésophylle ; *ep* ; épiderme. **D** : Représentation de la liaison hydrogène du fait de la polarité des molécules d'eau (**A-C**, : Lucas *et al.*, 2013; d'après Sperry, 2011 ; **D**, Jones, 2014).

Cette théorie fait l'objet d'un large consensus dans la communauté scientifique comme étant le mécanisme expliquant la montée de l'eau dans les plantes (Milburn 1996 ; Angeles *et al.*, 2004).

L'eau transpirée au niveau des stomates crée un « appel d'eau » qui va tirer les molécules d'eau alentours, et, de proche en proche, l'ensemble de la colonne d'eau, à la manière d'une corde que l'on tire par le haut. (Fig. 7.B). Ces forces sont à l'origine de la montée de l'eau dans l'arbre et exposent les colonnes d'eau à des forces de pression négative (on parle alors de *tension*). Du fait de la polarité des molécules d'eau, les liaisons hydrogènes lient les molécules entre elles et les colonnes d'eau conservent ainsi leur intégrité même sous tension. Si les forces de tension sont trop importantes il est possible que la colonne d'eau rompe : ce phénomène est appelé *cavitation* (voir partie III.1. *Cavitation d'un liquide sous tension*).

Ainsi :

- 1- Les colonnes d'eau sont soumises à des forces de *tension*, qui sont à l'origine de la montée de l'eau dans la plante.
- 2- Les forces de *cohésion* entre molécules d'eau assurent l'intégrité des colonnes d'eau malgré ces forces de tension.

Si la demande évaporative augmente, alors les quantités d'eau sortant par les stomates peuvent être plus importantes que les quantités d'eau entrant par les racines. La plante peut alors combler ce déficit hydrique en puisant dans des tissus de réserves : parenchyme, moelle, phloème, cambium. Cette utilisation de l'eau stockée provoque une contraction de la tige due à la décharge des réserves en eau (Kramer, 1937 ; Schroeder & Wieland, 1956 ; Fritts, 1958). Ce phénomène peut être utilisé pour suivre l'état hydrique des plantes (Impens & Schalck, 1965 ; Steppe *et al.*, 2005) ou en lien avec la résistance à la cavitation (Rosner *et al.*, 2009). Dans des études récentes, le contenu en eau de ces tissus a été couplé avec le taux d'embolie des tiges chez plusieurs espèces (Knipfer *et al.*, 2019 ; Rosner *et al.*, 2019).

3) Le potentiel hydrique

Le potentiel hydrique représente l'énergie libre de l'eau par unité de volume (J.m^{-3}). Le potentiel hydrique d'un système (cela peut-être le sol, l'atmosphère, une cellule végétale) représente ainsi l'affinité de l'eau pour son système, autrement dit la force nécessaire pour extraire l'eau de ce système (Taiz & Zeiger, 2010). Pour des raisons historiques, les biologistes le mesurent en utilisant une unité de pression, le Pascal (symbole Pa) (Slatyer & Taylor, 1960).

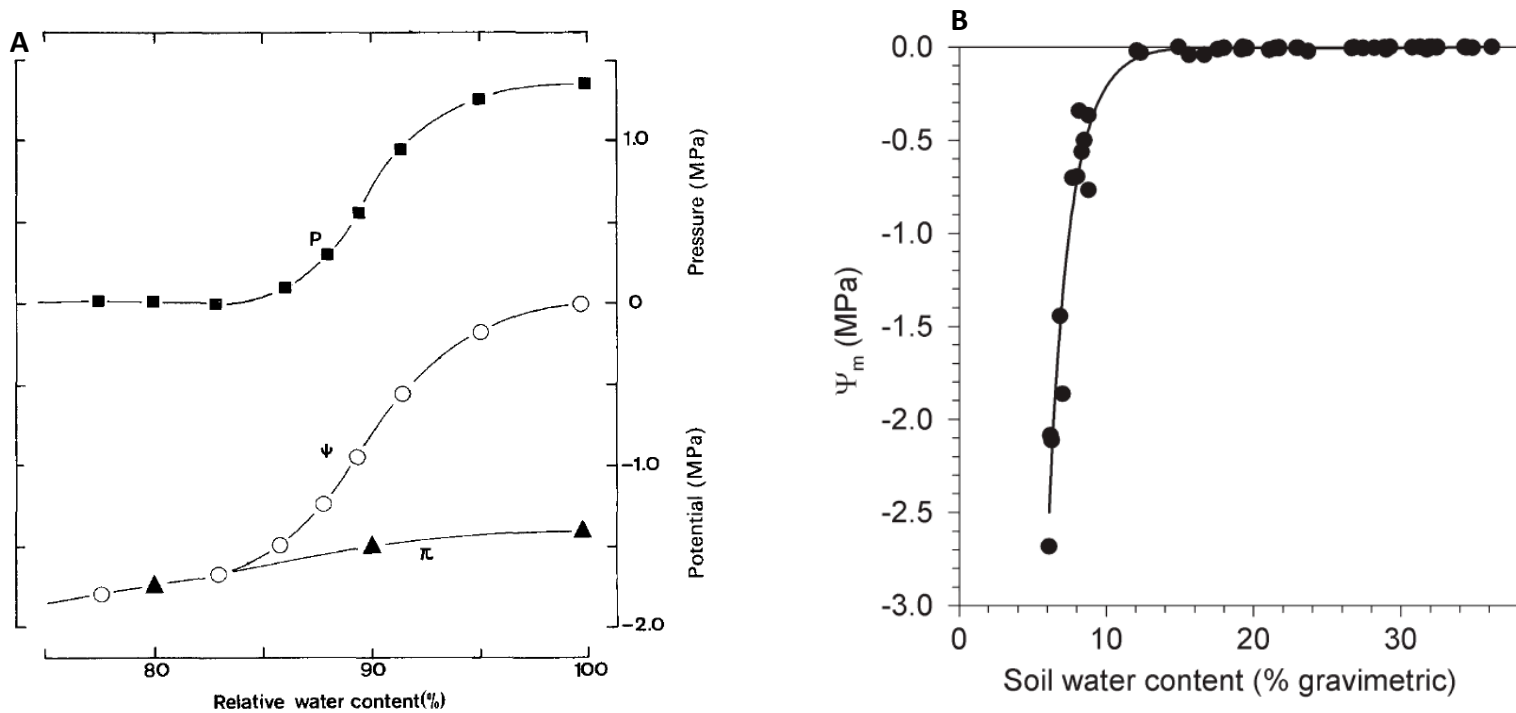


Figure 8 : Évolution de potentiels hydriques en fonction de la quantité en eau relative. **A** : Potentiel hydrique d'une cellule vivante (ψ ; cercles blancs), qui est la résultante du potentiel hydrostatique (P , carrés noirs) et du potentiel osmotique (π ; triangles noirs). Lorsque la cellule perd de l'eau, le potentiel hydrostatique diminue fortement mais le potentiel osmotique ne diminue presque pas. Lorsque le potentiel hydrostatique est égal au potentiel osmotique, le système est à l'équilibre et le potentiel hydrique de la cellule est égal à 0. (Turner, 1981). **B** : Relation entre le potentiel matriciel et la quantité d'eau d'un sol (Sack, 2004).

a) Composantes du potentiel hydrique

Le potentiel hydrique, noté Ψ , est la somme de plusieurs composantes. Selon la convention la plus largement adoptée par la communauté, il peut être décomposé de la façon suivante (Milthorpe, 1960):

$$\Psi = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$$

Avec :

- Ψ_s , le potentiel osmotique, représente l'action des solutés dissous dans l'eau, qui réduisent l'énergie libre de celle-ci en la diluant. Il est donc contrôlé par la concentration en soluté dans l'eau. Il est calculé par la relation de van't Hoff (Zur, 1966):

$$\Psi_s = -RTc_s$$

où R est la constante des gaz parfaits ($8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T la température en Kelvin et c_s la concentration en soluté de la solution, exprimée en molaire (mol.L^{-1}).

- Ψ_p , le potentiel hydrostatique, représente l'effet de la pression sur le potentiel hydrique (Fig. 8.A). Si il est positif dans une cellule végétale en turgescence, il est en revanche négatif dans le xylème (ces *pressions négatives* sont appelées des *tensions*) (Holbrook *et al.*, 1995 ; Pockman *et al.*, 1995 ; Steudle 1995).

- Ψ_g , le potentiel gravitationnel, dépend de la différence de hauteur (h) entre le point considéré et le point de référence (dans le cas d'une colonne d'eau dans les vaisseaux d'arbre, le niveau du sol) selon la relation :

$$\Psi_g = \rho_w \cdot g \cdot h$$

Avec ρ_w la densité de l'eau et g l'accélération due à la gravité. Ainsi, une différence de 10 m induit une différence de potentiel de 0.1 MPa.

- Ψ_m , le potentiel matriciel, utilisé dans le cas d'un sol, représente les forces de capillarité du sol. Sa valeur dépend du type de sol, de sa granulométrie et de l'abondance et diamètres des colloïdes (particules solides en suspension dans une solution) (Fig. 8.B). Ce terme est ajouté par convenance pour des raisons historiques mais est la résultante d'interactions entre Ψ_s et Ψ_p (Passioura, 1980).

Une autre convention consiste en la décomposition du potentiel hydrique de la façon suivante :

$$\Psi = \tau - \pi_D$$

où τ représente la pression osmotique à l'équilibre « en dialyse » (une solution est en équilibre « en dialyse » avec un système lorsqu'elle est à l'équilibre chimique en étant séparée

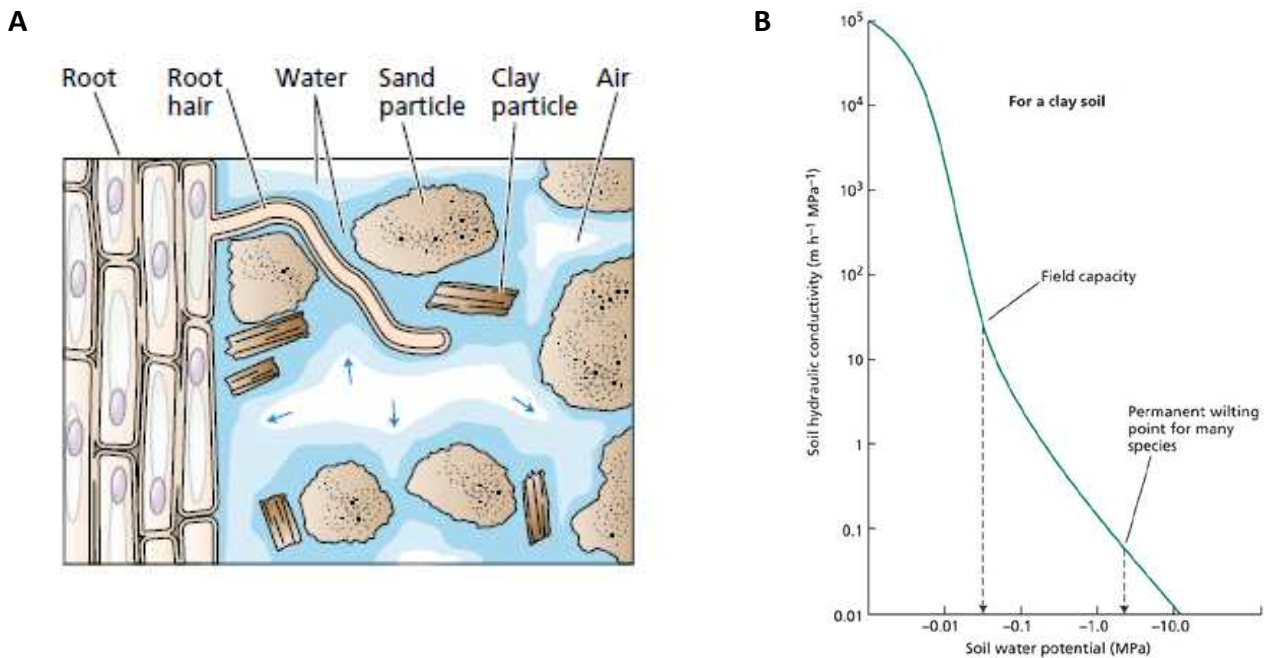


Figure 9 : Évolution de l'eau du sol. **A** : Lorsqu'un sol s'assèche, les interstices se remplissent d'air (bleu clair et flèches), le chemin de l'eau devient plus tortueux (bleu foncé). **B** : En conséquence, la conductivité du sol diminue et la force nécessaire pour extraire l'eau du sol augmente. Sont indiqués sur la courbe la capacité au champ (sol saturé en eau) et le point de flétrissement permanent pour la majorité des espèces (pression à partir de laquelle les cellules de la plante ne sont plus en turgescence) (Taiz & Zeiger, 2010).

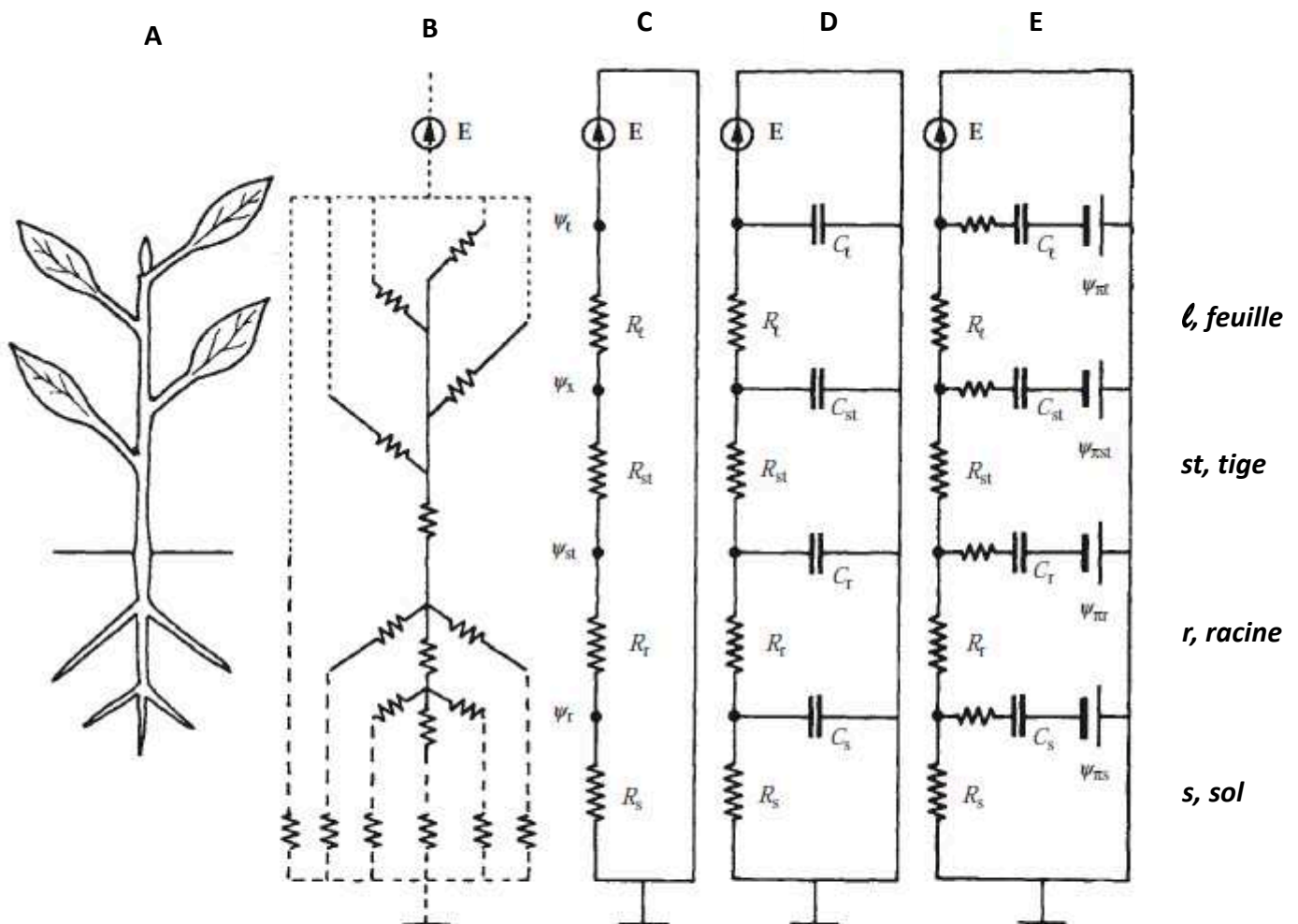


Figure 10 : Plante et son environnement représentés comme un circuit hydraulique. **A** : Schéma de la plante. **B** : Réseau de résistance du sol, racines, tige et feuilles. **C** : Représentation de la plante comme une série de résistances (R). **D** : Ajout de l'effet capacitance dû à l'eau stockée dans les tissus (C). **E** : Ajout de résistances pour les effets capacitances et de générateurs, qui représentent les potentiels osmotiques de chaque compartiment (ψ_{π}) (Jones, 2013).

du système par une membrane semi-perméable) et π_D un mélange entre la pression hydrostatique et osmotiques qui, d'après certains auteurs, ne peuvent être séparées expérimentalement (Passioura, 1980).

b) Moteur du mouvement de l'eau

L'eau se déplace du système au potentiel hydrique le plus haut (beaucoup d'énergie libre) vers le système au potentiel le plus bas (peu d'énergie libre) (Slatyer & Taylor, 1960). Les potentiels hydriques du sol et de l'atmosphère étant négatifs (autour de - 0.01 MPa pour un sol à capacité au champ, et - 2.5 MPa pour un sol sec (Fig. 8.B ; Sack 2004), autour de - 100 MPa pour l'atmosphère), les potentiels dans la plante doivent être négatifs et compris entre ces deux valeurs afin que la plante se place dans le gradient naturel (passage de l'eau du sol vers l'atmosphère à cause du gradient de potentiels). Lorsque le sol devient plus sec, l'air remplace l'eau dans les interstices (Fig. 9.A). Les chemins pour l'eau sont plus tortueux et moins nombreux. Les forces nécessaires pour extraire l'eau restante sont alors plus importantes : le potentiel hydrique du sol est plus bas (Gardner & Ehlig, 1962). En réponse, le potentiel hydrique de la plante diminue, condition nécessaire pour pouvoir continuer à extraire de l'eau du sol (Fig 9.B), jusqu'au point de flétrissement permanent (pression à partir de laquelle la plante ne peut pas retrouver sa pression de turgescence, même de nuit) (Gardner, 1960 ; Leclerc, 1999).

Le mouvement de l'eau peut être calculé selon les lois thermodynamiques (Edlefsen & Anderson, 1943), notamment en utilisant la Loi de diffusion de la matière de Fick (van den Honert, 1948) ou la loi d'Ohm pour caractériser les résistances du système. De ce fait, le circuit hydraulique est souvent représenté par analogie sous forme d'un circuit électrique avec résistances, générateur (la différence de potentiels hydriques entre sol et atmosphère) et condensateurs (l'effet capacitance dû aux tissus stockant de l'eau) (Cowan, 1965). Si cette représentation ne permet pas de visualiser l'effet de l'architecture hydraulique (voir partie V.2. *Organisation du xylème*), elle permet de synthétiser les différentes résistances s'opposant au passage de l'eau et est encore utilisée aujourd'hui (Fig. 10) (Sperry *et al.*, 2016 ; Martin-StPaul *et al.*, 2017).

c) Mesure

La mesure du potentiel hydrique peut se faire de deux manières.

Le psychromètre, tout d'abord, qui permet une mesure rapide du potentiel hydrique Ψ d'un milieu (sol, tige, feuille), a été inventé il y a une cinquantaine d'années (Spanner, 1951 ;

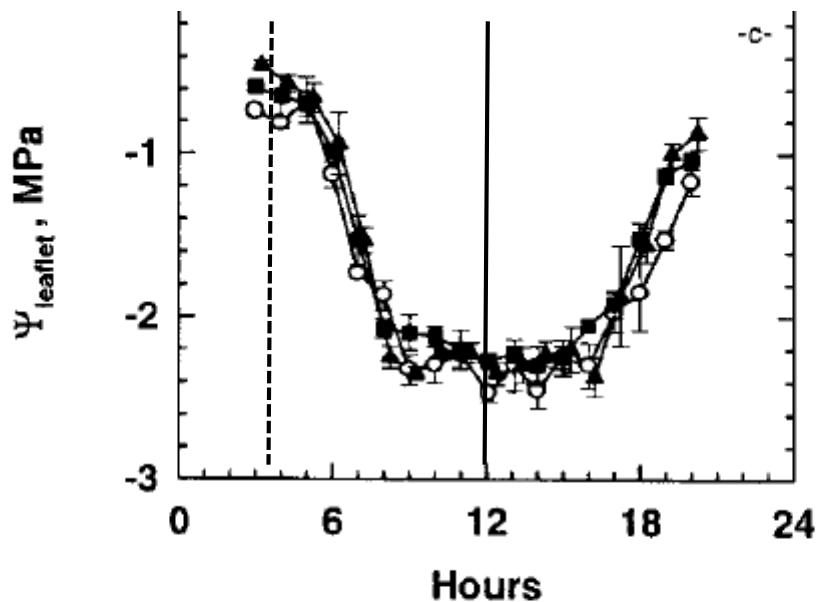


Figure 11 : Évolution du potentiel hydrique de frêne. Chaque courbe représente un individu. Ligne pleine, mesure du potentiel minimum ; Ligne en tirets, mesure du potentiel de base (d'après Cochard *et al.*, 1997).

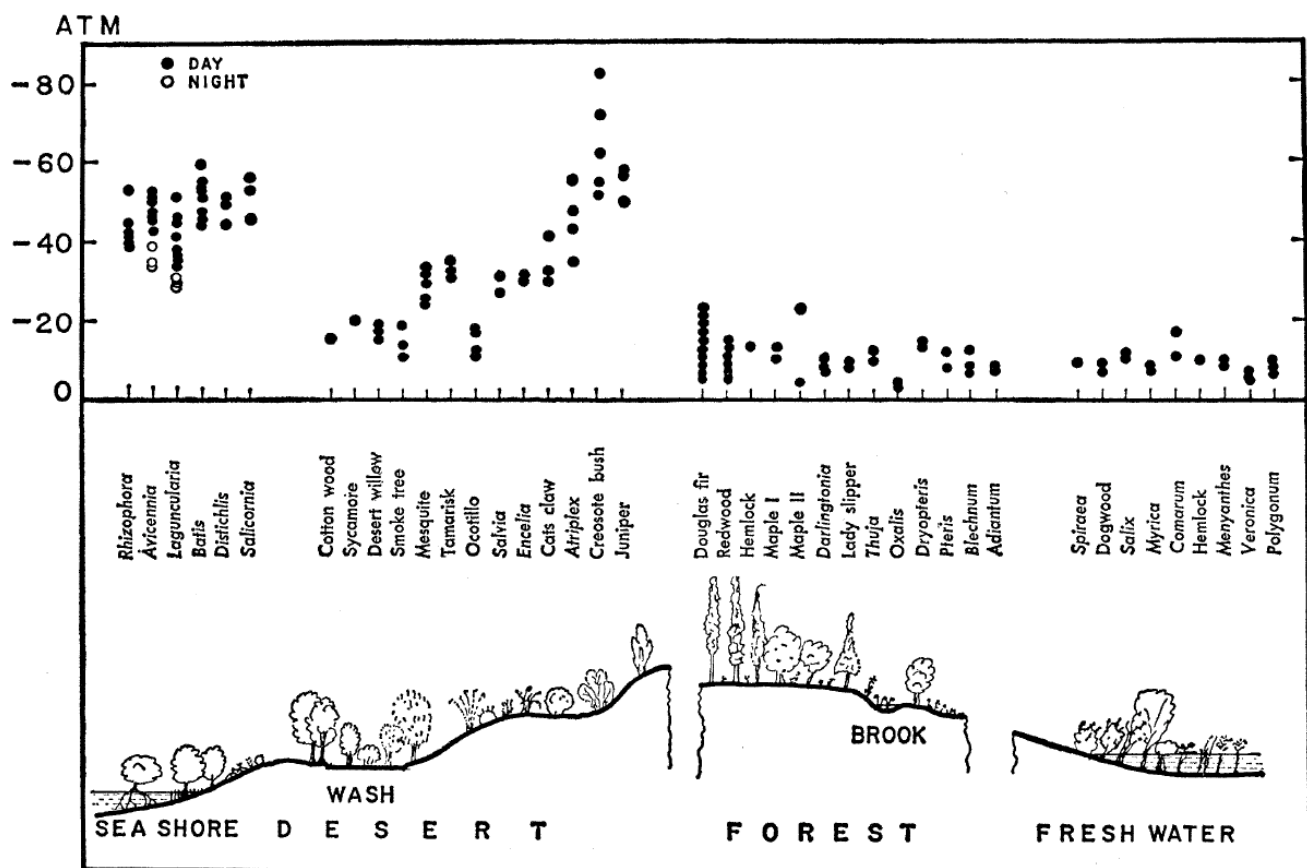


Figure 12 : Mesures de potentiels hydriques pour différentes espèces issues de différents biomes. Note : 10 atm = 1 MPa (Scholander *et al.*, 1965).

Richard & Ogata, 1958 ; Barrs, 1964 ; Rawlins, 1966). Le principe de la mesure repose sur la relation suivante :

$$\psi = \frac{R.T}{V} \times \ln\left(\frac{p}{p_0}\right)$$

avec R la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T température en Kelvin, V volume molaire de l'eau ($18.069 \times 10^{-6} \text{ m}^3.\text{mol}^{-1}$ à 20°C), p la pression de vapeur en Pa et p_0 la pression de vapeur saturante à la température T . L'appareil est composé d'un thermocouple dans une chambre fermée en contact avec le milieu à mesurer et d'une partie en contact avec le milieu extérieur, servant de référence. La chambre est refroidie par effet Peltier jusqu'à ce que de la condensation se forme. Puis la chambre remonte en température, provoquant l'évaporation de l'eau. La température que prendra la chambre durant ce processus sera fonction de l'humidité relative p/p_0 , permettant ainsi de calculer Ψ .

La chambre à pression, a été développée à la même période spécifiquement pour l'écophysiologie (Scholander *et al.*, 1965). Le principe consiste à placer un échantillon (tige, feuille) dans une petite chambre hyperbare, en laissant dépasser hors de la chambre une partie de l'échantillon avec du xylème apparent. La chambre est fermée de façon hermétique autour de l'échantillon à l'aide d'un joint. À l'aide d'air comprimé, la pression dans la chambre est augmentée progressivement et mesurée en continu. Lorsque la pression dans la chambre est égale au potentiel hydrique de l'échantillon, l'eau jaillit hors de l'échantillon par la partie du xylème exposée à l'air. Le potentiel hydrique est la pression appliquée pour laquelle on observe une sortie de l'eau de l'échantillon.

d) Variabilité du potentiel hydrique

Le potentiel hydrique varie selon un cycle quotidien (Fig. 11) : lorsque la demande évaporative augmente, le potentiel diminue dans les tissus de la plante, pour atteindre un point bas autour du midi solaire (appelé *potentiel minimum*, Ψ_{mid} ou Ψ_{min}) (Cowan, 1965 ; Klepper, 1968). À l'inverse, la nuit les contraintes hydriques sont moindres et le potentiel remonte dans les tissus de la plante (les forces de tension diminuent) jusqu'à atteindre un équilibre avec le potentiel hydrique du sol. Le potentiel à son point le plus haut, en équilibre avec le sol de nuit avant l'aube, est appelé *potentiel de base* (Ψ_{pd}).

Le potentiel hydrique de la plante doit être inférieur au potentiel hydrique du sol pour qu'elle puisse y récupérer l'eau (Fig. 12). Du fait de l'osmose inverse au niveau de leurs racines, les plantes extraient de l'eau des espaces interstitiels du sol en luttant non seulement contre le potentiel matriciel mais également contre la force de potentiel osmotique du sol. Ainsi, les

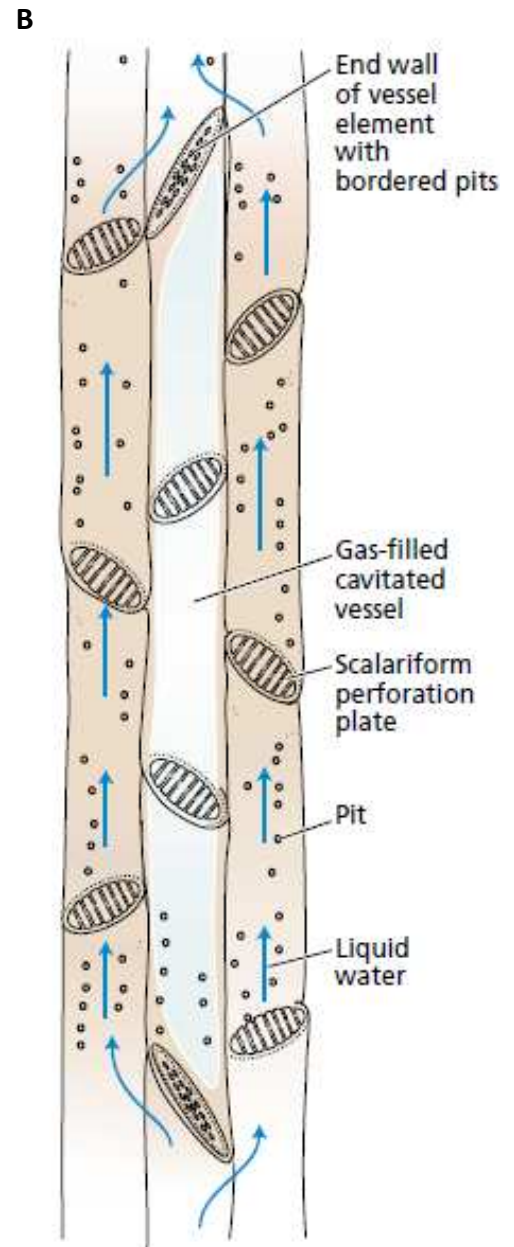
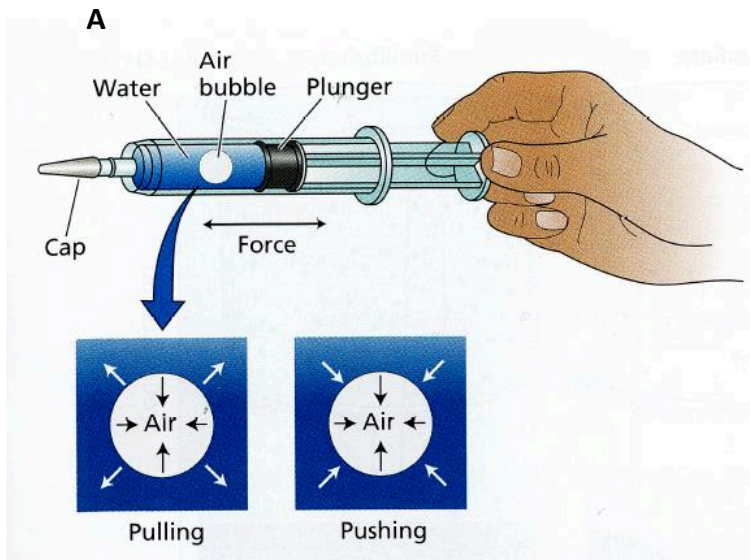


Figure 13 : **A** : Comportement d'une bulle d'air dans une seringue. Si l'on pousse, l'eau est placée sous pression et la bulle d'air diminue de volume. Si l'on tire, l'eau est en tension et la bulle augmente de volume. C'est dans ce dernier cas que se trouve le xylème. **B** : embolie d'un vaisseau. Une bulle d'air occupe un vaisseau qui ne participe plus au transport de l'eau. (Taiz & Zeiger, 2010).

plantes des mangroves puisent leur eau directement de l'eau de mer, qui a un potentiel osmotique de - 2 MPa. Cela implique que leur potentiel hydrique soit encore plus bas afin de compenser les forces de frottement et l'action de Ψ_g (Milburn, 1996). De même, le potentiel dépend de l'aridité du sol. Par exemple, dans les déserts, les plantes luttent contre des potentiels hydriques du sol qui peuvent être inférieurs à - 5 MPa (Sperry, 2011). Enfin, à cause des forces de frottement et de la gravité, plus on s'éloigne de la base d'un arbre plus les potentiels hydriques diminuent. C'est une des limites à la hauteur des grands arbres (Koch *et al.*, 2004 ; Domec *et al.*, 2008).

III. Dysfonctionnement hydraulique

En cas de sécheresse intense, les potentiels diminuent de façon plus importante que ce que nous avons vu jusqu'ici. La colonne d'eau est soumise à de telles forces de tension que son intégrité même est menacée, et avec elle tout le transport en eau de la plante. Dans ce paragraphe, nous proposons d'étudier en détail comment la cavitation se forme et comment elle affecte le xylème. Nous passerons également en revue les controverses qui existent actuellement au sein de la communauté sur le sujet.

1) Cavitation d'un liquide sous tension

Lorsqu'un liquide est sous tension, il est dans un état dit *métastable*. Si les forces de tension dans le liquide surpassent les forces de cohésion entre les molécules, une bulle de vapeur peut apparaître spontanément. Ce phénomène s'appelle la *cavitation*. Si une bulle d'air apparaît dans le système vasculaire des plantes, du fait des forces de tension la bulle d'air augmente de volume jusqu'à occuper tout le vaisseau concerné (Fig. 13). L'embolie qui en résulte empêche l'eau de passer ; le vaisseau n'est plus fonctionnel. Les modèles prédisent que l'eau à température ambiante cavite à des pressions comprises entre - 30 et - 180 MPa (Temperley, 1947 ; Fisher, 1948 ; Kwak & Panton, 1985), et des études expérimentales sur des inclusions de quartz montrent qu'effectivement l'eau peut atteindre des tensions extrêmes sans caviter, avec des tensions atteignant - 140 MPa (Green *et al.*, 1990 ; Zheng *et al.*, 1991). Du fait que les potentiels hydriques mesurés *in planta* sont dix fois plus faibles que ces valeurs, certains ont considéré que la cavitation n'était pas envisageable dans les tissus des plantes (Oertli, 1971). Pourtant, les vaisseaux des plantes sont bien sujets à cavitation, mais elle n'est pas le fait d'une

rupture spontanée en un endroit aléatoire de la colonne d'eau (nucléation homogène) mais la cavitation s'organise autour d'un point de nucléation, qui peut être une impureté, la perte d'adhésion des molécules d'eau à la paroi du vaisseau, une cavité remplie d'air, *etc.* (cavitation hétérogène) (Fisher, 1948 ; Tyree *et al.*, 1994). Cochard *et al.* (1992b) ont comparé la résistance à la cavitation d'échantillons de tiges suivant deux méthodes de mesure, l'une exposant le xylème des échantillons à des tensions, l'autre exposant le xylème à des pressions positives. C'est à dire dans le second cas, des conditions où l'eau est dans un état stable et de ce fait où il ne peut y avoir de nucléation. La résistance à la cavitation similaire observée dans les deux modalités montre que la nucléation homogène n'est pas nécessaire pour expliquer la cavitation chez les plantes.

De même, les valeurs de tensions extrêmes atteintes par Green *et al.* (1990) et Zheng *et al.* (1991)) sur quartz posent question (Davitt *et al.*, 2010). Les résultats en eux-mêmes ne sont pas remis en cause car l'expérience a été reproduite par d'autres équipes (Shmulovich *et al.*, 2009). Certains auteurs se demandent si ce ne serait pas la technique utilisée pour produire les inclusions de quartz qui – soit en produisant un matériau exceptionnellement dénué d'impureté soit au contraire en produisant des « impuretés stabilisatrices » (stabilisant les liaisons hydrogènes entre molécules d'eau) – permettrait d'atteindre des pressions aussi basses (Davitt *et al.*, 2010). Pour toutes les autres méthodes expérimentées à l'heure actuelle l'eau cavite entre -20 et -30 MPa pour les pressions les plus basses (Hiro *et al.*, 2003 ; Wheeler & Stroock, 2008 ; Davitt *et al.*, 2010). Cela pourrait s'expliquer par de la nucléation hétérogène autour d'impuretés présentes de la même manière dans chacune de ces expérimentations. Un bon candidat serait l'ion hydronium, présent de façon spontanée dans l'eau du fait de son autoprotolyse (Davitt *et al.*, 2010). Cette dernière valeur est à rapprocher des mesures de résistance à la cavitation récemment mesurées pour l'espèce la plus résistante, un conifère australien du genre *Callitris*, chez lequel le xylème perd la moitié seulement de sa conductance du fait de la cavitation à une pression de -18 MPa (Larter *et al.*, 2015).

La première détection expérimentale chez les végétaux d'évènements de cavitation a été faite par Milburn & Johnson (1966). Si la présence dans le xylème d'évènements de cavitation dus à des forces de tension a été débattue (Milburn & McLaughlin, 1974 ; Tyree & Dixon, 1983), ce n'est que relativement récemment que le mécanisme de cavitation dans les conditions de sécheresse a été définitivement mis en évidence (Sperry, 1986). Puis les auteurs ont identifié l'effet mortel de la cavitation par *dysfonctionnement hydraulique* lorsqu'une proportion significative du xylème est embolisé (Tyree *et al.*, 2002) et ce n'est que récemment que des valeurs chiffrées de niveau d'embolie constituant un seuil mortel a été mesuré : 50 % du xylème

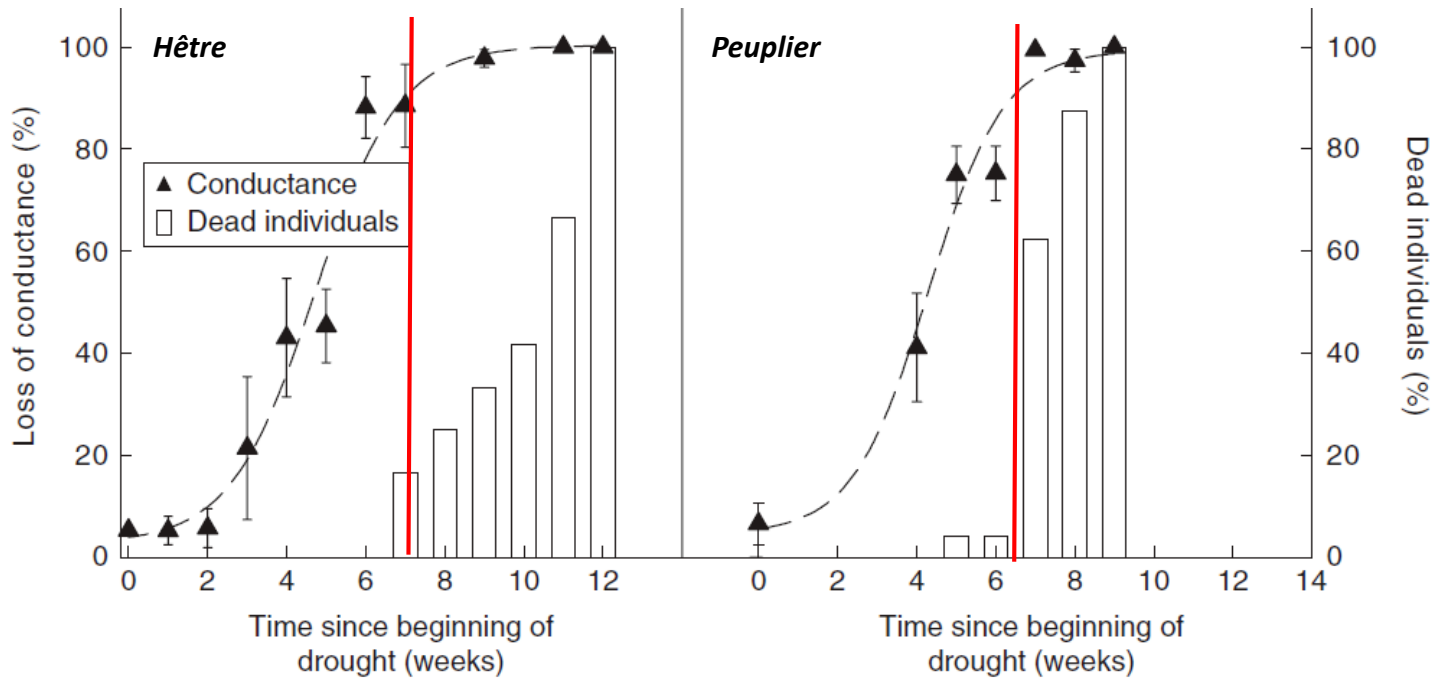


Figure 14 : Lien entre survie et embolie pour deux angiospermes. Courbe en tiret, perte de conductance de segments de tiges due à l'embolie ; barres, suivi de mortalité. Trait rouge horizontal, temps à partir duquel le transport de l'eau est réduit de 90 % du fait de l'embolie. Nous remarquons que cette limite correspond à l'augmentation de la mortalité (Barigah *et al.*, 2013).

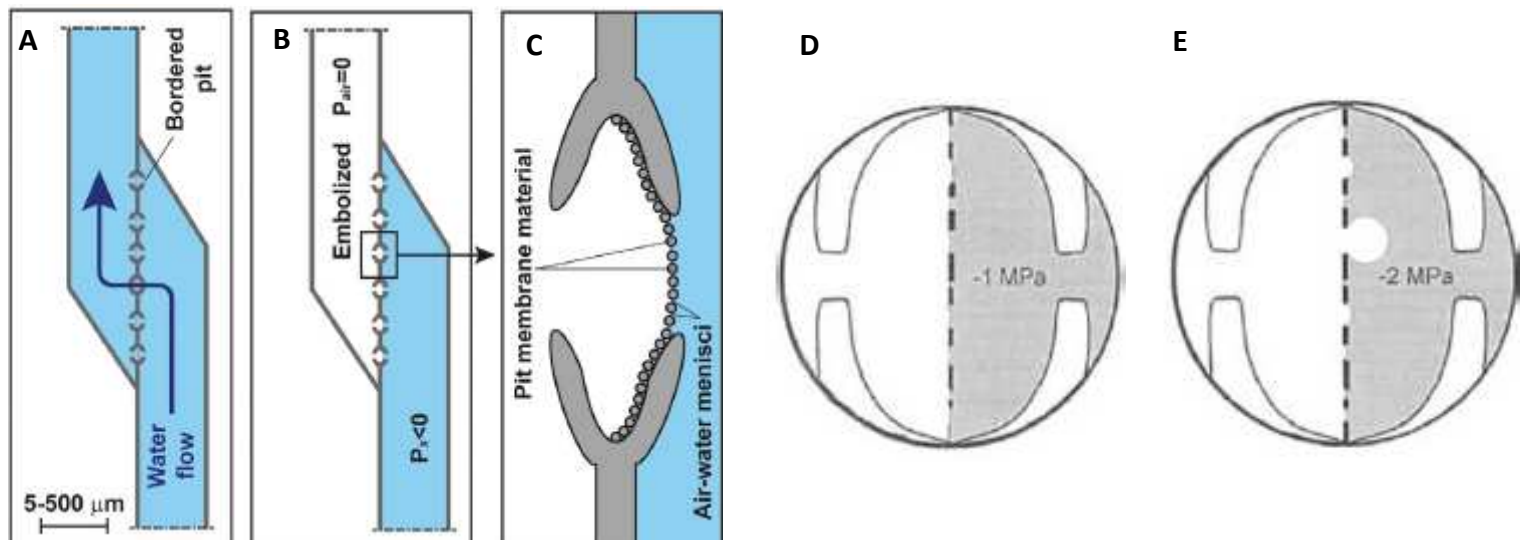


Figure 15 : Diffusion de l'embolie dans le xylème. **A** : Fonctionnement normal d'un xylème ; les ponctuations permettent le passage de l'eau. **B** : Un vaisseau est embolisé, les ponctuations ne permettent pas le passage de l'air. **C** : Des ménisques se forment entre les microfibrilles de cellulose à l'interface eau-air. **D** : Si la différence de pression n'est pas suffisante entre les deux compartiments, l'embolie est contenue dans un vaisseau. **E** : Si la différence de pression permet la rupture d'un des ménisques, des bulles d'air envahissent le vaisseau rempli d'eau (**A-C** : Venturas *et al.*, 2017 ; **D, E** : Tyree *et al.*, 1994).

embolisé pour les conifères (Brodribb & Cochard, 2009 ; Brodribb *et al.*, 2010), 88 % pour les angiospermes (Fig. 14) (Barigah *et al.*, 2013 ; Urli *et al.*, 2013).

2) Diffusion de l'embolie dans le xylème

a) Rupture de ménisques eau-air

Résister à la cavitation et à l'embolie qui en résulte consiste à prévenir ou limiter sa progression dans le xylème (Lens *et al.*, 2013). La théorie du germe d'air, ou *air seeding*, stipule que la cavitation se propage de vaisseau en vaisseau via les ponctuations (Crombie 1985 ; Sperry & Tyree ; 1988 ; Cochard *et al.*, 1992b). Ces connexions hydrauliques entre les vaisseaux permettent le passage de l'eau tout en empêchant celui de l'air (Fig. 15.A.B). Lorsque parmi deux vaisseaux adjacents, l'un d'eux est fonctionnel (rempli d'eau, sous tension) et l'autre embolisé (rempli d'air, à pression atmosphérique), la différence de pression entre les deux crée le risque qu'une bulle d'air traverse la paroi des ponctuations, ce qui constitue alors un site de nucléation de cavitation dans le vaisseau fonctionnel (Fig. 15.D.E). L'enchevêtrement de microfibrilles de cellulose constituant la paroi des ponctuations représente autant d'obstacles à la progression de l'air dans la paroi. Pour progresser la différence de pression doit être suffisante pour briser le ménisque à l'interface air-eau. La pression nécessaire à la rupture du ménisque P_m (en MPa) est d'autant plus importante que les pores entre les fibres seront petits, comme le montre l'équation de Young-Laplace :

$$P_m = \frac{4\tau\cos(a)}{D_{mp}}$$

avec a l'angle entre les microfibrilles et le ménisque, τ est la tension de surface de la solution (72.8 mN.m⁻¹ pour l'eau à 20 °C) et D_{mp} est le diamètre du pore où se situe le ménisque. Certains termes ont pu être expérimentalement liés à une variabilité de la résistance à la cavitation. Le rôle de la tension de surface dans la résistance à la cavitation a été montré en comparant chez *Pinus mugo* le P_{50} mesuré avec une solution présentant une tension de surface de 74 mN.m⁻¹ à celui lorsque la tension de surface était de 45 mN.m⁻¹ (Losso *et al.*, 2017). Changer de solution permet une variation du P_{50} de 1.77 MPa. Les équipes de recherche réalisant des mesures d'hydrauliques utilisent des solutions dont nous connaissons la concentration : dans le cas de notre laboratoire, 10 mM KCl + 1 mM CaCl₂ dans de l'eau ultrapure, présentant une tension de surface de 74.7 mN.m⁻¹ (Cochard *et al.*, 2009 ; Losso *et al.*, 2017). Le diamètre des pores de la ponctuation (D_{mp}) est une question qui a intéressé les

écophysiologistes dès que la théorie du germe d'air a été formulée (Sperry & Tyree, 1988). Aujourd'hui, ce paramètre a également été relié à la résistance à la cavitation lors de comparaisons entre espèces (Jansen *et al.*, 2009 ; Lens *et al.*, 2011). Ces travaux seront détaillés plus loin (voir partie V.3. *Les connexions entre éléments conducteurs : les ponctuations*).

b) Autres hypothèses

Des auteurs proposent des mécanismes supplémentaires. La présence de surfactant enrayerait la progression des bulles dans la paroi de la ponctuation (Schenk *et al.*, 2015 ; 2017). Des phospholipides et protéines hydrophobes présents dans la sève pourraient entourer les bulles d'air franchissant la paroi de la ponctuation, bloquant ainsi leur progression ou leur expansion voire jusqu'à permettre leur dissolution dans l'eau (Schenk *et al.*, 2017). Toutefois, cette hypothèse ne fait pas consensus, car elle ne semble pas compatible avec les observations de Cochard *et al.* (2009), qui ont montré que l'ajout de surfactant dans l'eau augmente la vulnérabilité à la cavitation du xylème.

Si la question de la rupture de la paroi de la ponctuation a été évoquée comme une explication possible pour la propagation de l'embolie (Crombie *et al.*, 1985), celle-ci a aujourd'hui été réfutée par plusieurs études. Il a été remarqué que lorsque l'on mesurait la résistance à la cavitation d'un échantillon qui avait déjà été embolisé une première fois, il apparaissait, lors de la seconde mesure, plus vulnérable que lors du premier test (phénomène appelé « *cavitation fatigue* ») (Hacke *et al.*, 2001b). Mais cette augmentation de la vulnérabilité est trop faible pour être compatible avec l'hypothèse de la rupture de la paroi de ponctuation (Torres-Ruiz *et al.*, 2016b). L'explication de la *fatigue* serait plutôt due à l'augmentation du diamètre de la taille des pores, conséquence soit du tassement de la paroi de la ponctuation lorsqu'elle est embolisée et de ce fait exposée à l'air (Li *et al.*, 2016), soit de dommages sur la membrane par la cavitation (Plavcová *et al.*, 2013). Une seconde observation infirmant la rupture de la paroi comme mécanisme de propagation de l'embolie est l'augmentation de la vulnérabilité observée suite à un changement de tension de surface de la sève, compatible avec l'hypothèse du germe d'air par la rupture de ménisque mais pas avec la rupture de la paroi de ponctuation Cochard *et al.* (2009). Enfin, la troisième observation allant dans le sens de l'absence de rupture de la paroi est l'absence d'augmentation de la conductance de l'échantillon à l'air après exposition à des pressions provoquant l'embolie des vaisseaux (Sperry & Tyree, 1990). Malgré ces travaux, l'hypothèse de la rupture de la paroi continue d'être citée comme

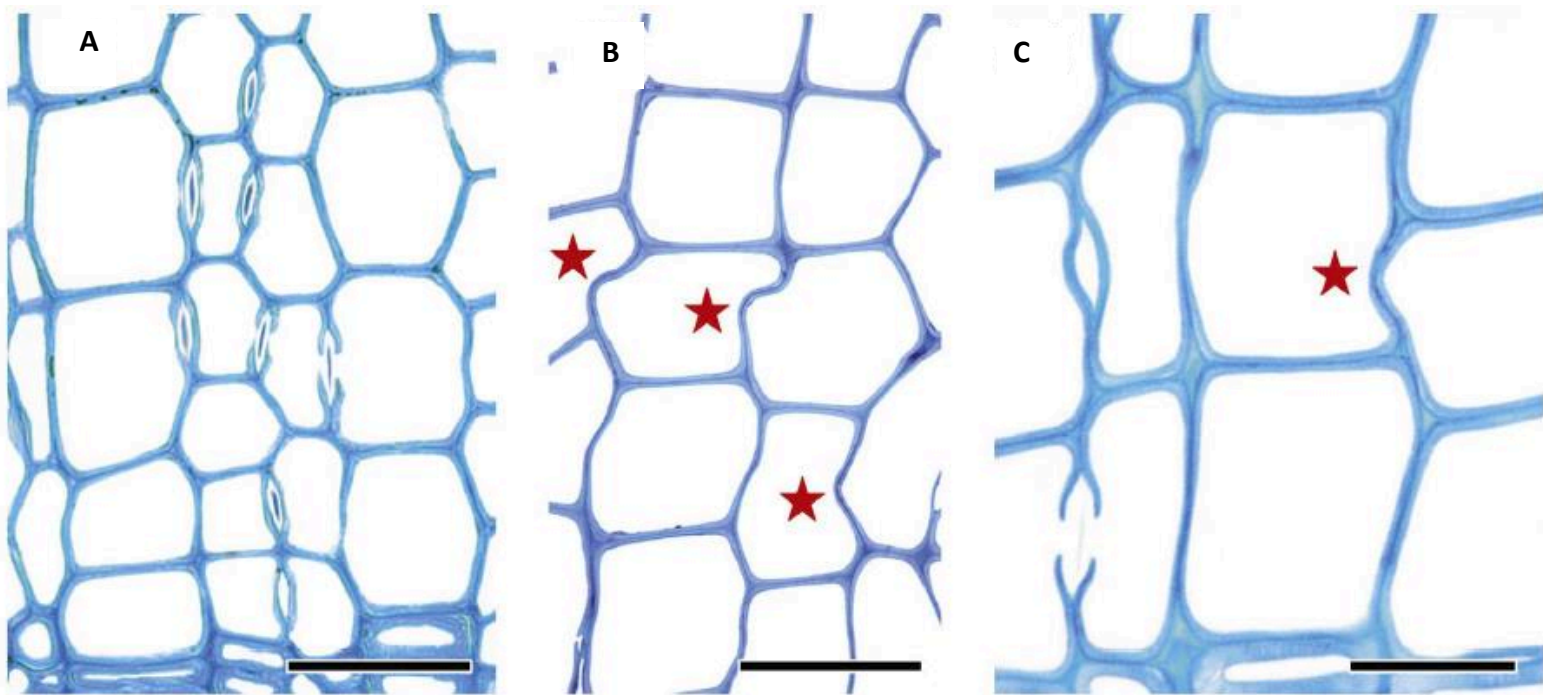


Figure 16 : Implosion de trachéides de mélèze. **A** : Xylème fonctionnel. **B et C** : Trachéides ayant implosé marquées par une étoile. L'échelle indique 50 μm pour A et B et 25 μm pour C (Rosner *et al.*, 2018).

une possible explication de la propagation de l'embolie dans les revues récentes (Venturas *et al.*, 2017).

3) Formation de l'embolie : le premier évènement de cavitation

Nous l'avons vu, l'embolie se propage dans le xylème entre vaisseaux adjacents. Reste à déterminer comment l'air s'est introduit dans le système : plusieurs facteurs peuvent expliquer d'où viennent les premiers évènements de cavitation.

L'embolie hivernale a été documentée depuis longtemps (Lybeck, 1959 ; Sucoff, 1969). L'eau du xylème gèle lorsque les températures sont négatives. L'air dissous dans l'eau n'est pas soluble dans la glace et de petites bulles d'air se forment. Au dégel, si les bulles sont de trop grand diamètre, elles ne pourront pas se dissoudre dans l'eau, le risque étant qu'elles augmentent de volume sous l'effet de la différence de pression jusqu'à rendre le vaisseau non fonctionnel. Les déterminants structuraux de l'embolie hivernale sont connus et c'est le diamètre des vaisseaux qui prédomine (Sperry & Sullivan, 1992). En effet durant l'hiver, dans un vaisseau de plus grand diamètre des bulles d'air plus grandes peuvent se former, qui, lorsqu'elles ont atteint d'un certain diamètre défini par une équation, ne pourront pas être résorbées au printemps (Yang & Tyree, 1992). Il est à noter que si la même relation a été trouvée par certains auteurs dans le cas de l'embolie estivale (voir partie V.1. *Les éléments conducteurs*), il n'y a pas de théorie liant directement le diamètre des vaisseaux à la résistance à la cavitation en situation de sécheresse.

L'effondrement (ou *collapse*) des vaisseaux du fait de tension trop importantes dans les colonnes d'eau a également été évoqué dans la littérature comme étant une cause probable d'origine de l'embolie dans le système (Fig. 16) (Hacke *et al.*, 2001a). Un effondrement des vaisseaux a été mis en évidence dans des aiguilles de pin mais sans provoquer d'embolie (Cochard *et al.*, 2004). Cela a également été observé dans le xylème de peupliers mutés déficients en lignine (Kitin *et al.*, 2010). Cependant, des auteurs considèrent que le xylème secondaire ne peut pas être sujet à l'implosion grâce à ses structures lignifiées donc très rigides (Domec *et al.*, 2009 ; Bouche *et al.*, 2014). Mais une étude récente a permis d'en observer *in situ* suite à une sécheresse extrême (Rosner *et al.*, 2018).

En dernier lieu, l'air peut également être introduit dans les vaisseaux par l'exposition du xylème à l'air suite à évènements d'origine biotique (herbivore) ou abiotique (casse de branche

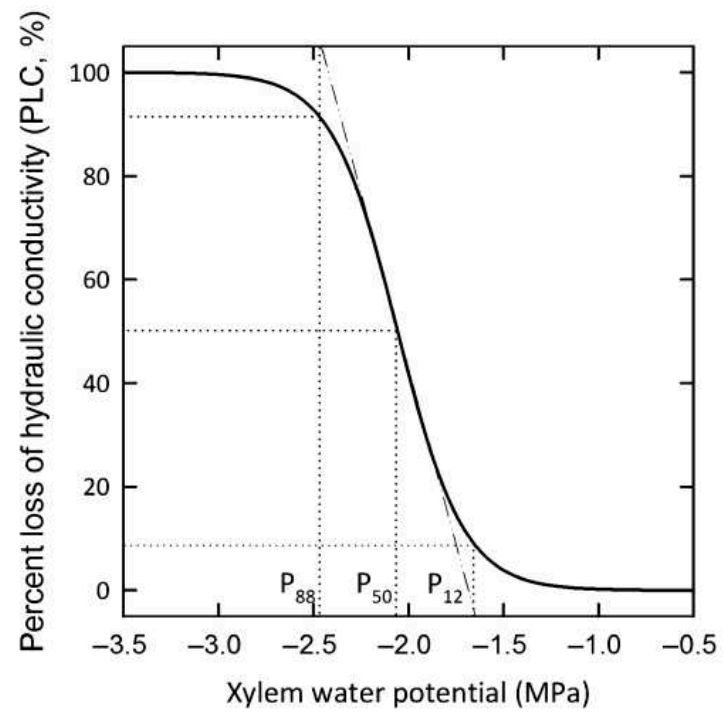


Figure 17 : Courbe de vulnérabilité à la cavitation et ses paramètres (Fichot *et al.*, 2015).

sous l'effet du vent), des blessures etc. Les différents événements pouvant être à l'origine de l'entrée d'air sont passés en revue par Venturas *et al.* (2017).

4) Mesure de la vulnérabilité à la cavitation

Le sujet de cette thèse étant d'expliquer la plasticité de la résistance à la cavitation, la mesure de ce paramètre est donc un point essentiel. Plusieurs méthodes coexistent, ayant chacune leurs avantages et inconvénients. Afin de garder un regard critique sur les méthodes retenues et leurs limites, nous proposons dans ce paragraphe un bref historique et une revue des méthodes disponibles. Cela nous paraît d'autant plus important que certaines des méthodes parmi les plus utilisées par la communauté sont soumises à des artefacts de mesure qui peuvent changer radicalement les résultats, donc la compréhension des mécanismes de formation et diffusion de la cavitation dans le xylème.

a) Méthodes historiques

Tout d'abord, mesurer la résistance à la cavitation demande de gérer deux paramètres : provoquer la cavitation dans un échantillon de branche et mesurer ou estimer les dégâts causés par l'embolie. Pour provoquer la cavitation, la méthode la plus simple consiste à laisser l'échantillon de branche se dessécher sur une pailleasse (*bench dehydration*) tout en mesurant régulièrement son potentiel hydrique. Concernant l'estimation des dégâts, il est possible d'enregistrer les signaux sonores émis par les événements de cavitation. C'est par cette méthode dite « acoustique » que la cavitation a été mise en évidence chez les plantes (Milburn & Johnson, 1966). Mais la méthode dite « *de Sperry* », la plus largement utilisée jusqu'à récemment permettait une mesure de la perte de conductance causée par l'embolie en estimant le taux d'embolie d'un échantillon (Sperry *et al.*, 1988).

Les points de mesure Perte de Conductance (*Percentage of Loss Conductance – PLC*) vs Pression peuvent ensuite être ajustés selon la fonction sigmoïdale de Weibull (Fig. 17) (Rawlings & Cure, 1985 ; Pammenter & Vander Willigen, 1998). Ce type de courbe est appelé « courbe de vulnérabilité » à la cavitation et constitue un outil répandu dans la communauté de l'hydraulique des plantes.

De cette courbe, deux paramètres principaux sont estimés : le P_{50} , pression requise pour induire 50 % de perte de conductance (en MPa) et S la pente de la courbe sigmoïdale au niveau du P_{50} (en $\%.MPa^{-1}$). Ces paramètres suffisent à tracer une courbe de vulnérabilité et sont ceux

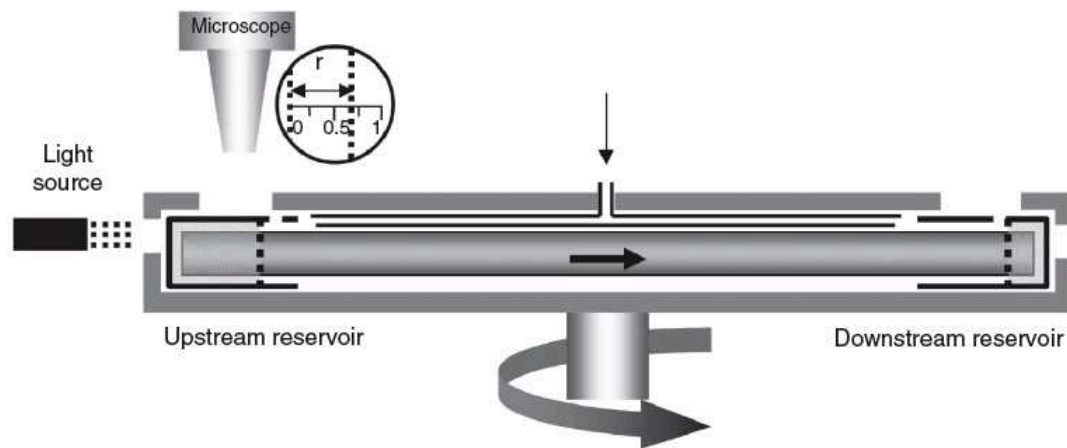


Figure 18 : Schéma du fonctionnement d'un cavitron, vu de profil. Un segment de tige (rectangle gris foncé, au centre) est placé dans le rotor modifié d'une centrifugeuse. Les extrémités de l'échantillon sont placées dans des réservoirs, des cuves de spectrophotométrie, dont l'un d'entre eux (*downstream*) possède un trou servant de trop-plein. Lorsque le rotor tourne, l'eau vient se plaquer sur les parois extérieures des réservoirs du fait de la force centrifuge. Le trop plein permet à l'un des réservoirs d'évacuer une partie de son eau. Les deux réservoirs n'ont pas la même hauteur d'eau et un gradient de pression se met en place, ce qui entraîne un flux d'eau à travers la branche. Une source de lumière permet de repérer les positions des ménisques. La vitesse du déplacement du ménisque mobile (*upstream*) par rapport au ménisque fixe (*downstream*) permet de calculer la conductance. Dans sa version actuelle, le microscope est remplacé par une caméra et la détection de la position du ménisque se fait de manière automatique (Cochard *et al.*, 2005).

qui sont utilisés par toute la communauté. Le P_{50} s'est rapidement imposé comme étant le trait le plus utilisé pour comparer les échantillons entre eux (Tyree & Ewers, 1991 ; Cochard *et al.*, 2008). Deux paramètres supplémentaires peuvent ensuite être calculés : le P_{12} et P_{88} , selon les relations suivantes (Domec & Gartner, 2001), qui sont les pressions nécessaires pour induire 12 et 88 % de PLC . D'un point de vue fonctionnel, le P_{12} a été relié au point à partir duquel on a une entrée d'air dans le système (Brodribb *et al.*, 2003 ; Meinzer *et al.*, 2009) ; le P_{50} correspond au seuil de non-retour pour les gymnospermes (Brodribb & Cochard, 2009) : à partir de ces niveaux d'embolie, même si l'on réhydrate les individus en sécheresse, de la mortalité sera observée. Enfin, le P_{88} est considéré comme le seuil de non-retour pour les angiospermes (Barigah *et al.*, 2013 ; Urli *et al.*, 2013). Toutefois, des recherches récentes tendraient à remettre en cause ce seuil, Hammond *et al.* (2019) ont montré une reprise au-delà du seuil de 90 % de PLC pour des gymnospermes. La question du lien de causalité entre PLC et mortalité fait actuellement l'objet de recherches au sein de l'équipe.

Les méthodes évoquées jusqu'à présent demandent du temps pour caractériser les espèces les plus résistantes à la cavitation (jusqu'à plusieurs jours). L'arrivée de la méthode d'injection d'air permet d'accélérer le processus (Cochard *et al.*, 1992b). Avec cette méthode, il n'est plus nécessaire d'attendre que l'échantillon se déshydrate jusqu'à la valeur de potentiel souhaitée pour faire une mesure de PLC mais de l'air peut directement être injecté dans les vaisseaux à la pression souhaitée. En effet, c'est la différence de pression entre les compartiments remplis d'air et ceux remplis d'eau qui est importante pour mesurer la résistance à la cavitation. Ainsi, l'action de l'air sous pression sur des vaisseaux remplis d'eau à pression atmosphérique est le même que le cas naturel, où des vaisseaux embolisés sont remplis d'air à pression atmosphérique et l'eau dans ces vaisseaux subit des forces de tension.

Toutefois, les méthodes présentées jusqu'à maintenant nécessitent une grande quantité de matériel végétal disponible puisqu'à l'exception de la méthode acoustique, chaque point de mesure de PLC demande de sacrifier un échantillon. Face à la nécessité de gagner en temps et d'économiser du matériel végétal, de nouvelles méthodes vont être développées.

b) Le Cavitron, méthode par centrifugation

La méthode consistant à utiliser une centrifugeuse pour provoquer des forces de tension jusqu'à la cavitation d'un liquide est ancienne (Briggs, 1955). Des écophysiologistes ont adapté cette méthode pour permettre d'appliquer des forces de tension dans un échantillon de tige tout

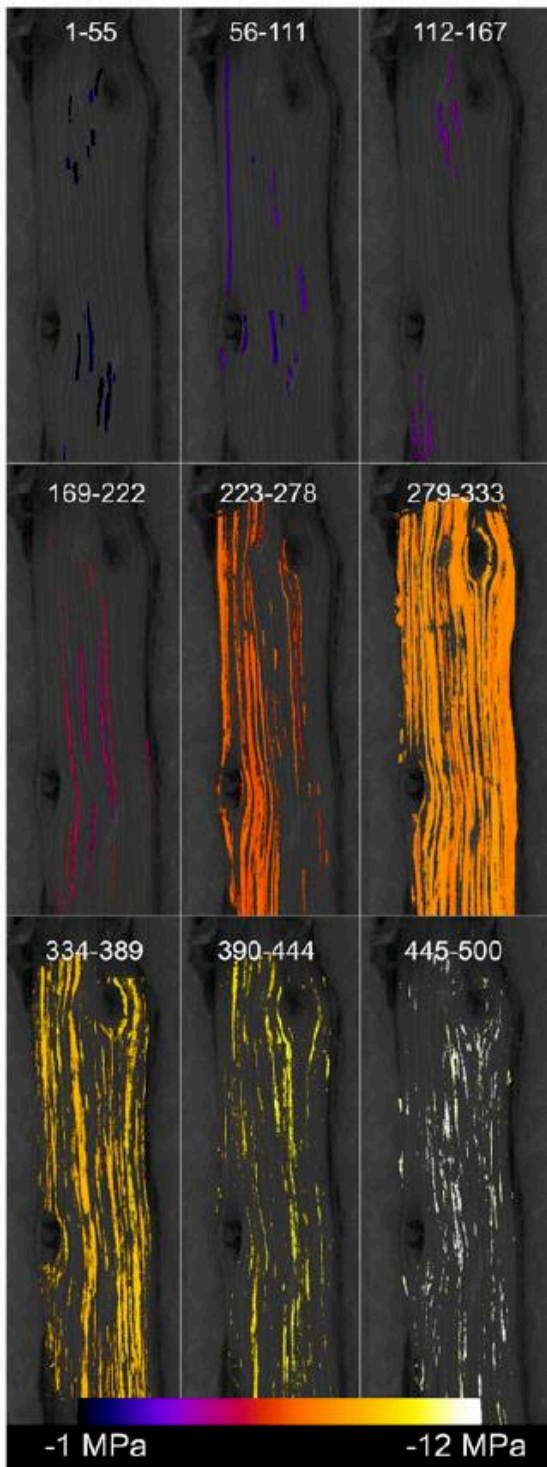


Figure 19 : Évènement de cavitation observé chez *Rosmarinus officinalis* par méthode optique. Les nombres indiquent les images (intervalle entre chaque image : environ 10 min) ; le potentiel auquel ont cavité les vaisseaux est indiqué par l'échelle colorée (Brodrigg *et al.*, 2017).

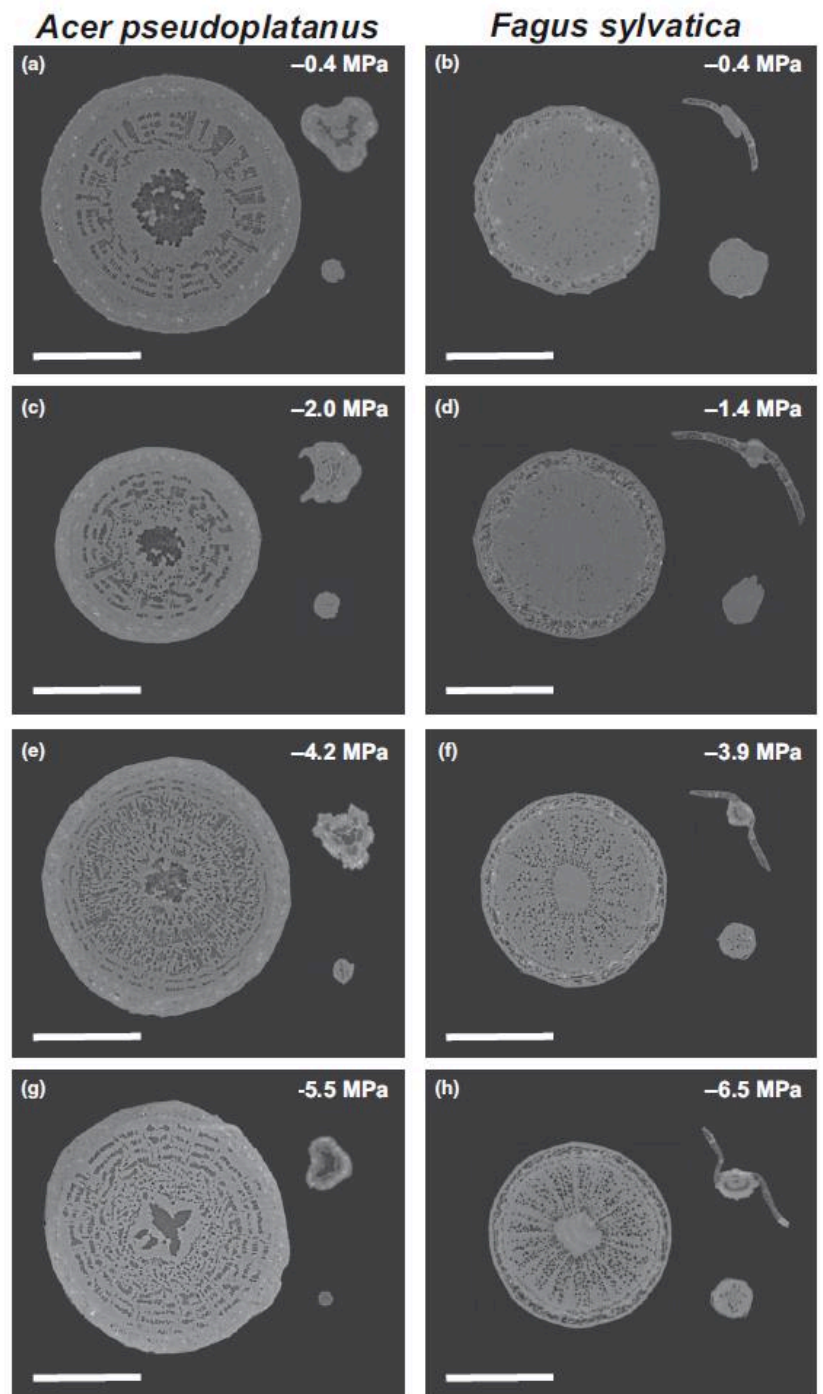


Figure 20 : Évènement de cavitation observé chez deux angiospermes par microtomographie à rayons X. Sur chacune des images, on peut apercevoir : un échantillon de tige (à gauche sur chaque image), un pétiole (en haut à droite) et une racine fine (en bas à droite). Les points noirs représentent les vaisseaux embolisés. L'échelle représente 1,25 mm (Losso *et al.*, 2019).

en contrôlant finement la tension appliquée (Holbrook *et al.*, 1995 ; Pockman *et al.*, 1995 ; Steudle 1995). La technique s'est rapidement diffusée et a été améliorée (Alder *et al.*, 1997 ; Cochard *et al.*, 2000). Aujourd'hui, la méthode de centrifugation, appelée méthode du « cavitron », permet à la fois d'induire la pression par centrifugation et de mesurer la conductance en observant le débit d'eau passant à travers l'échantillon en temps réel (Fig. 18) (Cochard, 2002 ; Cochard *et al.*, 2005). Cette technique, qui permet de réaliser une courbe de vulnérabilité à la cavitation en quelques minutes et avec un seul échantillon, a permis d'augmenter considérablement le débit de phénotypage pour ce trait. La plupart des valeurs présentées dans cette revue bibliographique ont été obtenues à l'aide d'un cavitron (Cochard *et al.*, 2013). C'est notamment grâce à l'apport de cette méthode qu'ont pu être menées des études incluant un grand nombre d'échantillons, nécessaire pour une étude à large échelle (Delzon *et al.*, 2010 ; Choat *et al.*, 2012), pour estimer la variabilité génétique sur ce trait (Wortemann *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2011 ; Chauvin *et al.*, 2019). Aujourd'hui, la résistance à la cavitation est considérée comme un trait majeur dans la compréhension de la distribution des espèces (Brodribb, 2017 ; Larter *et al.*, 2017).

c) Nouvelles méthodes

Ce n'est que récemment que de nouvelles avancées ont été faites dans la mesure de la résistance à la cavitation, avec l'apparition de trois nouvelles méthodes dans la dernière décennie. La dernière-née, la méthode pneumatique, mise au point par une équipe brésilienne est facile à mettre en œuvre à moindre coût (Pereira *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). Elle propose d'estimer la *PLC* en mesurant le volume d'air contenu dans les vaisseaux embolisés. La méthode optique, en observant des changements de transmission de la lumière traversant le xylème est modifiée par l'embolie (Ponomarenko *et al.*, 2014 ; Brodribb *et al.*, 2016). Elle permet de phénotyper d'autres organes que les branches, notamment les feuilles ou les racines fines (Fig. 19) (Brodribb *et al.*, 2016 ; Brodribb *et al.*, 2017). Enfin, la microtomographie permet une visualisation directe grâce à des rayons X du statut hydrique des vaisseaux sur un individu intact (Fig. 20) (Brodersen *et al.*, 2010 ; Cochard *et al.*, 2015). Les études comparant ces nouvelles méthodes se multiplient ces dernières années (Lamarque *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018 ; Venturas *et al.*, 2019), tout comme celles croisant ces approches pour tirer avantage des points forts de chaque méthode (Jacobsen *et al.*, 2019). Cependant, pour ces trois nouvelles méthodes, la cavitation est induite dans l'échantillon soit par centrifugation d'un segment de tige (ce qui expose ces nouvelles méthodes au même biais que le cavitron ; voir la sous-section

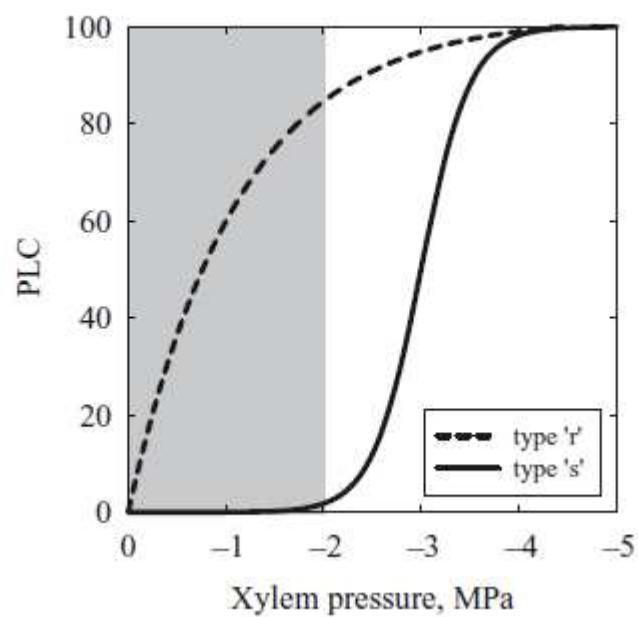


Figure 21 : Courbe de vulnérabilité à la cavitation de forme exponentielle, tracée en pointillés. Les espèces présentant ce type de courbe seraient tellement vulnérables que la cavitation serait un phénomène quotidien, d'où la nécessité de réparer l'embolie (Cochard *et al.*, 2010).

suivante *Controverses liées aux méthodes les plus utilisées*), soit en laissant une branche se déshydrater sur une paille (ce qui peut être long si l'espèce est résistante à la sécheresse). Ainsi, malgré le développement de ces nouvelles méthodes, le cavitron reste l'outil de phénotypage haut débit.

Mais le choix de la méthode de mesure par soucis technique ou scientifique n'est pas un choix neutre et il est important de connaître les limites de ces méthodes.

d) Controverses liées aux méthodes les plus utilisées

Dans le cas du cavitron, la controverse est d'autant plus sensible que les limites de la méthode changent les hypothèses concernant le comportement des vaisseaux sous tension. Certains échantillons montrent une vulnérabilité extrême à la cavitation lorsque caractérisés par méthode du cavitron : ils atteignent les seuils létaux de 88 % d'embolie à des valeurs de potentiels hydriques élevés (Fig. 21 ; à comparer avec les mesures de potentiel tels que mesurés sur le terrain Fig. 12). Certains auteurs estiment que la longueur des vaisseaux de l'échantillon est à l'origine d'un artefact dans la mesure (appelé *artefact lié aux vaisseaux ouverts*) (Cochard *et al.*, 2010 ; Martin-StPaul *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014) tandis que d'autres estiment que les mesures sont valides quelle que soit la longueur des vaisseaux de l'échantillon (Cai *et al.*, 2010 ; Jacobsen & Pratt, 2012 ; Sperry *et al.*, 2012 ; Hacke *et al.*, 2015). La prise en compte ou non de cet artefact peut modifier des résultats et leurs interprétations (Torres-Ruiz *et al.*, 2016a). Afin de clore le débat, la nouvelle méthode de visualisation directe par tomographie à rayons X est mise à contribution par les chercheurs travaillant avec la méthode du cavitron (Choat *et al.*, 2015 ; Charrier *et al.*, 2016 ; Torres-Ruiz *et al.*, 2017 ; Choat *et al.*, 2019 ; López *et al.*, 2019). Considérer que ce type de courbe est le signe d'une vulnérabilité extrême ou un artefact de mesure a des conséquences sur la présence ou pas chez les plantes de mécanismes de réparation de l'embolie (voir la section suivante *Irréversibilité de l'embolie ?*).

Concernant la tomographie, si la méthode a été largement adoptée par la communauté, des biais possibles sont soulignés par certains auteurs quant aux dommages causés par les rayons X lors des scans. Cette technique semble plus destructive que ce que l'on pourrait penser au premier abord puisque l'exposition aux rayons X affectent les cellules vivantes (Petrizzelli *et al.*, 2018). De plus, en visualisant l'ensemble des éléments remplis d'eau, on pourrait comptabiliser à tort des éléments non-embolisés mais isolés (donc non conducteurs) et ainsi surestimer la résistance à la cavitation d'un échantillon (Mrad *et al.* 2018 ; Jacobsen & Pratt, 2018 ; Pratt & Jacobsen, 2018).

5) Irréversibilité de l'embolie ?

Une des questions concernant la résistance à l'embolie est de savoir si celle-ci est réversible ou non. La réparation de l'embolie hivernale existe et ne fait aucun débat, elle se produit au printemps par poussée racinaire (Ewers *et al.*, 2001).

Très tôt, les auteurs se sont posés la question de la possibilité pour les plantes de réparer les dégâts dus à l'embolie en situation de sécheresse. Des essais de mesure par méthode acoustique ou par observation en cryo-microscopie laissent à penser à ces auteurs qu'il y a cavitation de manière quotidienne, ce qui nécessite l'existence d'un mécanisme quotidien de remplissage des vaisseaux embolisés (*refilling*) (Borghetti *et al.*, 1991 ; Salleo *et al.*, 1996 ; Canny, 1997). Une preuve supplémentaire en faveur du *refilling* viendra avec le développement de la méthode de centrifugation et les courbes exponentielle (Cochard *et al.*, 2013). Ces courbes montrent que certaines espèces à vaisseaux longs apparaissent extrêmement vulnérables à tel point que les potentiels minimums hauts suffiraient à les faire caviter, faisant de la cavitation un phénomène quotidien. Dès lors, il est nécessaire que les plantes soient capables de réparer l'embolie également de manière quotidienne. Les mécanismes restent à identifier. Ils pourraient être analogue au cas de la cavitation hivernale. La poussée racinaire répare l'embolie hivernale, la pression dans le xylème est positive. Un xylème en fonctionnement est soumis à des pressions négatives, ce qui fait douter certains auteurs de l'existence d'un tel mécanisme de réparation sous tension (Yang & Tyree, 1992 ; Tyree & Yang, 1992 ; Holbrook & Zwieniecki 1999). La réparation serait possible grâce à des transports de solutés : des sucres et ions seraient déchargés depuis les cellules du parenchyme dans les vaisseaux embolisés, diminuant leur potentiel osmotique. Ces sucres pourraient provenir du phloème, par transport latéral. Le gradient de potentiels ainsi formé entre vaisseau fonctionnel plein d'eau et vaisseau non fonctionnel à très faible potentiel osmotique provoque l'entrée d'eau dans ce dernier jusqu'à sa réparation (pour une synthèse sur le sujet, voir les revues de Nardini *et al.*, 2011 ou Klein *et al.*, 2018).

Mais à l'inverse, d'autres auteurs, dont nous faisons partie, estiment que cette vulnérabilité extrême observée au cavitron n'est qu'un artefact de mesure dû à la méthode (Cochard *et al.*, 2013 ; voir également les débats sur l'artefact lié aux vaisseaux ouverts dans la sous-section précédente, *Controverses liées aux méthodes les plus utilisées*). Ainsi, en excluant les courbes exponentielles, les potentiels hydriques minimums mesurés en conditions normales sont supérieurs au P_{50} et cela montre que la cavitation n'est qu'un phénomène rare ne se

produisant qu'en cas de sécheresse extrême (Cochard & Delzon, 2013 ; Delzon & Cochard, 2014). De ce point de vue, l'embolie n'est pas un phénomène quotidien et l'existence de mécanismes de réparation de l'embolie n'est pas nécessaire pour expliquer la survie des plantes. En l'absence d'observation formelle du phénomène, il est plus parcimonieux de considérer que ces mécanismes n'existent pas.

Comme pour la controverse liée à l'artefact de vaisseau ouvert, les auteurs se sont saisis des nouvelles méthodes d'imagerie par visualisation directe pour confirmer l'existence du refilling (Knipfer *et al.*, 2016 ; Brodersen *et al.*, 2018) ou infirmer cette hypothèse (Charrier *et al.*, 2016 ; Lamarque *et al.*, 2018 ; Choat *et al.*, 2019). Considérant que la réparation de l'embolie n'est pas possible sous tension, dans le cas de cette étude nous ne discuterons pas la résistance à la sécheresse à la lueur de ce mécanisme.

6) La segmentation hydraulique, cloisonner l'embolie

En cas de sécheresse extrême, il est possible pour certaines espèces de sacrifier certains tissus de façon à protéger ceux qui sont les plus importants pour la survie ou les plus coûteux en carbone. Le cas habituel est un sacrifice des feuilles afin de protéger la tige. Du fait d'un gradient de potentiels hydriques avec la hauteur de l'individu, les organes distaux (feuilles, branches) sont exposés à des potentiels plus bas, ce qui en fait des organes difficiles à protéger. Mais, la phénologie en fait des organes peu coûteux, faciles à produire et donc sacrificiables (Tyree *et al.*, 1993 ; Hochberg *et al.*, 2017).

La segmentation hydraulique, discutée par Tyree & Ewers (1991), est une séparation physique des systèmes hydrauliques au sein de certains organes d'un individu, afin d'y contenir l'embolie. Par exemple il a été décrit que les points d'abscision des feuilles et des fruits contiennent de nombreuses terminaisons de vaisseaux, afin de permettre à l'individu de se séparer de ces organes sans exposer ses vaisseaux (André *et al.*, 1999). De la même manière, les bourgeons ont été décrits comme ayant un système hydraulique isolé, afin de les préserver lors de sécheresses intenses des forces de tension et donc de l'embolie qui affecte le reste du xylème (Barigah *et al.*, 2013). Ceci permet à l'individu de reprendre sa croissance une fois l'épisode de sécheresse terminé, même si son xylème a été exposé à des niveaux importants d'embolie.

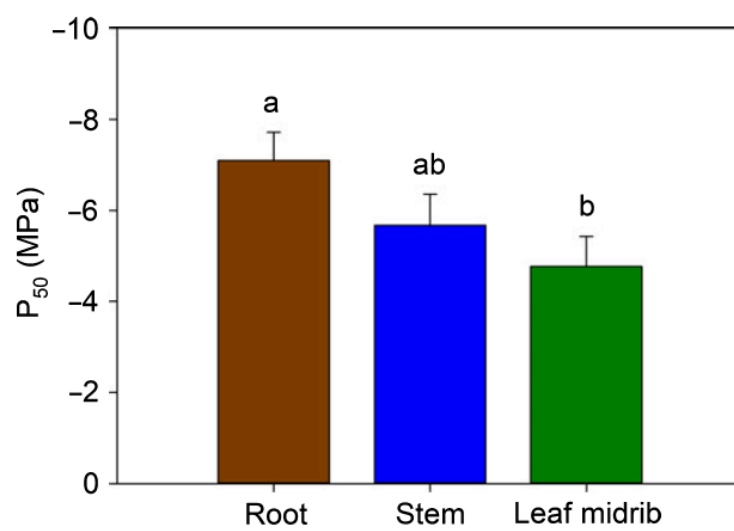


Figure 22 : Variabilité de la résistance à la cavitation intra-individuelle pour 3 organes (Rodriguez-Dominguez *et al.*, 2018).

Outre cette segmentation hydraulique, les auteurs ont décrit une segmentation de la résistance à la cavitation, c'est-à-dire une vulnérabilité différente selon les organes (Fig. 22). L'abscision des feuilles a été mise en relation avec la segmentation de la vulnérabilité à la cavitation entre le pétiole et la tige (Tyree *et al.*, 1993). La perte de ces tissus sacrificiels permet de protéger des tissus plus importants, comme la tige (Wolfe *et al.*, 2016 ; Hochberg *et al.*, 2017). Tyree *et al.* (1993) montrent que les pétioles des feuilles agissent comme des fusibles et voient leur xylème embolisé à un potentiel hydrique pour lequel le xylème de la tige ne subit que des niveaux marginaux d'embolie. En limitant les pertes en eau par diminution de la surface foliaire, la chute des feuilles ralentit la diminution du potentiel hydrique dans la tige, la protégeant ainsi de tensions qui provoqueraient l'embolie de son xylème. Ainsi il a été montré que chez l'hévéa, les pétioles sont plus vulnérables que les branches (Jinagool *et al.*, 2015). Grâce aux nouvelles méthodes de construction de courbe de vulnérabilité par méthode optique et par imagerie à rayons X qui permettent d'étudier une plus grande variété d'organes, la question de la segmentation hydraulique fait l'objet d'études récentes. Ainsi, la racine d'olivier a été montrée comme étant plus résistante que la tige, elle-même plus résistante que la nervure principale de la feuille, avec une différence de 2,3 MPa entre racines et feuilles (Fig. 22) (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2018). Une différence de résistance à la cavitation a été montrée entre feuilles et tiges chez le laurier et le bouleau mais pas chez le tulipier (Klepsch *et al.*, 2018). Par tomographie à rayons X, Hochberg *et al.* (2016) observent une plus grande vulnérabilité du pétiole par rapport à la tige chez la vigne. Avec cette même méthode, Losso *et al.* (2019) montrent sur une même prise de vue la vulnérabilité à la cavitation du pétiole et de la racine par rapport à la tige chez l'érable sycomore et son absence chez le hêtre. Également, les racines sont plus résistantes à la cavitation que la tige chez *Juniperus ashei* et chez *Bumelia lanuginosa*, mais pas chez *Quercus fusiformis* (McElorne *et al.*, 2004). À l'inverse de ces résultats, des auteurs ayant conduit une étude sur quatre espèces de pinacées estiment que les différences de résistance à la cavitation observées sont trop faibles pour soutenir l'hypothèse de segmentation de la résistance à la cavitation (Bouche *et al.*, 2016).

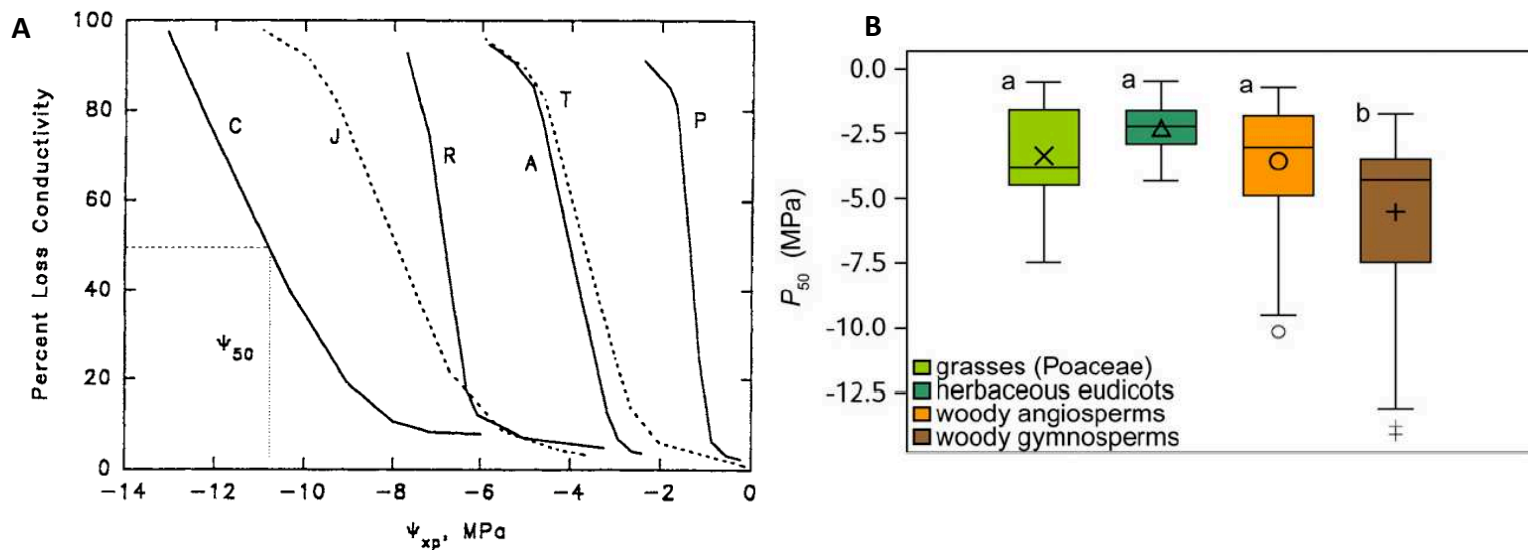


Figure 23 : Variabilité inter-spécifique de la vulnérabilité à la cavitation. **A** : Courbes de vulnérabilité pour plusieurs espèces. C, *Ceanothus megacarpus* ; J, *Juniperus virginiana* ; R, *Rhizophora mangle* ; A, *Acer saccharum* ; T, *Tuja occidentalis* ; P, *Populus deltoides* (Tyree et al., 1994). **B** : Comparaison des P_{50} par groupes. Poacées (n = 16 espèces), herbacées eudicotylédones (n = 20), ligneux angiospermes (n = 301) et ligneux gymnospermes (n = 103) (Lens et al., 2016).

IV. Vulnérabilité à la cavitation des arbres

Maintenant que le fonctionnement hydraulique des plantes et les mécanismes à l'origine de la cavitation ont été précisés, nous pouvons étudier quelles sont les gammes de résistance à la cavitation observées chez les plantes, qu'il s'agisse de variabilité inter- ou intra-spécifique.

1) Variabilité inter-spécifique

En constatant que les végétaux présentaient des potentiels hydriques très variés, et que ces variations dépendaient des biomes et des espèces considérées (Scholander *et al.*, 1965), les auteurs ont cherché à comparer la variabilité de la résistance à la cavitation entre espèces. Par exemple en comparant des espèces de chênes ou de conifères, avec des P_{50} compris entre - 2,4 et - 3,3 MPa pour les espèces de chênes (Cochard, 1992 ; Cochard *et al.*, 1992a). En comparant plusieurs espèces entre elles, Tyree *et al.*, 1994 observent des P_{50} comprises entre - 0,7 et - 11 MPa (Fig. 23.A). Du fait de sa variabilité entre espèces, le P_{50} s'est imposé comme le trait le plus utilisé dans les études de la résistance à la sécheresse et pour comparer les espèces entre elles (Cochard *et al.*, 2008 ; Brodribb, 2017). Dans une méta-analyse regroupant 167 espèces issues de différents biomes, Maherali *et al.* (2004) concluent à la grande variabilité du trait, observant des P_{50} situés entre - 0,18 et - 14,1 MPa. Notons que d'une part le résultat de - 0,18 MPa peut être questionné au regard de l'artefact dû aux vaisseaux ouverts que nous avons mentionné dans le paragraphe précédent (Cochard *et al.*, 2010 ; voir également partie III.4 *Mesure de la vulnérabilité à la cavitation*) et d'autre part le P_{50} le plus bas a aujourd'hui été dépassé puisque qu'un P_{50} de - 18,8 MPa a été mesuré sur une espèce australienne. Cette valeur constitue encore à l'heure actuelle le record de tolérance à la cavitation (Larter *et al.*, 2015).

En regroupant les espèces par biomes, il est possible de constater des différences de moyennes de P_{50} qui peuvent être liées à l'aridité (Maherali *et al.* 2004 ; Choat *et al.*, 2012), avec les espèces de milieux méditerranéens à - 5 MPa, de forêts tempérées autour de - 3 MPa et de forêts tropicales à - 1 MPa. Les auteurs ont constaté une corrélation entre P_{50} et précipitations (Maherali *et al.*, 2004), avec les indices d'humidité de biotope de Rameau (Brendel & Cochard, 2011) ou avec l'indice d'aridité (F) d'Ellenberg (Lens *et al.*, 2016). De manière générale, les espèces sont considérées comme vulnérables à la sécheresse avec des P_{50} supérieurs à - 3 MPa et les espèces xérophi les ont des P_{50} inférieurs à - 4,5 MPa.

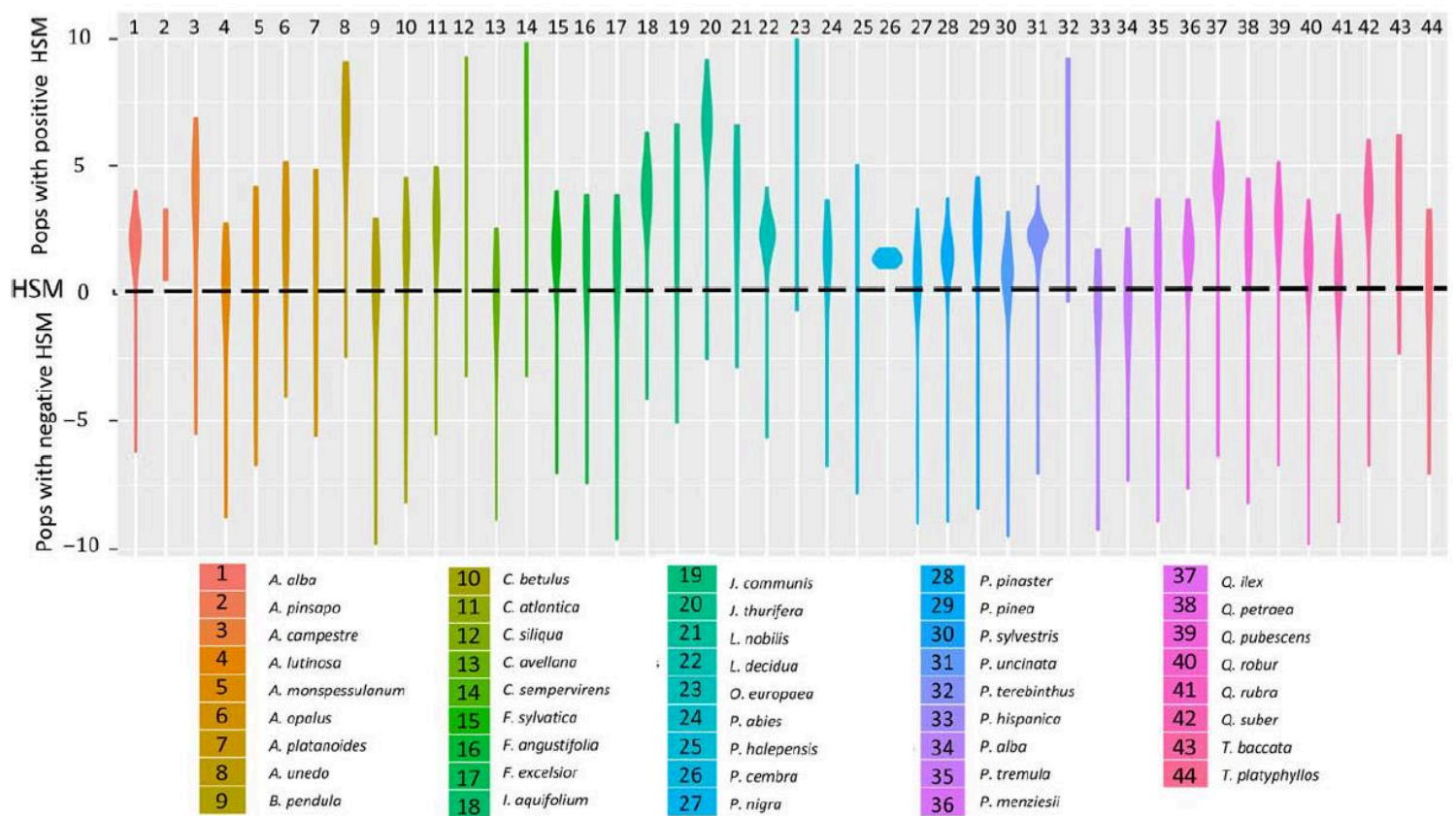


Figure 24 : Marges de sécurité hydraulique (HSM) pour 44 espèces. HSM = différence entre potentiel minimum mesuré en champ et P_{50} (pour les conifères) ou P_{88} (pour les angiospermes). Presque toutes les espèces possèdent au moins une population présentant une marge de sécurité négative. (Benito-Garzón et al., 2018).

La grande résistance à la cavitation dont peuvent faire preuve certains clades est apparue plusieurs fois de façon indépendante au cours de l'évolution (Maherali *et al.*, 2004 ; Larter *et al.*, 2017 ; McAdam & Cardoso, 2019). En remarquant que 62 genres de 20 ordres différents présentent au moins une espèce au P_{50} inférieur à - 5 MPa, McAdam & Cardoso (2019) suggèrent que la résistance extrême du xylème est une innovation évolutive qu'il est possible d'acquérir relativement facilement. À ce titre les auteurs comparent cette innovation avec un mode de vie aquatique ou avec la stratégie consistant à perdre ses feuilles à la mauvaise saison (plantes décidues), qui sont également deux innovations évolutives apparues de façon indépendantes chez plusieurs genres.

Si l'on s'intéresse aux différences entre groupes taxonomiques, les gymnospermes présentent en moyenne des P_{50} plus faibles que les angiospermes ligneux, ces derniers peuvent malgré tout faire preuve de grande résistance, avec des P_{50} descendant jusqu'à - 10 MPa (Delzon *et al.*, 2010 ; Choat *et al.*, 2012). Concernant les monocotylédones, leur P_{50} moyen est similaire à celui des arbres avec des espèces présentant une résistance extrême, jusqu'à - 7,5 MPa (Lens *et al.*, 2016). Ainsi si les moyennes de P_{50} sont différentes il est frappant de constater que les gammes de P_{50} se recouvrent presque intégralement pour chacun des trois groupes, signe d'une convergence évolutive (Fig. 23.B) (Maherali *et al.*, 2004 ; Choat *et al.*, 2012). Entre groupes fonctionnels, on remarque que pour un même biome, les arbustes ont des P_{50} plus faibles que les arbres (Maherali *et al.*, 2004 ; Brendel & Cochard 2011). Cela peut s'expliquer par la nécessité pour les premiers d'être tolérants à la sécheresse, du fait d'une compétition importante pour l'eau dans les couches superficielles du sol. Les arbres, quant à eux, peuvent prospector un volume de sol plus grand et plus en profondeur.

Une méta-analyse récente montre que presque toutes les espèces fonctionnent en moyenne à des valeurs de potentiels hydriques minimums proches de leur P_{50} et ce quel que soit le biome considéré (Choat *et al.*, 2012). Explorant cette approche, certains auteurs signalent que toutes les espèces présentent au moins une population pour laquelle la marge de sécurité est négative (Benito-Garzón *et al.*, 2018), c'est-à-dire qu'elles sont exposées à des potentiels minimums inférieurs à leur P_{50} (pour les gymnospermes) ou leur P_{88} (pour les angiospermes). Ceci les expose à un risque de mortalité par dysfonctionnement hydraulique à court terme (Fig. 24). Pour prendre un cas particulier, une faible résistance à la cavitation a par exemple été évoquée pour expliquer le déclin de populations de *Rhamnus ludovici-salvatoris*, endémiques des îles Baléares (El Aou-ouad *et al.*, 2017).

En ce qui concerne notre espèce modèle, le *Populus tremula x alba* a un P_{50} de - 1,8 MPa (Awad *et al.*, 2010), ce qui est peu résistant dans le genre *Populus*, qui contient des espèces

extrêmement vulnérables à l'image du *Populus deltoides* ($P_{50} = - 1,35$ MPa) et d'autres à la résistance plus marquée, comme le *Populus nigra* ($P_{50} = - 2,95$ MPa) (Cochard *et al.*, 2005).

2) Variabilité intra-spécifique

Nous avons vu que les plantes fonctionnent en limite de potentiel hydrique, ce qui pose la question de leur maintien sous un climat aux conditions hydriques plus contraintes (Aitken *et al.*, 2008 ; Allen *et al.*, 2015). Nous avons également vu que la variabilité inter-spécifique peut être grande pour la vulnérabilité à la cavitation. Dans le paragraphe précédent nous avons considéré le P_{50} comme un trait fixé pour l'espèce. Nous allons voir dans ce paragraphe que la résistance à la cavitation est un trait également soumis à variation à l'échelle intra-spécifique et verrons dans quel ordre de grandeur. Il a été montré dans une méta-analyse compilant 33 études pour 46 espèces que la variabilité intra-spécifique de la résistance à la cavitation représente 33 % de la variabilité totale entre espèces à l'échelle d'un genre (Anderegg, 2015). Lorsque l'on compare des populations, de la variabilité phénotypique est souvent observée sur la résistance à la cavitation, mais cela n'est pas systématique. Par exemple, dans une étude menée sur quatre espèces (deux conifères et deux angiospermes) échantillonnées le long de leur aire de répartition en Europe, Gonzáles-Muñoz *et al.* (2018) concluent à l'absence de variabilité phénotypique pour trois des quatre espèces considérées (*Betula pendula*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris* ; mais pas *Populus tremula*). De même, Sáenz-Romero *et al.* (2013) n'observent pas de différences entre population le long d'un gradient altitudinal. Ainsi, selon certains auteurs le P_{50} est un trait propre à chaque espèce et, en se basant sur le potentiel hydrique, il peut être utilisé pour connaître l'embolie native en champ (Vitra *et al.*, 2019) ou les marges de sécurité hydrauliques (Benito-Garzón *et al.*, 2018).

La variabilité phénotypique d'un trait à l'échelle intra-spécifique peut avoir deux composantes :

- Variabilité génétique : les différences de phénotypes exprimés entre individus au sein d'une population (ou entre populations) viennent de différences de génotypes, par sélection naturelle.
- Plasticité phénotypique : les changements de phénotypes exprimés viennent de changements d'expression du génotype, en réponse à des changements de conditions environnementales. On parle alors d'acclimatation aux conditions environnementales.

a) Composante génétique

La recherche de variabilité génétiques de la résistance à la cavitation est récente et facilitée par l'amélioration de l'efficacité des méthodes de phénotypage (notamment par la méthode du Cavitron) (Lamy *et al.*, 2011 ; Wortemann *et al.*, 2011). Ces études montrent que la diversité génétique est faible sur ce trait pour le hêtre et le pin maritime (Wortemann *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2014); ceci étant interprété comme le signe que le trait est canalisé du fait de contraintes génétiques (Lamy *et al.*, 2012). En d'autres termes, l'architecture génétique pourrait réduire la variabilité d'un trait afin de préserver des phénotypes fonctionnels (Sáenz-Romero *et al.*, 2013). Cela va dans le même sens que les résultats obtenus dix ans plus tôt par Maherali *et al.* (2002), qui n'observaient pas de divergence évolutive ni de variabilité de P_{50} entre populations de *Pinus ponderosa* poussant dans des environnements contrastés. La comparaison de cultivars pour les espèces cultivées, qu'il s'agisse de variétés de noyers ou d'hévéas, a montré une absence de variabilité génétique du P_{50} pour ces deux espèces (Jinagool *et al.*, 2015 ; 2018). Plus récemment, des résultats similaires ont été obtenus sur chêne sessile, où aucune différence dans le P_{50} n'a été montrée entre provenances plantées dans un jardin commun (Lobo *et al.*, 2018). Quelques études ont pu mettre en évidence de la différenciation génétique associée à la vulnérabilité à la cavitation, par exemple chez *Pinus canariensis* et *Pinus halepensis*, mais celle-ci reste faible (López *et al.*, 2013 ; David-Schwartz *et al.*, 2016). La synthèse des études précédemment citées montre que la composante génétique ne joue pas de rôle important quant aux variations intra-spécifiques de la résistance à la cavitation, qui auraient majoritairement pour origine la plasticité phénotypique.

b) Plasticité phénotypique

Les études ayant exploré les deux composantes de la variabilité intra-spécifique observent généralement une variabilité par plasticité phénotypique supérieure à celle due à la composante génétique (Corcuera *et al.*, 2011 ; López *et al.*, 2013 ; Aranda *et al.*, 2015 ; Jinagool *et al.*, 2015). Une étude récente incluant des populations de hêtres en marge d'aire de répartition montre des différences entre les populations en marge de l'aire de distribution, que les auteurs attribuent à de la plasticité (Stojnić *et al.*, 2018). De la même manière sur gymnospermes, une étude comparant plusieurs jardins communs met en évidence une variabilité phénotypique en lien avec la température des aires d'origines de différentes populations de *Pinus canariensis* (López *et al.*, 2016). Seulement, cette plasticité phénotypique n'est observée que dans le jardin

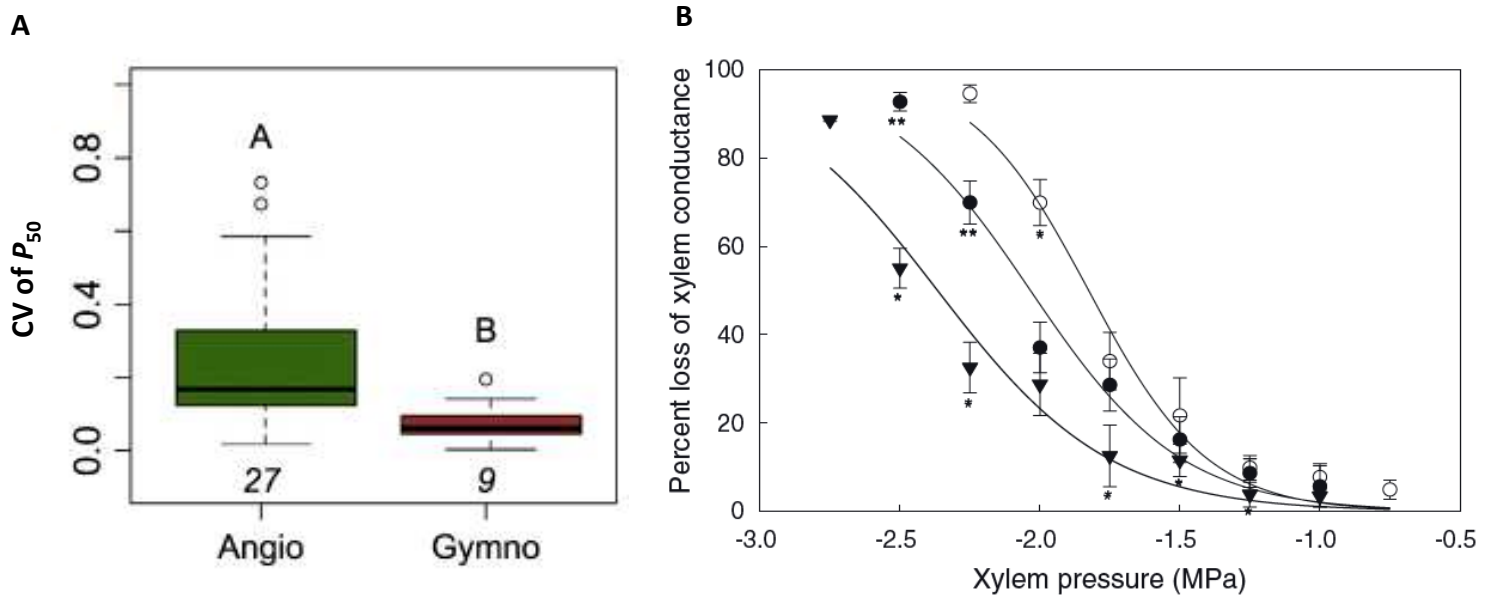


Figure 25 : Acclimatation du P_{50} . **A** : Coefficient de variation du P_{50} à l'échelle intra-spécifique selon le groupe (Aderegg, 2015). **B** : Courbes de vulnérabilité en réponse à des conditions de croissance contrastées pour le régime hydrique chez le peuplier. Cercles blancs, arrosés à capacité au champ ; cercles noirs, stress hydrique modéré ; triangles, stress hydrique sévère (Awad *et al.*, 2010).

commun avec les conditions climatiques les plus contraignantes (précipitations basses). Il est possible que cette grande variabilité soit le fait des conditions très contraintes dans lesquelles les individus ont poussé, qui auraient favorisé l'émergence de nouveaux phénotypes peu communs (Schlichting, 2008).

En comparant les P_{50} de plusieurs populations de hêtres, Herbette *et al.* (2010) observent des différences de résistance à la cavitation dues à la plasticité au sein d'un même individu : les branches les plus exposées à l'ombre sont plus vulnérables que les branches en pleine lumière. En comparant des populations, des différences de P_{50} sont rapportées sans qu'elles puissent être liées à des variables climatiques (latitude, altitude, exposition Nord/Sud) (Herbette *et al.*, 2010). Cette dernière observation est similaire aux observations faites par d'autres auteurs un an plus tôt en comparant des populations de pin sylvestre (Martínez-Vilalta *et al.*, 2009). Herbette *et al.* (2010) suggèrent que l'absence de lien entre les variables climatiques et les P_{50} mesurés pourrait s'expliquer de deux manières : soit les populations les plus exposées à la sécheresse s'acclimatent sur des paramètres de résistance à la sécheresse davantage que sur la tolérance à la cavitation ; soit une acclimatation à la résistance à la cavitation est nécessaire chez de nombreuses populations non exposée à la sécheresse, du fait, par exemple, d'une exposition à la cavitation hivernale due au gel. De même, dans une étude utilisant un dispositif d'exclusion de pluies sur le long terme (10 ans), Limousin *et al.* (2010) n'observent pas de changement de résistance à la cavitation sur chêne vert malgré une diminution de potentiel hydrique, pourtant signe d'un stress hydrique plus important.

L'acclimatation à certaines conditions environnementales a été identifiée comme augmentant ou diminuant la résistance à la cavitation par plasticité phénotypique : un régime hydrique contraint permet d'obtenir des individus plus résistants (Fig. 25.B) (Awad *et al.*, 2010 ; Fichot *et al.*, 2010 ; Plavcová & Hacke, 2012), l'ombre est connue pour augmenter la vulnérabilité à la cavitation (Barigah *et al.*, 2006 ; Plavcová *et al.*, 2011) et le même effet a été obtenu par l'augmentation des apports azotés (Cooke *et al.*, 2005 ; Plavcová & Hacke, 2012). Dans une revue, Anderegg (2015) montre que la plasticité phénotypique sur la résistance à la cavitation est bien plus faible chez les conifères que chez les angiospermes (Fig. 25.A).

Tantôt qualifiée de « faible » (Lamy *et al.*, 2014), tantôt de « substantielle » (Anderegg, 2015), la variabilité de la résistance à la cavitation a donc bien été mise en évidence à l'échelle intra-spécifique. Cette variabilité serait davantage due à la plasticité phénotypique plutôt qu'à de la variabilité génétique (Corcuera *et al.*, 2011 ; López *et al.*, 2013). Cela soulève la question de savoir si la plasticité phénotypique de la résistance à la cavitation peut être d'une amplitude

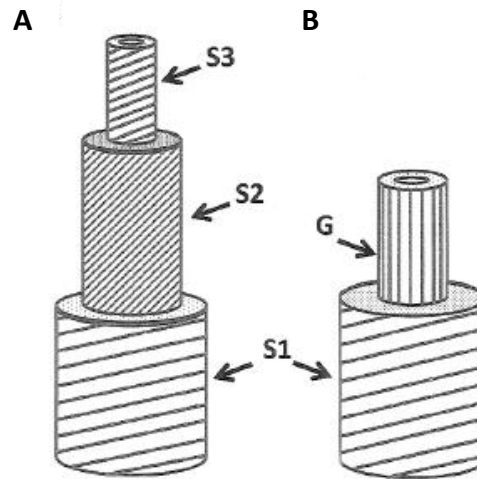


Figure 26 : Dépôts de paroi secondaire organisés en couches. **A** : Couches S1 à S3 chez les angiospermes. **B** : Cas particulier du bois de tension chez les angiospermes (Badel *et al.*, 2015).

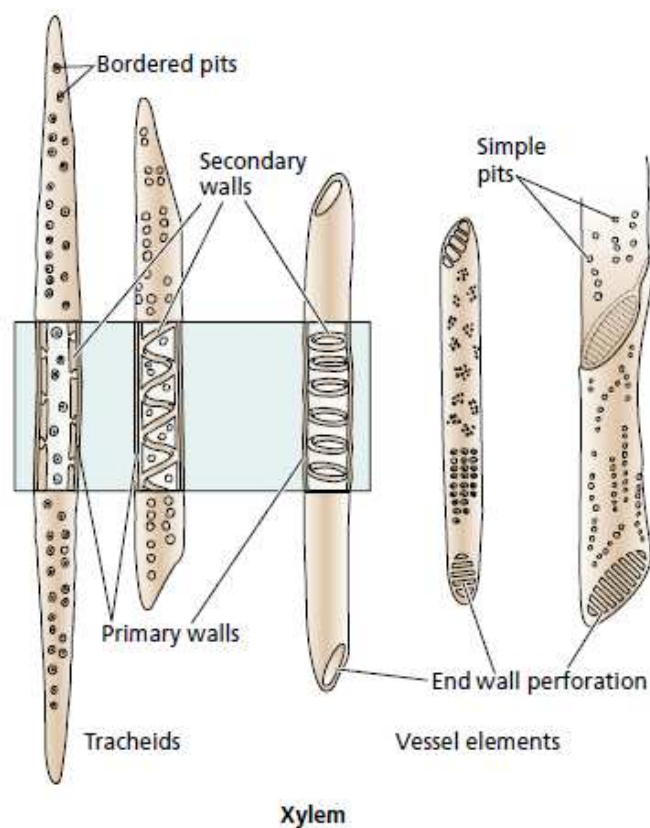


Figure 27 : Éléments conducteurs du xylème des angiospermes (Taiz & Zeiger, 2010).

suffisamment importante pour permettre une acclimatation aux conditions climatiques futures. Une étude récente va dans ce sens : dans des plantations en jardins communs en limites d'aires de répartition, en comparant plusieurs populations de Douglas, il a été constaté une corrélation entre P_{50} et survie (Chauvin *et al.*, 2019).

La recherche des bases génétiques à l'origine de la variabilité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation se heurte à la difficulté de l'identification de gènes candidats (Allario *et al.*, 2018). Comprendre les bases structurelles de la vulnérabilité à la cavitation à l'échelle intra-spécifique est un préalable à la recherche de gènes candidats pour ce trait.

V. Structure du xylème

Nous avons vu que, tant à l'échelle intra- qu'inter-spécifique, le P_{50} est soumis à variabilité. Pour explorer la question des déterminants structuraux à l'origine de cette variabilité, nous devons tout d'abord nous pencher sur l'organisation du xylème et rappeler comment sa constitution détermine la résistance à la cavitation. Dans le paragraphe qui suit, nous nous pencherons sur le xylème secondaire, un tissu lignifié issu de la croissance radiale (en diamètre) chez les plantes.

En plus de leur membrane plasmique, les cellules végétales possèdent une paroi pectocellulosique, elle-même composée de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire. Les dépôts de paroi secondaire sont organisés en couches de cellulose : habituellement nommées couches S1 à S3 (Fig. 26). C'est un changement de l'orientation des micro-fibrilles de cellulose qui explique ces séparations entre couches. Les couches S1 et S3 sont fines alors que la couche S2 est bien plus épaisse. Il y a des cas particuliers, par exemple, le bois de tension des angiospermes ne présente pas de couche S2 ni S3 mais une couche riche en cellulose et hémicellulose, appelée G, avec des micro-fibrilles orientées dans le sens de l'élongation (Timell *et al.*, 1967 ; Badel *et al.*, 2015).

Le xylème est composé de plusieurs types de cellules :

- Des cellules vivantes formant le parenchyme. Les cellules sont allongées dans le sens radial (les rayons) ou axial (cellules associées au vaisseau) assurant la nutrition du xylème (van Bel 1990) ; le rôle de ces cellules a été passé en revue récemment par Morris *et al.* (2018)

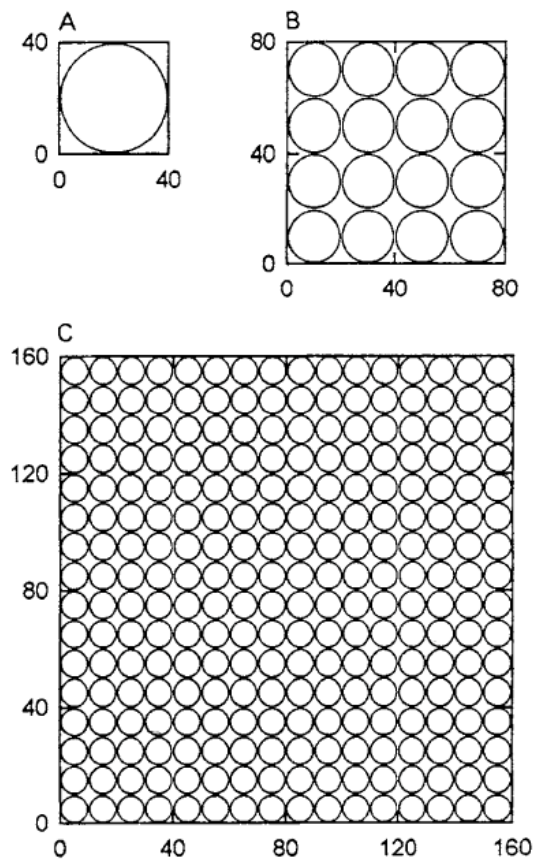


Figure 28 : Conductance théorique de vaisseaux. Selon la loi de Hagen-Poiseuille, les trois groupes de vaisseaux **A**, **B** et **C** ont la même conductance théorique (Tyree *et al.*, 1994).

- Des cellules mortes formant le sclérenchyme. Il est composé de fibres (tissu de soutien), de trachéides et de vaisseaux (tissu conducteur ; Fig. 27). Il est à noter que chez les gymnospermes, le sclérenchyme est composé uniquement de trachéides, qui jouent le double rôle de tissu de soutien et de tissu conducteur de sève brute.

En situation de sécheresse, ce sont les éléments conducteurs qui, si exposés à des forces de tension trop élevées, sont soumis au risque de cavitation. Notre attention se portera donc sur le lien entre les propriétés structurelles et hydrauliques des éléments conducteurs.

1) Les éléments conducteurs

a) Circulation de l'eau dans le vaisseau

Dans les vaisseaux, l'eau circule au contact de la paroi S3. L'écoulement du flux d'eau dans un vaisseau suit la loi de Hagen-Poiseuille (Dimond, 1966). Elle est définie par la relation suivante :

$$q = K_h \times \frac{\Delta P}{\Delta x}$$

Avec q le flux en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$; $\Delta P / \Delta x$ le gradient de pression entre les deux extrémités du vaisseau et K_h la conductance théorique en $\text{m}^3 \cdot \text{MPa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, elle-même définie comme suit :

$$K_h = \frac{\pi \times D_v^4}{128\eta}$$

Avec D_v le diamètre du vaisseau en m et η l'indice de viscosité de l'eau ($1.002 \times 10^{-9} \text{ m}^4 \cdot \text{MPa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 °C). Ainsi, le rapport entre le diamètre d'un vaisseau et sa conductance varie à la puissance 4. Un vaisseau de 40 μm de diamètre aura la même conductance que 16 vaisseaux de 20 μm de diamètre (Fig. 28) (Tyree *et al.*, 1994).

Parce qu'elle ne prend pas en compte la résistance opposée par les ponctuations, la loi de Hagen-Poiseuille ne peut pas être utilisée pour calculer la conductance d'un segment de tige (Giordano *et al.*, 1978). Si la conductance théorique calculée à partir du diamètre des vaisseaux ne peut pas être atteinte *in planta*, il s'agit malgré tout d'un trait très utilisé en physiologie végétale car il permet de comparer des sections de xylème entre elles. La conductance théorique montre le lien direct entre diamètre des vaisseaux et efficacité du transport de l'eau.

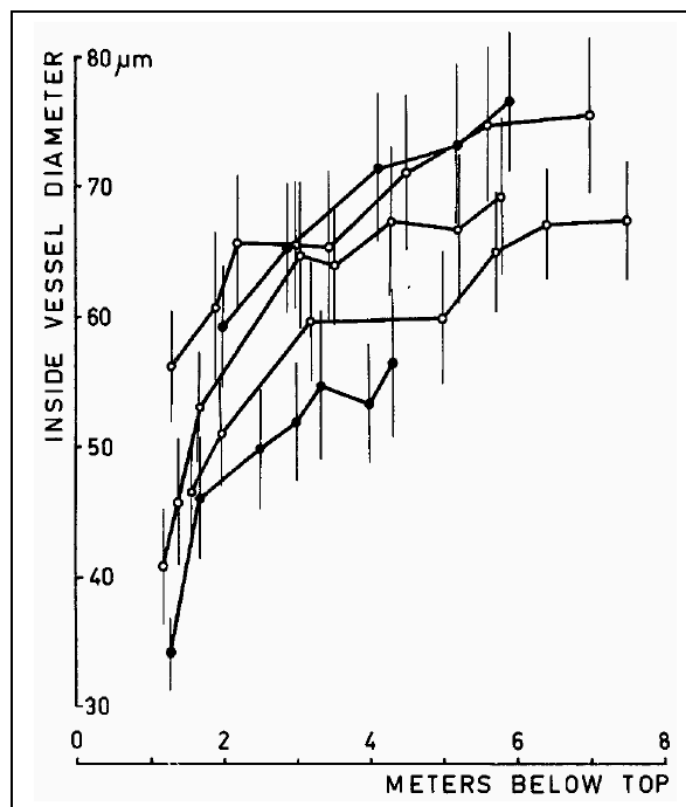


Figure 29 : Étiollement des vaisseaux. Plus l'échantillonnage est éloigné du sommet, plus les vaisseaux sont de grand diamètre. Cercles blancs, bouleaux ; Cercles noirs, peupliers. (Tyree & Zimmermann, 2002, d'après Zimmermann, 1978).

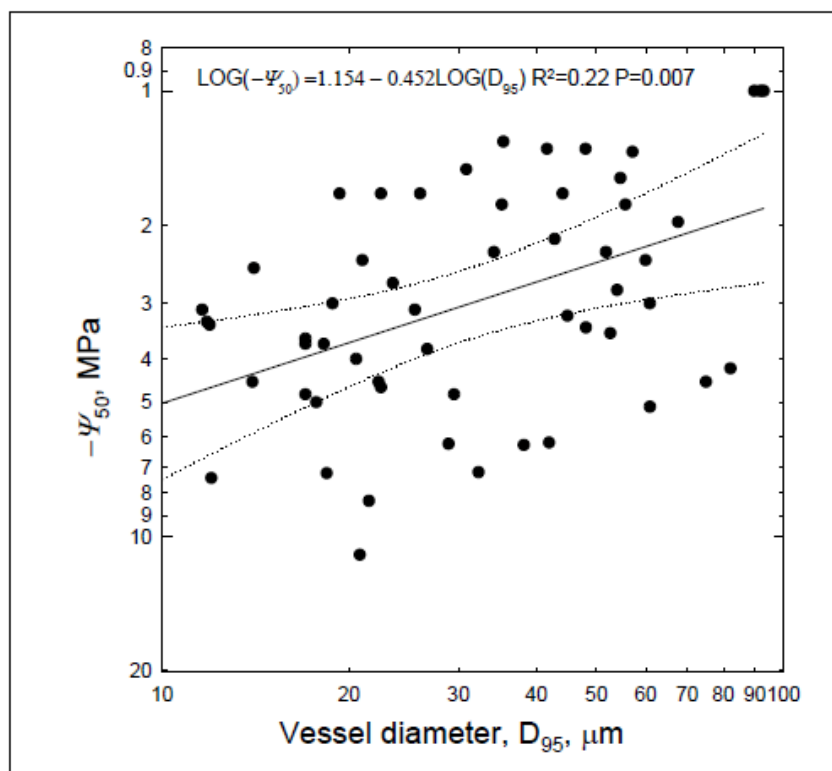


Figure 30 : Corrélation entre diamètres des vaisseaux et P_{50} à l'échelle interspécifique. Chaque point représente une espèce. (Tyree & Zimmermann, 2002 ; d'après Tyree *et al.*, 1994).

b) Dimensions

Alors que chez les gymnospermes une trachéide est de petit diamètre (autour de 10 μm), chez les angiospermes les vaisseaux ont un diamètre compris de 10 à 500 μm suivant les espèces (van der Graaff & Baas, 1974 ; Tyree *et al.*, 1994). Chez le peuplier, des diamètres de vaisseaux de 23 à 33 μm ont été mesurés respectivement chez *Populus tremuloides* et *Populus balsamifera* (Jacobsen *et al.*, 2012). Chez *Populus tremula x alba*, une étude réalisée par l'équipe indique un diamètre de vaisseaux moyen autour de 45 μm (Awad *et al.*, 2010). Notons qu'au sein d'un individu, le diamètre des vaisseaux est connu pour décroître à mesure que l'on se rapproche de l'apex, un phénomène appelé *étiolement* (Fig. 29) (Petit *et al.*, 2010). Les vaisseaux les plus larges en partie basale de la tige opposent une résistance moindre au flux d'eau et permettent ainsi à l'arbre de transporter l'eau à de plus grandes hauteurs (Koch *et al.*, 2004 ; Domec *et al.*, 2009).

Il existe un lien entre la vulnérabilité à la cavitation et l'augmentation du diamètre des vaisseaux lorsque l'on compare i) les espèces entre elles (Fig. 30) (Tyree *et al.*, 1994), ii) des espèces d'un même genre (Lens *et al.*, 2011 ; Scholz *et al.*, 2013b), iii) dans le cas de la plasticité (Awad *et al.*, 2010) ou iv) les organes d'un même individu (McElorne *et al.*, 2004). Toutefois, cette relation est moins claire lorsque l'on étudie des espèces provenant de biomes différents (Hacke *et al.*, 2017). Malgré l'observation de ces corrélations, il n'existe pas d'explication liant directement la résistance à la cavitation d'un vaisseau avec son diamètre : le lien doit être indirect (Badel *et al.*, 2015 ; Hacke *et al.*, 2017). Le nombre important d'études testant le lien entre diamètre et résistance peut être expliqué par la simplicité de la mesure du paramètre : une simple coupe transversale observée en microscopie suffit (Scholtz *et al.*, 2013).

L'autre paramètre décrivant la forme des éléments conducteurs est leur longueur. Chez les gymnospermes, les trachéides sont de faibles longueurs (quelques millimètres tout au plus) car constituées d'une seule cellule tandis que les vaisseaux sont un assemblage d'éléments de vaisseaux, chacun constitué d'une cellule, et interconnectés par des plaques perforées. Chaque élément de vaisseau fait de 200 à 2000 μm de long et les vaisseaux qu'ils forment vont de quelques centimètres à plusieurs mètres de long pour les lianes (van der Graaff & Baas, 1974 ; Tyree *et al.*, 1994). Concernant le peuplier, des mesures chez *Populus tremuloides* et *Populus balsamifera* font apparaître des longueurs moyennes de 2 à 7 cm respectivement et des longueurs maximales de 15 à 35 cm respectivement pour les vaisseaux les plus longs (Jacobsen *et al.*, 2012). Il est à noter que ce paramètre est plus délicat à mesurer que pour le diamètre (Scholz *et al.*, 2013a), car la plupart des méthodes de mesures sont des méthodes statistiques,

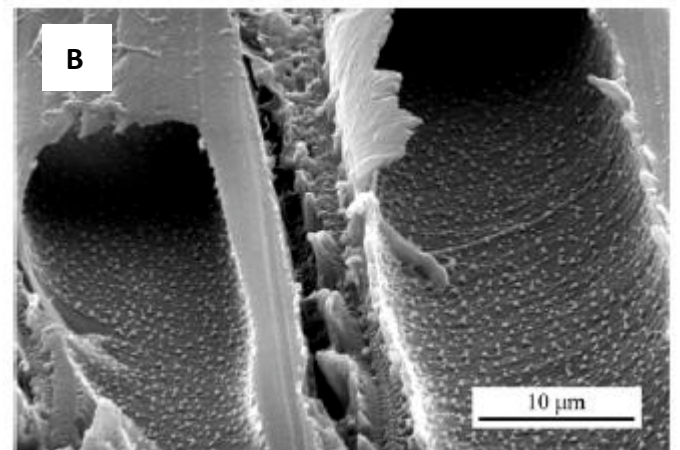
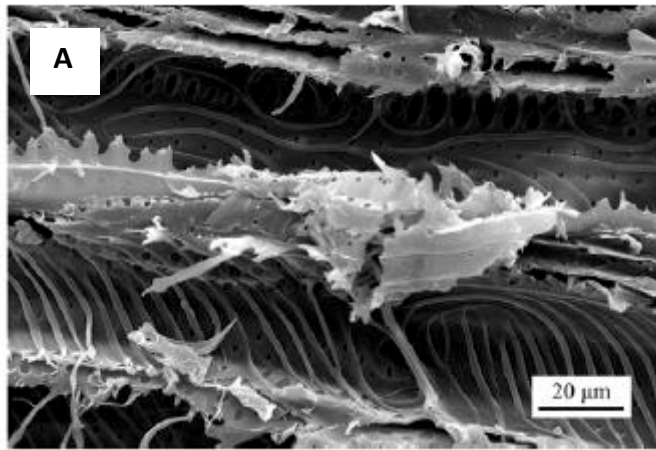


Figure 31 : Ornémentations de la paroi des vaisseaux. **A** : épaissement hélicoidaux chez *Hoheria populnea*. **B** : épaisissements « en verrue » chez *Callitris endlicheri* (Kohonen & Helland, 2009).

comme l'injection de silicone (Sperry *et al.*, 2005 ; Wheeler *et al.*, 2005), qui est la méthode la plus répandue, ou l'injection d'air (Cohen *et al.*, 2003), qui est une méthode très pratique pour estimer la longueur maximale des vaisseaux mais rarement utilisée pour estimer la distribution des vaisseaux. De plus, lors d'études portant sur la résistance à la cavitation, il y a le risque d'être exposé à l'artefact dû aux vaisseaux longs qui impacte la mesure de résistance à la cavitation (Cochard *et al.*, 2010 ; voir également partie III.4. *Mesure de la vulnérabilité à la cavitation*). Par exemple, le lien entre longueur de vaisseaux et résistance à la cavitation entre espèces a été mis en évidence en comparant des espèces du genre *Acer* mais pas chez *Prunus* (Lens *et al.*, 2011 ; Scholz *et al.*, 2013b).

c) Comportement de l'eau au contact du vaisseau

La question de la composition de la couche S3, surface intérieure des vaisseaux directement en contact avec l'eau, se pose. De cette composition peut directement dépendre l'adhésion entre paroi et eau. Si la surface est hydrophobe (ce qui est le cas de la lignine (Laschimke, 1989)), le flux d'eau est peu freiné par des forces de frottement sur les parois car une fine couche d'air se forme entre l'eau et la paroi (Sendner *et al.*, 2009). Mais dans un contexte de flux sous tension, le risque de cavitation est accru car le risque de nucléation hétérogène est augmenté par la perte d'adhésion de la colonne d'eau à la paroi. À l'inverse, une surface hydrophile provoque une adhésion importante de l'eau à la paroi, augmentant les forces de frottement et créant ainsi une bande appelée « couche limite » où le déplacement de l'eau est nul (Sendner *et al.*, 2009). Les mesures d'angles de contact entre l'eau et la paroi donnent des valeurs d'angles comprises entre 0 et 90 ° (Kohonen, 2006 ; Lee *et al.*, 2013 ; McCully *et al.*, 2014). L'hydrophobicité des surfaces des vaisseaux serait donc comprise entre purement hydrophobe et purement hydrophile. Une analyse de la composition de la surface de la paroi du vaisseau en contact avec la sève montre qu'elle est majoritairement composée de cellulose et d'hémicellulose, avec une concentration significative de lignine et de lipides (Schenk *et al.*, 2018). Des protéines ont également été mises en évidence mais les auteurs ne peuvent déterminer si elles sont présentes à la surface du vaisseau ou transportées par la sève.

Enfin, les surfaces intérieures des vaisseaux de certaines espèces possèdent des ornements (Fig. 31). Une étude en Nouvelle Zélande a permis de les mettre en évidence chez la moitié des 178 espèces étudiées (Meyland & Butterfield, 1978). De manière plus générale, dans une étude portant sur plusieurs espèces issues de différents biomes, van der Graaff & Baas (1974) estiment que ces ornements se retrouvent chez les espèces présentes

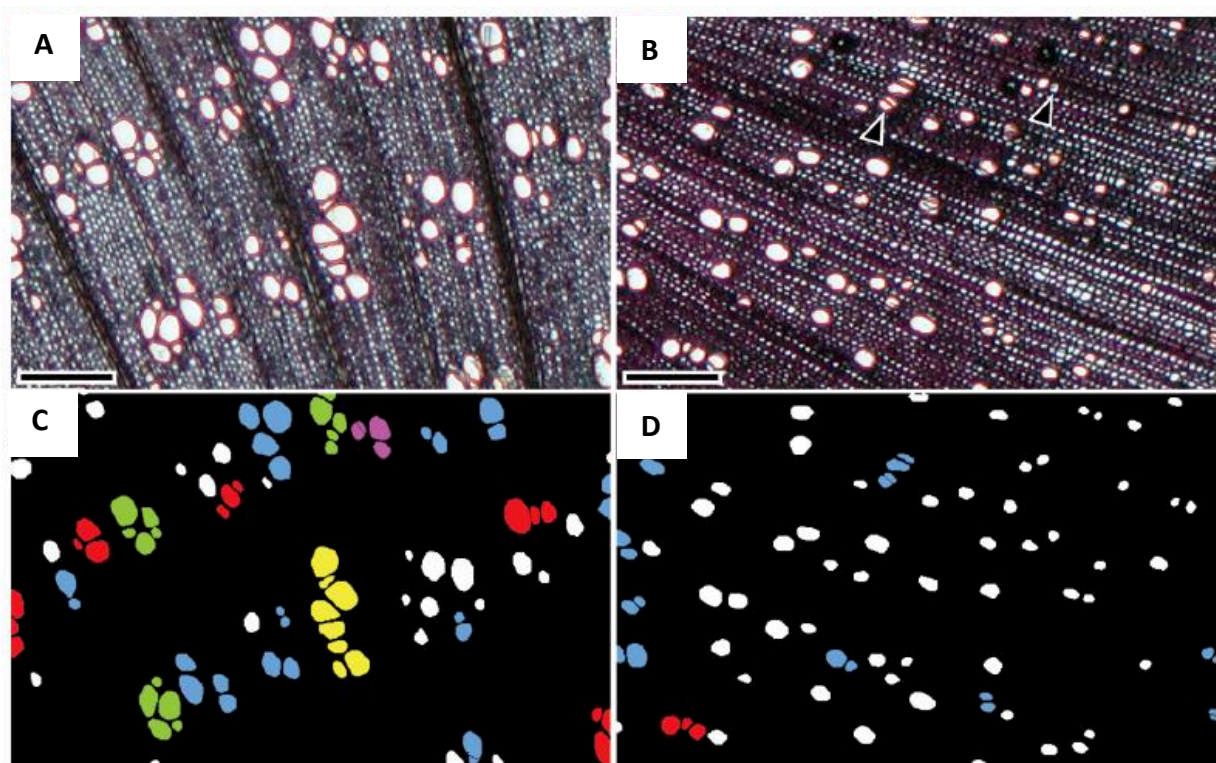


Figure 32 : Dénombrement des groupements de vaisseaux sur deux coupes transversales *Verbascum thapsus*. **A et B** : Observation des coupes en microscopie optique venant de site sec (**A**) ou humide (**B**). **C et D** : Décompte du nombre de vaisseaux par groupement par analyse d'image. La couleur indique le nombre de vaisseaux du groupement: blanc, vaisseau solitaire ; bleu, groupe de deux vaisseaux ; rouge, trois vaisseaux ; violet, quatre vaisseaux ; vert, cinq vaisseaux et jaune, huit vaisseaux. L'échelle représente 200 μm (von Arx *et al.*, 2013).

dans les zones tempérées et subtropicales à hauteur de 30-60 %, alors qu'on ne les trouverait que chez 15 % des espèces tropicales. Le trait est également corrélé au diamètre des vaisseaux ; les vaisseaux de 10 à 50 μm de diamètre présentaient des ornements alors que les vaisseaux plus gros n'en présentaient pas (van der Graaff & Baas, 1974). Dans des études récentes, des auteurs constatent que les vaisseaux ornements présentent une surface plus hydrophile que les non-ornements (Kohonen, 2006 ; Kohonen & Helland, 2009). Ils attribuent également aux ornements un rôle dans la dissolution de bulles d'air (Kohonen & Helland, 2009), mais leurs conditions expérimentales étant très éloignées des conditions *in planta*, les auteurs eux-mêmes considèrent que d'autres expérimentations sont nécessaires sur ce dernier point. Des simulations d'écoulement de fluides montrent que des canaux sur les surfaces pouvaient notablement augmenter la vitesse de fluide s'y écoulant, même si la paroi était hydrophile (Sendner *et al.*, 2009 ; Calabro *et al.*, 2013). Cela pourrait apporter une autre explication sur le rôle des ornements.

En plus des vaisseaux, il a été évoqué que les fibres puissent avoir un rôle dans le transport de l'eau (Cai *et al.*, 2014 ; Pan & Tyree, 2019). D'après cette hypothèse encore récente, leur part dans la conductance serait minime mais elle pourrait servir de chemin alternatif au trajet d'eau en cas d'embolie des vaisseaux.

2) Organisation des vaisseaux

Dans le bois hétéroxylé, les vaisseaux peuvent être plus ou moins interconnectés. Cela n'est pas le cas chez les monocotylédones, où le xylème est organisé en faisceaux, ou chez les gymnospermes, dont le bois homoxylé est homogène et majoritairement constitué de petites trachéides. Ce paragraphe ne concernera donc que le bois des angiospermes.

On observe peu d'interconnexions entre les cernes d'années différentes, à tel point que des auteurs ont développé le concept de *pipe model theory* (Shinozaki *et al.*, 1964). Ce concept considère que chaque feuille ou branche est alimentée par un circuit hydraulique dédié et de ce fait, il n'y a que peu d'interconnexions entre les vaisseaux de cernes différents.

L'accès à la structure en trois dimensions d'un réseau de vaisseaux reste récent car longtemps des obstacles méthodologiques ont empêché d'avoir accès à cette information. Sur une coupe transversale observée en microscopie optique, les vaisseaux peuvent apparaître solitaires ou groupés et des paramètres comme le groupement des vaisseaux peuvent être mesurés à l'échelle de la coupe (Fig. 32) (Scholtz *et al.*, 2013 ; von Arx *et al.*, 2013). Mais ces

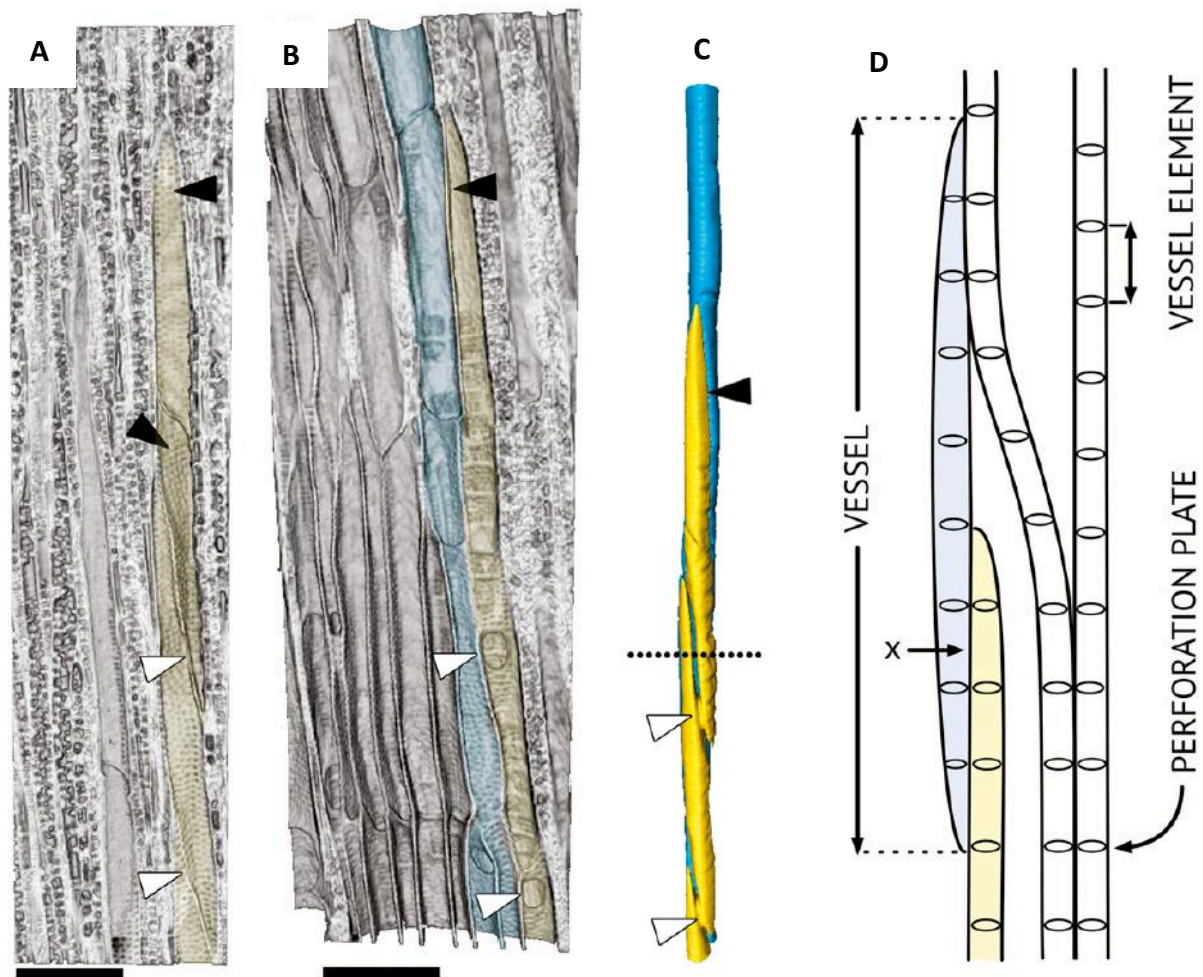


Figure 33 : Visualisation de terminaisons de vaisseaux en tomographie à rayon X. **A et B** : Observation d'une terminaison de vaisseau (jaune) en contact avec un vaisseau plus long (bleu). Le volume en 3D a subi une rotation de 90° entre les deux images. **C** : Extraction du volume en 3D correspondant aux deux vaisseaux étudiés. Des champs de ponctuations intervaisseaux sont représentés par les flèches noires. Deux plaques de perforations sont représentées par des flèches blanches. **D** : Représentation schématique de deux terminaisons de vaisseaux. L'échelle représente $100\ \mu\text{m}$ (Wason *et al.*, 2017).

observations en deux dimensions ne sont qu'un instantané de l'organisation des vaisseaux en un plan. En réalisant une succession de coupes en microscopie, il est possible d'avoir une vue du système en trois dimensions (Zimmermann & Tomlinson, 1966). Cette méthode était extrêmement chronophage. Une autre méthode consiste à réaliser des micro-moulages des vaisseaux en injectant de la silicone sous pression dans le système vasculaire. Après polymérisation de la silicone, la digestion du bois par des acides rend possible la visualisation des vaisseaux (André *et al.*, 1999). Cette technique permet une visualisation en 3D des vaisseaux mais ne permet pas de conserver toute l'architecture du xylème. Ces premières méthodes ont permis de montrer que les vaisseaux sont arrangés de façon aléatoire dans le xylème, sauf aux points d'abscission des feuilles et fleurs (André *et al.*, 1999).

Les avancées récentes en imagerie directe, avec le développement des méthodes de tomographie à rayons X, ont permis des études de l'architecture du xylème, d'abord qualitatives (Fig. 33) (Steppe *et al.*, 2004). Des études quantitatives portant sur l'architecture en 3D commencent à voir le jour (Brodersen *et al.*, 2011 ; Page *et al.*, 2011 ; Wason *et al.*, 2017). Ainsi, l'accès à l'organisation du xylème est de plus en plus aisé et cela laisse présager des études portant sur la diffusion de l'embolie dans le xylème qui tiennent compte de sa structure tridimensionnelle (Ponomarenko *et al.*, 2017). Tant que ces obstacles méthodologiques n'auront pas été franchis, les seules études que nous pourrions mener seront des études statistiques à partir de paramètres mesurés en combinant différentes techniques d'observation (Lens *et al.*, 2011 ; Scholtz *et al.*, 2013).

3) Les connexions entre éléments conducteurs : les ponctuations

a) Structure des ponctuations

Les ponctuations sont des structures permettant le mouvement de l'eau à travers la paroi des vaisseaux. Au niveau de la ponctuation, la paroi primaire joue le rôle d'une membrane hémiperméable (perméable à l'eau mais pas à l'air). Il existe deux types de ponctuations : les ponctuations simples, entre un vaisseau et une cellule du parenchyme, et les ponctuations bordées, situées entre deux éléments conducteurs. Les ponctuations entre les vaisseaux et le parenchyme sont des structures relativement simples (absence de dépôt de paroi secondaire de forme circulaire). En revanche, les ponctuations situées entre des éléments conducteurs

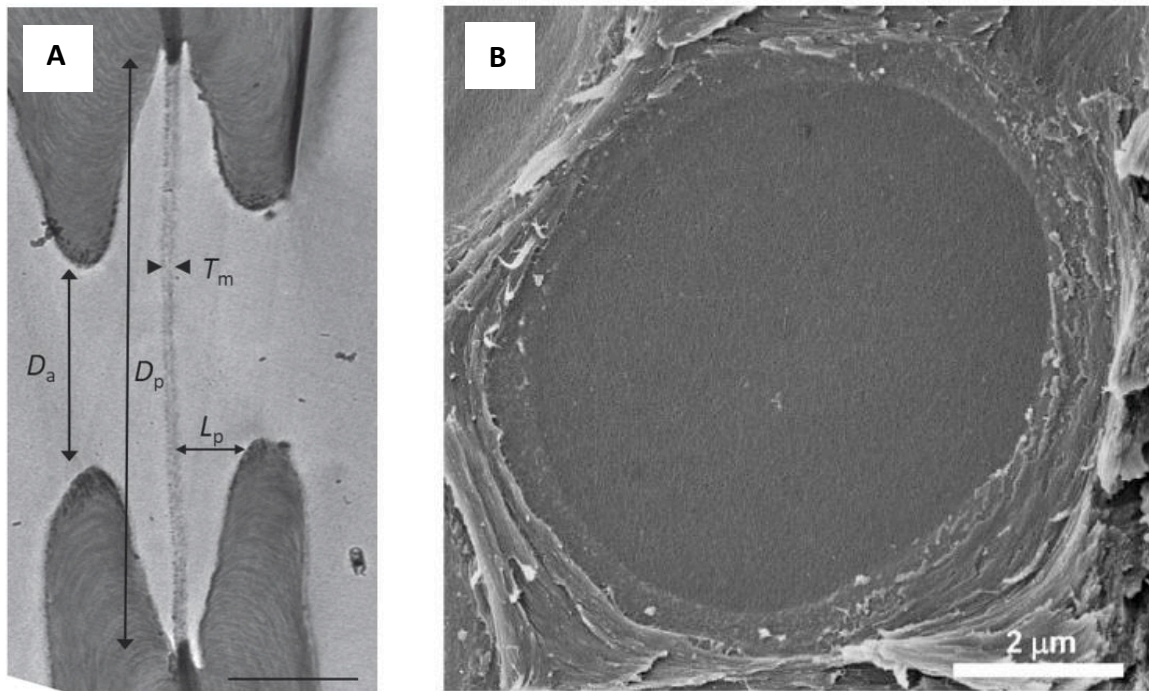


Figure 34 : Observation de ponctuations en microscopie électronique. **A** : Ponctuation de peuplier vue en coupe transversale en microscopie électronique à transmission (TEM). D_a , diamètre de l'ouverture ; D_p , diamètre de la paroi ; T_m , épaisseur de la paroi ; L_p profondeur de la chambre de ponctuation (Allario *et al.*, 2018). **B** : Ponctuation d'érable sycomore vue en coupe longitudinale en microscopie électronique à balayage (MEB). (Lucas *et al.*, 2013). Les barres d'échelles font 2 μm .

(vaisseaux ou trachéides), appelées ponctuations aréolées ou bordées, sont des structures complexes du fait de leur double rôle : permettre le passage de l'eau tout en empêchant la propagation de l'embolie dans le système vasculaire. Nous ne nous intéresserons pas aux ponctuations simples car elles n'ont aucun rôle dans la résistance à la cavitation. En revanche, les ponctuations bordées entre vaisseaux sont l'une des structures-clé dans la mise en place de cette résistance, nous allons donc nous attarder sur leurs paramètres. L'ultrastructure des ponctuations bordées consiste en une zone circulaire, voire elliptique, dans laquelle les parois secondaires sont soulevées, constituant ainsi une cavité appelée « chambre de ponctuation ». Dans cet espace, la paroi primaire n'est pas interrompue et forme ainsi la paroi de la ponctuation (Fig. 34).

La structure de la paroi des ponctuations diffère entre angiospermes et gymnospermes puisque pour ces derniers la paroi est modifiée de façon à former deux zones aux propriétés hydrauliques contrastées : le torus et la marge (Sachs, 1963). Le torus est un épaissement au centre de la paroi de ponctuation. Cette structure joue un rôle dans la résistance à la sécheresse des conifères : lorsqu'une trachéide cavite, les torus des trachéides adjacentes se déplacent jusqu'à recouvrir l'ouverture des ponctuations entre ces deux vaisseaux, bloquant le passage de l'air, agissant comme des soupapes. Cette structure peut expliquer la résistance à la cavitation record dont les gymnospermes peuvent faire preuve (Delzon *et al.*, 2010 ; Bouche *et al.*, 2014). Du fait de la faible longueur des trachéides par rapport aux vaisseaux des angiospermes, l'ascension de l'eau nécessite de franchir un plus grand nombre de ponctuations chez les gymnospermes. La marge est la partie périphérique de la paroi, constituée de faisceaux de microfibrilles de cellulose organisés en réseau lâche laissant de larges pores. Elle a pour rôle de limiter les résistances dues aux parois de ces ponctuations dans le xylème des gymnospermes et ainsi de rester compétitifs par rapport aux angiospermes (Pittermann *et al.*, 2005). En effet, la résistance de la ponctuation au flux d'eau représente environ 50 % de la résistance totale du système hydraulique (Wheeler *et al.*, 2005 ; Schulte *et al.*, 2015) et même jusqu'à 80 % pour les angiospermes (Choat *et al.*, 2006).

Divers paramètres permettent de caractériser l'ultrastructure d'une ponctuation : son diamètre, le diamètre de l'ouverture, la profondeur de la chambre, l'épaisseur de la paroi et sa porosité (Jansen *et al.*, 2009 ; Tixier *et al.*, 2014). Dans le cas des gymnospermes, l'*effet valve* peut être caractérisé en comparant le diamètre du torus avec celui de l'ouverture de la ponctuation (Delzon *et al.*, 2010). Pour ces mesures, la tomographie promet des avancées en effectuant toutes les mesures sur une même ponctuation (Koddenberg *et al.*, 2019).

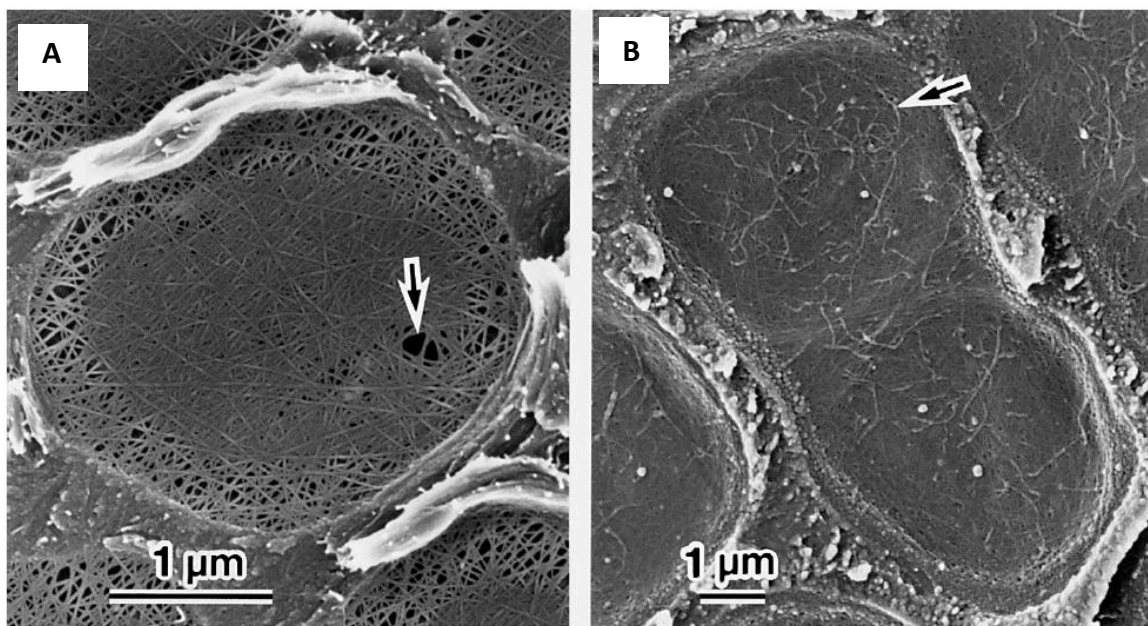


Figure 35 : Mise en évidence de pores de grande taille sur des ponctuations de bouleau (A) et de frêne (B), en microscopie électronique à balayage (Sano, 2004).

b) Taille des pores

La paroi de la ponctuation a été montrée comme étant d'une importance majeure dans la résistance à la sécheresse. En effet, la théorie expliquant actuellement la propagation de la cavitation d'un vaisseau à l'autre prédit que l'air passe à travers la paroi de la ponctuation et que la différence de pression entre le vaisseau fonctionnel (sous tension) et le vaisseau embolisé (à pression atmosphérique) provoque la rupture d'un ménisque eau-air (Crombie *et al.*, 1985 ; Sperry & Tyree, 1988 ; voir également partie III.2. *Diffusion de l'embolie dans le xylème*). Ainsi, deux paramètres structuraux sont couramment considérés au niveau de la paroi de la ponctuation: son épaisseur et le diamètre de ses pores. Ces deux paramètres sont corrélés entre eux (Jansen *et al.*, 2009).

Nous l'avons vu, l'embolie se propage à des vaisseaux adjacents en traversant la paroi. Plus la paroi est épaisse, plus elle sera difficile à traverser pour l'air, aussi, il existe une corrélation entre épaisseur de la paroi et résistance à la cavitation (Li *et al.* 2016). La différence de pressions entre un vaisseau fonctionnel et un vaisseau embolisé amène les parois des ponctuations à se plaquer sur la chambre de ponctuation du vaisseau fonctionnel. La paroi se retrouve ainsi étirée, déformée par ce mouvement (Choat *et al.*, 2004) ; l'impact des paramètres décrivant l'ultrastructure de la ponctuation sur les déformations subies par la paroi a pu être relié à la résistance à la cavitation par un modèle (Tixier *et al.*, 2014).

Étudier la taille des pores de la paroi est un défi, car il ne suffit pas de s'intéresser à la taille moyenne des pores de la paroi : selon la loi de Young-Laplace l'eau passera par le pore le plus gros, où la différence de pressions nécessaire à la rupture du ménisque sera moindre (Jansen *et al.*, 2009). Ainsi, une seule ponctuation, celle portant le plus gros pore, est responsable du passage de la cavitation d'un vaisseau à l'autre (Christman *et al.*, 2009). On appelle cette ponctuation la *ponctuation faible*. Certains auteurs estiment que la grande taille des plus grands pores est si critique qu'elle peut résulter d'erreurs lors de la formation des vaisseaux (Fig. 35) (Plavcová *et al.*, 2013). Mais l'observation de ce trait est rendue difficile par le défi que représente l'observation de l'élément le plus gros lorsque l'on observe une coupe (qui, par définition, n'inclut pas la totalité des ponctuations du vaisseau étudié). Une difficulté supplémentaire vient du fait que la taille des pores est un paramètre qui est sensible à la préparation des échantillons (Li *et al.*, 2016) ou au statut hydrique du vaisseau – un vaisseau embolisé ayant sa paroi étirée, donc des pores agrandis (Choat *et al.*, 2004, Sperry & Hacke 2004).

c) Composition de la paroi

La composition biochimique des parois des ponctuations peut également influencer la résistance à la cavitation (Awad *et al.*, 2012 ; Herbette *et al.*, 2015). Mais étudier la composition des parois représente un défi technique du fait de la taille et de la localisation de l'objet à étudier. Ce champ d'études a bénéficié des innovations de la microscopie : utilisation de colorations histologiques, exposition des échantillons à des lumières ultraviolettes, micro-spectrométrie, utilisation de solutions de contraste pour la microscopie électronique (Bamber, 1961 ; Bauch & Berndt, 1973 ; Sano & Fukuzawa, 1994 ; Fromm *et al.*, 2003 ; Schmitz *et al.*, 2008). Ce n'est que récemment que le développement de techniques permettant une plus grande précision a permis de réelles avancées. L'immunomarquage, qui permet de cibler des molécules par anticorps (Kim *et al.*, 2011 ; Kim & Daniel, 2013 ; Herbette *et al.*, 2015 ; Klepsch *et al.*, 2016) et la microscopie à force atomique couplée avec la spectroscopie infrarouge (*Atomic Force Microscope Infrared-Spectroscopy*, AFM-IR), qui permet de réaliser une mesure de spectroscopie directement sur la membrane (Pereira *et al.*, 2018), ouvrent de nouvelles perspectives d'avancées rapides sur cette question. À ces études nous pouvons ajouter la détection de molécules dans la sève par un suivi individuel de particules (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA), qui a été utilisé pour détecter des lipides présents sur la paroi (Schenk *et al.*, 2017).

4) Formation des éléments conducteurs

Le cambium bifacial est le tissu assurant la croissance secondaire des plantes. Il est constitué d'une monocouche de cellules qui se renouvellent par divisions des cellules cambiales dans le sens tangentiel. Les cellules cambiales peuvent se différencier en cellules constituant le xylème et le phloème. Concernant la formation du xylème, deux étapes permettent de passer des cellules cambiales aux éléments conducteurs :

- La différenciation : Les cellules cambiales se différencient en cellules initiales cambiales puis en cellules de xylème immature puis enfin en précurseurs des éléments conducteurs. On observe lors de ces différentes étapes un allongement cellulaire et le dépôt de la paroi secondaire.

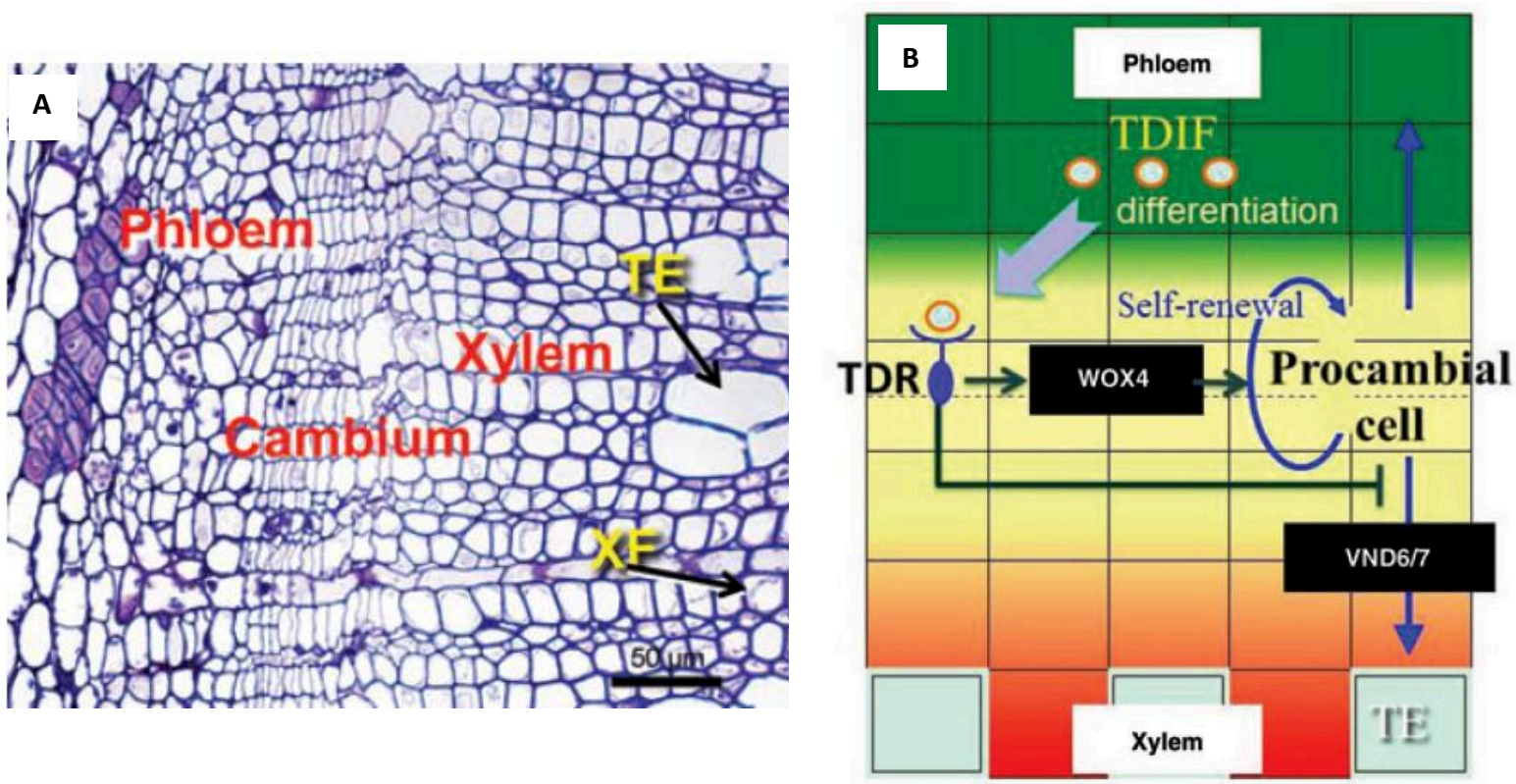


Figure 36 : Différenciation des cellules cambiales. **A** : Coupe transversale de peuplier montrant le cambium bifacial, le phloème et le xylème. TE, éléments conducteurs ; XF, fibre **B** : Schéma des voies de signalisation de la différenciation des cellules cambiales en éléments conducteurs. Notez que **A** est représenté avec une rotation de 90 ° par rapport à **B** (Lucas *et al.*, 2013).

- Les éléments conducteurs immatures deviennent matures : la paroi se lignifie et la cellule se vide de son contenu par apoptose, dans ce cas appelée Mort Cellulaire Programmée (*PCD*).

a) Différenciation

Les cellules cambiales peuvent se différencier en cellules composant le phloème ou le xylème (Fig. 36.A). Dans le second cas, elles pourront devenir des éléments conducteurs, du sclérenchyme ou du parenchyme. Des gènes ont pu être reliés avec l'organisation des faisceaux de vaisseaux chez *Arabidopsis thaliana* : si le phénotype sauvage présente les faisceaux de xylème et de phloème côte à côte (l'ont dit qu'ils sont *collatéraux*), une mutation du gène *IFL1/REV* entraîne un développement du xylème autour du phloème (on parle alors de faisceaux *amphivassaux*) (Zhong & Ye 2004). Les gènes *AtKTN1* et *AtVRLK1* ont été associés à la régulation de l'élongation cellulaire (Burk *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2018). De plus l'analyse d'ARN messagers de l'expansine, une protéine de la paroi pectocellulosique impliquée dans la différenciation des cellules cambiales en vaisseaux, montre que ces protéines sont exprimées de façon spécifique au xylème, confirmant ainsi leur rôle (Im *et al.*, 2000). Enfin, chez le maïs, la mutation *wilted* a été repérée comme bloquant la différenciation des cellules cambiales en méta-xylème (Postlethwait & Nelson, 1957).

Le contrôle de la différenciation des cellules cambiales en cellules xylémiennes se fait par l'inhibition dans le phloème via la voie de signalisation TDIF-TDR (Fig. 36.B). Les gènes *CLE41* et *CLE44* codent le peptide TDIF (*Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor*) dans le phloème (Ito *et al.*, 2006). Le récepteur TDR (*TDIF RECEPTOR*) est principalement exprimé dans le cambium (Hirakawa *et al.*, 2008). Il a pour effet i) d'activer le gène *WOX4* qui entraîne l'auto-régénération du cambium (Ji *et al.*, 2010 ; Suer *et al.*, 2011) et ii) d'inhiber la différenciation des cellules cambiales en éléments conducteurs par suppression des gènes *VND6* et *VND7* (Hirakawa *et al.*, 2010 ; Kondo *et al.*, 2011). Ces gènes sont essentiels à la formation de xylème car, chez *Arabidopsis* comme chez le peuplier, ce sont eux qui induisent la différenciation des cellules cambiales en vaisseaux (Kubo *et al.*, 2005 ; Yamaguchi *et al.*, 2008 ; 2010). En effet, les *VND6* & *7* activent les facteurs de transcription *MYB46* et *MYB83*, à l'origine de la biosynthèse et des dépôts de cellulose, xylane et lignine dans les vaisseaux et les fibres (Fig. 37) (Zhong *et al.*, 2007 ; McCarthy *et al.*, 2009).

Les microtubules corticaux – qui sont formés de polymères de tubulines organisés pour former un tube creux et qui sont l'un des composant du cytosquelette – orientent les dépôts de

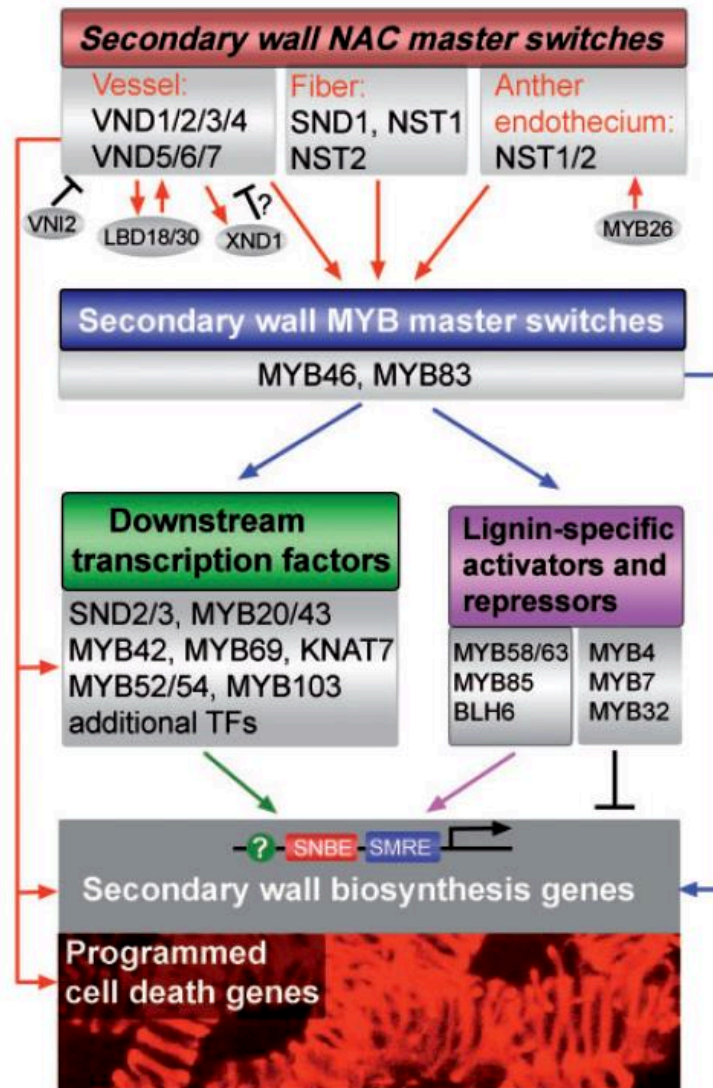


Figure 37 : Cascade transcriptionnelle permettant la mise en place d'éléments conducteurs du xylème (Zhong & Ye, 2015).

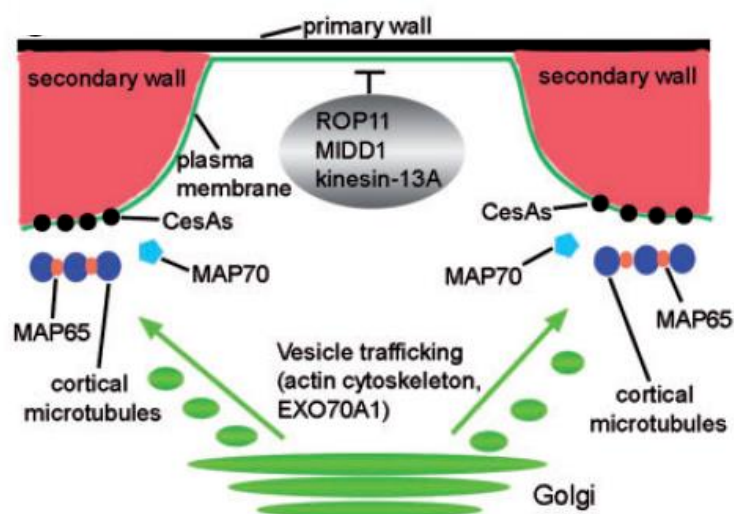


Figure 38 : Mise en place d'une ponctuation. Sous l'action de MIDD1, Kinesin-13A est recrutée, dont l'action consiste en la dépolymérisation des microtubules corticaux, empêchant le dépôt de cellulose par CesA. (Zhong & Ye, 2015).

micro-fibrilles de cellulose de la paroi secondaire par les protéines CesA (*cellulose synthase A*) (Taylor *et al.*, 1999 ; 2000 ; Baskin 2001). Ce sont les protéines MAP65 et MAP70 (*microtubule-associated protein*) qui permettent la mise en place des microtubules corticaux (Mao *et al.*, 2006 ; Pesquet *et al.*, 2010).

b) Formation des ponctuations

Concernant les ponctuations entre éléments conducteurs, leur formation résulte d'une absence de dépôt de cellulose de la paroi secondaire (Fig. 38) (Oda & Fukuda 2012a). En effet, la protéine MIDD1 (microtubule depletion domain), en recrutant Kinesin-13A, la protéine de dépolymérisation des microtubules, empêche les dépôts de cellulose (Oda *et al.*, 2010 ; Oda & Fukuda 2013). Cet espace sans paroi secondaire formera une ponctuation. Le recrutement de MIDD1 est contrôlé par ROP11 GTPase, elle-même contrôlée par ROPGAP3 (inhibiteur) et ROPGEF4 (activateur) (Oda & Fukuda, 2012b). Les renflements de paroi secondaire des ponctuations inter-vaisseaux se formeraient également suivant l'orientation des microtubules corticaux (Uehara & Hogetsu, 1993 ; Chaffey *et al.*, 1997), mais les mécanismes à l'origine de l'absence de dépôt au niveau de l'ouverture de la ponctuation demeurent inconnus (Savidge, 2014). Il est à noter que la composition des renflements de la ponctuation est différente de celle du reste de la paroi secondaire (Savidge, 2014 ; 2016). Enfin, l'hydrolyse de la paroi primaire assure sa maturation en paroi de ponctuation (O'Brien, 1970 ; Butterfield & Meylan, 1982).

c) Lignification et mort cellulaire

La maturation du vaisseau continue avec les dépôts de lignine, qui sont également régulés par les facteurs de transcription MYB46 et MYB83 (Zhong *et al.*, 2007 ; McCarthy *et al.*, 2009). Des monolignols sont synthétisés dans le cytosol puis exportés et polymérisés au niveau de la paroi pectocellulosique pour former la lignine (Freudenberg, 1959 ; Davin & Lewis, 2000).

Des travaux montrent que la mort cellulaire serait régulée par VND6 et 7 via les gènes XCP1 et XCP2 (*XYLEM CYSTEINE PROTEASE 1* et 2), eux-mêmes impliqués dans la production de protéases à l'origine de l'autolyse des composants de la cellule (Avci *et al.*, 2008 ; Ohashito-Ito *et al.*, 2010). Préférentiellement exprimés dans les éléments conducteurs, ces gènes permettent l'accumulation de protéases dans la vacuole, qui les libère lors de son implosion, entraînant la dégradation de l'ensemble des constituants de la cellule (Groover *et al.*, 1997 ; Avci *et al.*, 2008). Ainsi vidé de ses constituants, le vaisseau est à présent mature et fonctionnel.

VI. Déterminants structuraux de la vulnérabilité à la cavitation

1) Déterminants à l'échelle inter-spécifique

La cavitation se répandant dans le xylème selon l'hypothèse du germe d'air, un xylème résistant à la cavitation est un xylème qui bloque efficacement la diffusion de l'embolie. Ainsi, deux hypothèses non-exclusives expliquent le lien entre anatomie et résistance à la cavitation du xylème des angiospermes : la qualité et la quantité de ponctuations (Lens *et al.*, 2013).

Concernant la qualité des ponctuations, la forme de la ponctuation a un impact sur la résistance à la cavitation. Par exemple, plus la paroi est épaisse plus les bulles d'air auront des difficultés à la franchir en se frayant un passage entre les microfibrilles de cellulose. Cela est principalement la conséquence de la taille des pores : une corrélation négative a été observée entre la taille maximale des pores et l'épaisseur de la paroi (Jansen *et al.*, 2009). Également, une paroi plus épaisse va moins se déformer qu'une paroi fine à pression constante, les déformations pouvant provoquer une augmentation de la porosité (Tixier *et al.*, 2014). Ces mêmes auteurs montrent par la modélisation que la forme de la chambre de ponctuation permet un déplacement plus ou moins grand de la paroi, ce qui permet ou limite les déformations de celle-ci (Tixier *et al.*, 2014). Lorsque l'on compare des espèces entre elles (Li *et al.*, 2016) ou au sein d'un même genre (Lens *et al.*, 2011), l'épaisseur de la paroi de ponctuation est un trait fortement corrélé à la résistance à la cavitation. L'ultrastructure des ponctuations a aussi été montrée comme liée à la résistance à la cavitation à l'échelle inter-spécifique (Tixier *et al.*, 2014).

La qualité des ponctuations peut aussi être modifiée par la composition de la paroi, qui peut jouer un rôle dans la résistance à la cavitation en changeant les propriétés biochimiques des parois. Par exemple, la lignine est hydrophobe et renforce la rigidité des parois. Le changement d'hydrophobie de la paroi modifie l'angle de contact air-eau et ainsi la différence de pressions nécessaire pour rompre le ménisque (paramètre α de l'équation de Young-Laplace, voir partie III.2. *Diffusion de l'embolie dans le xylème*). La rigidité de la paroi lui permet de moins se déformer à pression constante par rapport à une paroi plus souple (soit un changement de Module d'Young ; voir Tixier *et al.*, 2014). Si certaines études ont mis en évidence des différences de composition des parois de ponctuation (Kim *et al.*, 2011 ; Herbette *et al.*, 2015),

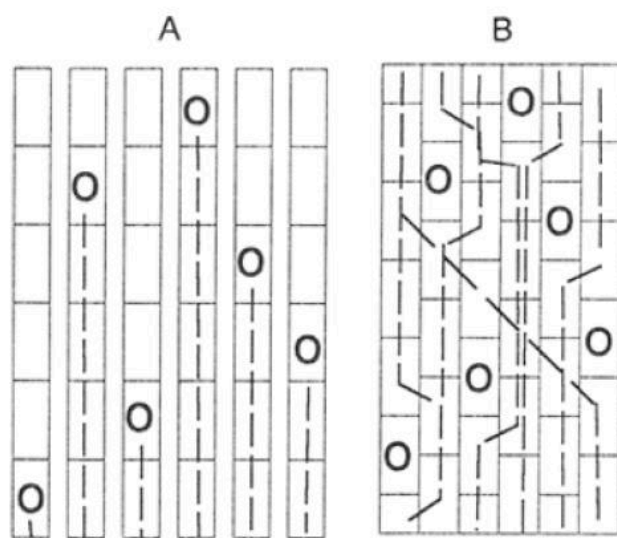


Figure 39 : Illustration de la redondance. Un ensemble de vaisseaux connectés subit de l'embolie (cercles). **A** : Sans redondance, la conductance est nulle. **B** : Des interconnexions entre vaisseaux permettent d'assurer le transport de l'eau avec un impact réduit de l'embolie sur la conductance (Tyree *et al.*, 1994).

la composition biochimique des parois et à fortiori sa variabilité reste peu explorée. De plus, le phénotypage des propriétés hydrauliques qui résultent d'un changement de composition reste une barrière méthodologique (Herbette *et al.*, 2015 ; Allario *et al.*, 2018).

Quant à la quantité de ponctuations, leur influence sur la résistance à la cavitation a été évoquée il y a quelques dizaines d'années par les auteurs (Tyree *et al.*, 1994 ; Choat *et al.* ; 2003) et a été formalisée récemment au travers de l'hypothèse de la *ponctuation faible* (ou *rare pit hypothesis*) (Christman *et al.*, 2009). D'après cette hypothèse, pour qu'un vaisseau soit embolisé, il suffit que l'air passe à travers un seul pore, celui avec le plus grand diamètre. Ainsi, le diamètre du plus gros pore est le seul qui compte pour expliquer la vulnérabilité à la cavitation d'un vaisseau. Augmenter la surface en ponctuations d'un vaisseau augmente le risque que ce vaisseau porte un pore de taille importante, donc augmente sa vulnérabilité. La résistance à la cavitation passerait donc par une diminution de la surface en ponctuations par vaisseau. Selon cette hypothèse, faire varier les paramètres qui régissent les dimensions des vaisseaux et l'organisation du xylème dans un sens qui tend à diminuer la surface de ponctuations par vaisseau permet de diminuer la vulnérabilité à la cavitation : longueur et diamètre des vaisseaux plus petits, surface de connexions entre vaisseaux réduite etc. Les validations expérimentales de cette hypothèse manquent. Si Christman *et al.* (2009) ont mesuré des diamètres de pores compatibles avec l'hypothèse chez plusieurs espèces du genre *Acer*, Lens *et al.* (2011) ont obtenu des résultats contredisant cette hypothèse lors de leurs mesures de résistance à la cavitation chez plusieurs espèces de ce même genre. Les nouvelles méthodes d'imagerie à rayons X permettraient une observation directe de la propagation de l'embolie dans le xylème en tenant compte de sa structure tridimensionnelle, mais la méthode est encore en développement (Ponomarenko *et al.*, 2017).

À ces hypothèses concernant la résistance à la cavitation il est important d'ajouter une considération supplémentaire : de nombreuses études mesurent la *PLC* (pourcentage de perte de conductance) en réponse à une diminution de potentiel hydrique. Ainsi, il est possible que les vaisseaux ne soient pas davantage résistants à la cavitation mais simplement que les événements de cavitation aient moins d'impact sur la diminution de conductance du xylème (Lens *et al.*, 2013). Par exemple, une plus forte interconnexion permet une redondance du système hydraulique et le flux pourra se maintenir en empruntant des voies alternatives (Fig. 39). Mais en contrepartie cela offre également davantage de voies d'accès à l'air pour envahir les tissus fonctionnels. Ce dilemme a été énoncé très tôt mais le tester expérimentalement est complexe (Tyree *et al.*, 1994). Il faut attendre des études récentes pour que les questions de l'architecture du xylème et de son rôle sur la résistance à la cavitation puissent être explorées.

Des travaux en modélisation permettent d'observer l'effet de la connectivité des vaisseaux sur la résistance du xylème à la cavitation, avec des résultats parfois contradictoires (Ewers *et al.*, 2007 ; Loepfe *et al.*, 2007 ; Martínez-Vilalta *et al.*, 2012). Un modèle publié récemment (Mrad *et al.*, 2018) tient compte des avancées de ces dernières années concernant le rôle de l'anatomie dans la propagation de l'embolie (Jansen *et al.*, 2009 ; Christman *et al.*, 2009 ; Lens *et al.*, 2011 ; Tixier *et al.*, 2014). Toutefois, dans ce dernier modèle le xylème représenté est modélisé sur un plan et ne tient donc pas compte de l'agencement tridimensionnel des vaisseaux.

Les déterminants évoqués jusqu'à présent peuvent servir d'hypothèse dans l'étude de la plasticité de la résistance à la cavitation du xylème de peuplier. Certains déterminants structuraux, pourtant évoqués par des auteurs, n'ont pas été détaillés dans le paragraphe ci-dessus. Par exemple, les chambres de ponctuations peuvent arborer des ornements qui empêchent les déformations trop importantes de la paroi et donc augmentent la résistance à la cavitation (Jansen *et al.*, 2004 ; Lens *et al.*, 2013). Mais les travaux portant sur les ornements comparent les espèces en les classant selon deux catégories (présence/absence d'ornements) (Jansen *et al.*, 2004 ; Medeiros *et al.*, 2019), ce qui n'est pas compatible avec une étude à l'échelle intra-spécifique. Mais surtout, les ponctuations du peuplier ne sont pas concernées car non ornementées (Metcalf & Chalk, 1950). De même, la surface intérieure des vaisseaux peut être sculptée et une étude a montré que la profondeur ou densité de ces sculptures étaient corrélées avec la résistance à la cavitation (Lens *et al.*, 2011). Cependant, comme pour les ornements des ponctuations, les vaisseaux du peuplier ne présentent pas de telles structures (Metcalf & Chalk, 1950). Enfin, des théories supplémentaires sont souvent évoquées mais du fait de l'absence de consensus scientifique les concernant, nous n'avons pas axé notre analyse de manière à les prendre en compte. Il s'agit de la résistance à l'implosion des vaisseaux (que nous avons déjà évoqué, voir partie III.3. *Formation de l'embolie : le premier évènement de cavitation*) (Hacke *et al.*, 2001b) et de la *fatigue* du xylème, ce qui nécessite qu'un premier évènement de cavitation ait eu lieu et ait été réparé (pour les controverses concernant la réparation de la cavitation, voir partie III.5. *Irréversibilité de l'embolie ?*) (Hacke *et al.*, 2001a).

2) Déterminants à l'échelle intra-spécifique

Il a été montré que dans le cas de la résistance à la cavitation, plasticité phénotypique et variabilité inter-spécifique étaient basées sur des mécanismes différents (Herbette & Cochard, 2010). Les données que l'on possède sont parcellaires dans le cas de la plasticité phénotypique :

dans une étude portant sur l'acclimatation en réponse à un stress hydrique chez *Populus tremula x alba*, Awad *et al.* (2010) trouvent une corrélation positive entre diamètre des vaisseaux et P_{50} . Cette corrélation a également été retrouvée par Plavcová & Hacke (2012) dans une étude sur *Populus trichocarpa x deltoides* acclimatés à différentes contraintes environnementales (stress hydrique, ombre, fertilisation) et par Matzner *et al.* (2019) dans une étude récente sur une espèce non ligneuse, le haricot, cette fois en réponse à l'acclimatation à des contraintes hydriques et mécaniques. Lors de l'acclimatation en réponse à une réduction de la lumière incidente de 80 % chez *Populus trichocarpa x deltoides*, Plavcová *et al.* (2011) associent une augmentation de la vulnérabilité du xylème à la cavitation à une diminution du diamètre et une augmentation de la longueur moyenne des vaisseaux. Une diminution de l'épaisseur de paroi de ponctuation est également observée dans la condition présentant la plus grande vulnérabilité. Ainsi, à l'image de ce qui a été fait à l'échelle inter-spécifique, une étude menée sur de nombreux traits à différents niveaux (ponctuation, vaisseau, xylème) est nécessaire pour avoir une vue d'ensemble sur les déterminants agissant dans le cas de la plasticité.

VII. Contexte et objectifs de la thèse

1) Une thèse inscrite dans un projet d'équipe

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des avancées récentes réalisées par l'équipe du front de science sur la question de la variabilité intra-spécifique de la résistance à la cavitation. Dans une étude de 2010 menée sur le peuplier, Awad *et al.* mettent en évidence que la résistance à la cavitation est un trait plastique qui peut être modifié en réponse aux conditions environnementales de croissance. Dans le même temps, Wortemann *et al.* (2011) à Clermont-Ferrand et Lamy *et al.* (2011) à Bordeaux profitent du cavitron, outil de phénotypage de la résistance à la cavitation à haut-débit inventé dans la décennie précédente, pour montrer qu'il n'y a pas de variabilité génétique sur ce trait. Ainsi, la variabilité de la résistance à la cavitation à l'échelle intra-spécifique serait surtout le fait de la plasticité phénotypique. La plasticité de la résistance à la cavitation est d'autant plus intéressante à étudier qu'Herbette & Cochard (2010) montrent qu'elle se base sur des mécanismes différents de la variabilité observée à l'échelle inter-spécifique.

Dans les années précédant le début de la thèse, la compréhension de la cavitation est affinée par l'équipe sur deux points :

Premièrement, le lien entre cavitation et mortalité est précisé. À l'échelle du fonctionnement de l'individu, Barigah *et al.* (2013) observent un point de non-retour lorsque la conductance est réduite de 90 % du fait de l'embolie chez les angiospermes, définissant un seuil à partir duquel la cavitation devient une menace pour la survie. À l'échelle d'un biome, une méta-analyse majeure réunissant une partie de la communauté de l'hydraulique des plantes (incluant les travaux de notre équipe) montre que les plantes sont en limite de fonctionnement hydraulique et que tous les biomes peuvent être sujets à la cavitation (Choat *et al.*, 2012). Ainsi, la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation est l'un des traits nécessaires au maintien des massifs forestiers soumis aux changements climatiques.

Deuxièmement, l'importance de la ponctuation dans la résistance à la cavitation est montrée à l'échelle inter-spécifique. Des paramètres, comme la qualité ou la quantité des ponctuations (Lens *et al.*, 2013), l'ultrastructure des ponctuations (Tixier *et al.*, 2014) ou encore les propriétés biochimiques de la paroi (Herbette *et al.*, 2015) influent sur la résistance à la cavitation. Mais dans le cas de la plasticité, les déterminants structuraux demeurent méconnus.

2) Contexte de la thèse

Cette thèse est cofinancée par l'Union européenne dans le cadre du Fonds Européen de Développement Régional (FEDER). Elle s'inscrit dans le défi « Symbiose » du Contrat-Plan État-Région (CPER) 2015-2020, à destination de la région Auvergne. Le but de ce projet est de caractériser au niveau le plus fin la tolérance des plantes à la sécheresse et de mettre en place les éléments d'une démarche de biologie translationnelle avec un transfert des outils et des informations vers une espèce structurante et d'intérêt agronomique, le blé. Ce projet finance deux allocations de recherches post-doctorales et la présente thèse.

Cette thèse se déroule au sein de l'UMR 547 PIAF (Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre en Environnement Fluctuant) – porté par les instituts INRA et Université Clermont-Auvergne – en intégration au sein de l'équipe SurEau (Sûreté Hydraulique).

3) Objectifs de la thèse

La connaissance préalable des bases structurelles de plasticité de la résistance à la cavitation est nécessaire pour rechercher les déterminants génétiques par approche transgénique (Allario *et al.*, 2018). La recherche des bases anatomiques a été menée à trois niveaux : l'organisation du xylème, les dimensions des vaisseaux et l'ultrastructure des ponctuations ce

qui a nécessité d'exploiter différentes techniques de microscopie (M.E.T., M.E.B. et optique). Nous avons focalisé l'étude sur les paramètres ayant un impact sur la qualité ou la quantité de productions. Cette analyse a été complétée par la recherche de déterminants à l'échelle cellulaire, en nous appuyant sur une méthode non invasive de visualisation directe de l'embolie par microtomographie à rayons X développée récemment (Cochard *et al.*, 2015). Les résultats de cette partie constituent le premier chapitre de cette thèse.

L'acclimatation à la sécheresse ne reposant pas uniquement sur la variabilité de la résistance à la cavitation du xylème de tige, nous nous sommes intéressés à la plasticité de différents traits impliqués dans la réponse à la sécheresse, notamment des traits foliaires. Les avancées significatives de ces dernières années des méthodes de phénotypage permettent de choisir des traits peu explorés pour l'étude de l'acclimatation. C'est notamment le cas en ce qui concerne la dynamique des pertes en eau à travers les pertes minimales, qui ont pu être mesurées grâce à un prototype développé spécifiquement pour ce type de mesures au sein de l'équipe (Cartailler *et al.*, 2018 ; Billon *et al.*, soumis). C'est également le cas de la mesure de la vulnérabilité à la cavitation du xylème de feuilles, pour laquelle nous avons pu nous appuyer sur les travaux d'une équipe australienne qui a mis au point une technique permettant de visualiser l'embolie dans cet organe via une méthode non invasive (Brodrigg 2016). J'ai participé à déployer cette technique au sein du laboratoire à Clermont-Ferrand. Il en résulte pour cette thèse une étude de la variabilité d'une combinaison de traits inédite dans le cas de l'étude de l'acclimatation à la sécheresse. L'influence de chacun de ces traits dans la réponse à la sécheresse a été évaluée en s'appuyant sur un modèle mécaniste qui simule le fonctionnement des plantes en situation de sécheresse extrême et qui a été publié récemment (Martin-StPaul *et al.*, 2017). Ces résultats seront présentés dans le second chapitre de cette thèse.

Enfin, notre équipe a collaboré à montrer que la résistance à la cavitation des herbacées est au moins équivalente à celle des ligneux, aussi bien en matière de résistance moyenne qu'en matière de gamme de variations (Lens *et al.*, 2016). Cette observation est importante et n'est pas sans poser des questions pour certaines espèces cultivées, en particulier pour le blé. Le xylème des herbacées étant organisé de façon totalement différente de celui des espèces ligneuses, la question des mécanismes de la plasticité de la résistance à la cavitation se pose également avec des mécanismes potentiellement différents de ceux observés chez les arbres. Aussi, la recherche de l'existence de plasticité chez le blé sera l'un des objectifs de la thèse. Pour cela, nous pourrions nous appuyer sur une collaboration avec l'UMR Génétique, Diversité, Écophysiologie des Céréales (GDEC) et un accès à la Plateforme de Phénotypage au Champ

sous Contraintes Climatiques (Phéno3C). Ces résultats seront mis en perspective avec les résultats du premier chapitre.

Les résultats des deux chapitres seront également discutés au regard des questions qui nous semblent les plus intéressantes. La question des différences entre les bases structurelles de la résistance à la cavitation aux échelles inter- et intra-spécifiques, et à l'échelle du vaisseau sera abordée. Nous développerons également les implications écologiques qu'entraînent nos résultats.

Chapitre 1 : Déterminants structuraux de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation

I. Résumé de l'article soumis à *Annals of Botany*.

Il y a un besoin de connaissances sur les variations des traits de résistance à la sécheresse pour prédire le potentiel d'acclimatation des arbres aux événements de sécheresses extrêmes futurs. La vulnérabilité à la cavitation (VC) du xylème est un paramètre-clé lié à ces sécheresses, et sa variabilité phénotypique dépend surtout de la plasticité environnementale. Nous avons recherché les déterminants structuraux contrôlant la plasticité de la VC, en se concentrant sur les éléments-clés impliqués dans l'entrée d'une bulle d'air dans un vaisseau, et plus spécifiquement sur les ponctuations inter-vaisseaux. Des peupliers (*Populus tremula x alba*) mis en croissance dans des conditions contrastées pour la disponibilité en eau et l'exposition à la lumière ont montré jusqu'à 0,76 MPa de différences de VC. Les changements structuraux ont été caractérisés à trois niveaux, desquels dépendent les ponctuations : l'organisation du xylème, les dimensions des vaisseaux et la structure des ponctuations inter-vaisseaux. Cette caractérisation a été effectuée en utilisant différentes techniques de microscopie (M.E.T., M.E.B., optique). La microtomographie à rayons X a permis l'observation de la vulnérabilité du vaisseau et de tester des relations entre des traits structuraux et la VC à l'intérieur du xylème. L'ultrastructure des ponctuations et leur comportement mécanique n'ont pas été modifiés en fonction de la VC, tandis que les dimensions du vaisseau ont augmenté et l'indice de groupement et la fraction de paroi en contact entre vaisseaux ont diminué avec la VC. Ces résultats sont valables lorsque l'on compare des arbres entre eux ou lorsque l'on compare des vaisseaux dans un xylème. Cela montre que la plasticité de la VC a lieu par des changements de surface de ponctuations et de connectivité des vaisseaux davantage que par des changements à l'échelle du vaisseau.

Note : les figures dont la légende est en français servent à illustrer cette thèse mais ne figurent pas dans l'article soumis.

1 **Original article**

2 **Plasticity of the xylem vulnerability to cavitation relies on xylem and vessel properties**
3 **rather than on pit structure**

4 Cédric Lemaire ¹, Yann Quilichini ², Nicole Brunel-Michac ¹, Jérémie Santini ², Liliane Berti
5 ², Romain Souchal ¹, Julien Cartailier ¹, Pierre Conchon ¹, Éric Badel ¹ & Stéphane Herbette ^{1*}.

6 ¹ Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

7 ² UMR 6134 SPE, CNRS-Università di Corsica, 20250 Corti, France

8 **Running title.** Structural determinants of plasticity of cavitation resistance

9 **Corresponding author:** Stephane.Herbette@uca.fr

10 **II. Abstract.**

- 11 • *Background and Aims* Knowledge on variations of drought resistance traits are needed
12 to predict the potential of trees to acclimate to coming severe drought events. Xylem
13 vulnerability to cavitation (VC) is a key parameter related to such droughts, and its
14 phenotypic variability relies mainly on environmental plasticity. We investigated the
15 structural determinants controlling the VC plasticity, focusing on the key elements
16 involved in the air bubble entry in a vessel, especially the inter-vessel pits.
- 17 • *Methods* Poplar saplings (*Populus tremula x alba*) grown in contrasted water
18 availability or light exposure exhibited differences in VC in a range of 0.76 MPa. We
19 then characterized the structural changes at three levels on which pit properties relate:
20 xylem organization, vessel dimensions and inter-vessel pit structure, using different
21 microscopy techniques (TEM, SEM, light). X-ray microtomography analysis allowed
22 observing the vessel vulnerability and testing some of the relationships between
23 structural traits and VC inside the xylem.
- 24 • *Key result* The ultrastructure of pit and its mechanical behavior did not change, whereas
25 the vessel dimensions increased with VC and the grouping index and fraction of inter-
26 vessel cell wall decreased with VC. These findings holds when comparing trees or when
27 comparing vessels inside the xylem.
- 28 • *Conclusion* These results evidenced that plasticity of VC occurs through changes in the
29 pit area and vessel connectivity rather than at the pit level.

30 **Keywords.** Cavitation, drought, embolism, hydraulic, pit, plasticity, poplar, vessel, xylem.

31

III. INTRODUCTION

According to the *cohesion-tension* theory (Steudle, 2001), the water columns in the xylem are under tension, a metastable state. When tension forces increase during droughts, the water columns are more prone to break, because of a cavitation event: vapour bubbles invade the impacted vessels and hence make them embolized as they are not functional anymore, leading to a loss of xylem conductance. When the loss of conductance reaches a high threshold limit, the above organs are not supplied with water anymore leading to death (Barigah *et al.*, 2013). Thus, xylem vulnerability to cavitation (VC) is a key component in drought resistance (Choat *et al.*, 2012).

A global analysis pointed out the narrow hydraulic safety margin at which woody species usually operate (Choat *et al.*, 2012); their water potential being near those inducing cavitation. Hence, the survival during drought events would depend on VC and its plasticity to acclimate to new environmental conditions in a context of climate changes. Investigating the VC plasticity will help in evaluating the potential of trees to adapt to coming severe droughts. The pressure that induces 50 % of loss conductance in the xylem (P_{50}) is the most widely used trait to quantify VC at the organ or individual level and therefore comparing samples (Cochard *et al.*, 2013). Variability of P_{50} has been shown within different tree species (Martínez-Vilalta *et al.*, 2009; Herbette *et al.*, 2010) despite a rather low genetic variability was measured for this trait in both natural populations (Lamy *et al.*, 2011, Wortemann *et al.*, 2011) and cultivated species (Jinagool *et al.*, 2015; 2018). This trait would be genetically canalized (Lamy *et al.*, 2012) such that it varies mainly via plasticity due to environmental factors (Herbette *et al.*, 2010). Plasticity of VC was reported mainly under water stress, with wood formed under drier conditions that tends to be less vulnerable (Awad *et al.*, 2010; Fichot *et al.*, 2010; Plavcová and Hacke, 2012). Other conditions such as shade or fertilization were associated to an increase in VC (Cooke *et*

56 *al.*, 2005; Barigah *et al.*, 2006; Plavcová and Hacke, 2012). However, information is scarce on
57 the determinants that control the VC plasticity. The structural determinants need to be
58 deciphered first, before searching for their genetic control, as it can be complex to decipher the
59 role of candidate genes (Allario *et al.*, 2018).

60 In angiosperms, water flows through the xylem in conduits such as the vessels that connect by
61 bordered pits. These pits are cavities in the secondary cell wall that allow the inter-vessel water
62 flow while they prevent air seeding from air-filled vessels to water-filled ones. Inter-vessel pits
63 have been identified as the key structures for VC (Lens *et al.*, 2013). Thus, we assume that the
64 VC acclimation to environmental conditions implies changes in the pit properties. The pit
65 properties, in terms of quality and quantity, that relate to VC are organized at three anatomical
66 levels: xylem, vessel and pit (Lens *et al.*, 2013). The research of structural determinants for the
67 VC plasticity must be achieved at these three levels. At the tissue level, the pit number depends
68 on the connectivity between vessels – evaluated via the grouping index (Lens *et al.*, 2011). At
69 the vessel level, Zimmermann and Jeje (1981) pointed out that the hydraulic vulnerability could
70 be related to the vessel volume that varies depending on both their diameter (Tyree *et al.*, 1994)
71 and their length (Scholz *et al.*, 2013 *a*). The importance of the pit ultrastructure in VC has been
72 evidenced in several studies (*e.g.* Lens *et al.*, 2011; Tixier *et al.*, 2014), especially the pit
73 membrane thickness (Jansen *et al.*, 2009). The relationship between VC and pit properties has
74 been intensively studied at the inter-specific level, whereas the determinants of VC plasticity
75 remains unclear.

76 In this work, we investigated the plasticity of young poplars (*Populus tremula x alba*) and the
77 relationship with the xylem hydraulic structure at different anatomical levels. We grew sapling
78 poplar clones under three contrasted environmental conditions for two factors (water
79 availability and light exposure) known to induce VC plasticity. Then, their xylem anatomy was
80 analysed in relation to the changes in VC using different approaches. Transmission Electron

Microscopy (TEM) allowed investigations on the bordered pit ultrastructure and their deduced mechanical properties. Parameters related to the pit-field were measured using Scanning Electron Microscopy (SEM). We also measured parameters related to vessel dimensions and vessel connectivity using light microscopy and silicon injections. Finally, a local approach using direct observation of embolism spreading at the cellular level via X-ray microtomography allowed us to assay some relationships between the hydraulic network structure and the VC inside the xylem.

IV. MATERIAL AND METHODS

1) Plant material and growth conditions

Plant Material: Saplings of hybrid poplar (*Populus tremula x alba* clone INRA 717-1B4) were multiplied clonally *in vitro* on Murashige and Skoog medium on December 2016. Plantlets were grown in hydroponic solution on February 2017 in a controlled environment room: 16 h day-light at 21-22 °C, 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 18-19 °C night, at 70 $\pm$ 10 % relative humidity. On March 2017, plants were transferred in 1 Litre pots filled with potting soil (Humustar Terreaux, Champeix, France) with a composition of 25 % brown peat, 40 % blond peat and 35 % pine barkdust. The pots were placed in a greenhouse at the INRA research station of Clermont-Ferrand, France (site of Crouël; N 45°77', E 3°14'; 300 m *a.s.l.*). After 20 days, plants were transferred in 10 L pots filled with potting soil. Pots were regularly watered at soil field capacity. Each pot weighted 6.4 $\pm$ 0.4 kg. Ten days later, the new specific experimental growth conditions were applied (see next). After one month of growth, stems were cut at 50 cm height. The growth of a new apical bud occurred in May 2017, and any additional bud was removed. Thus, a single stem completely grew under the new environmental conditions.

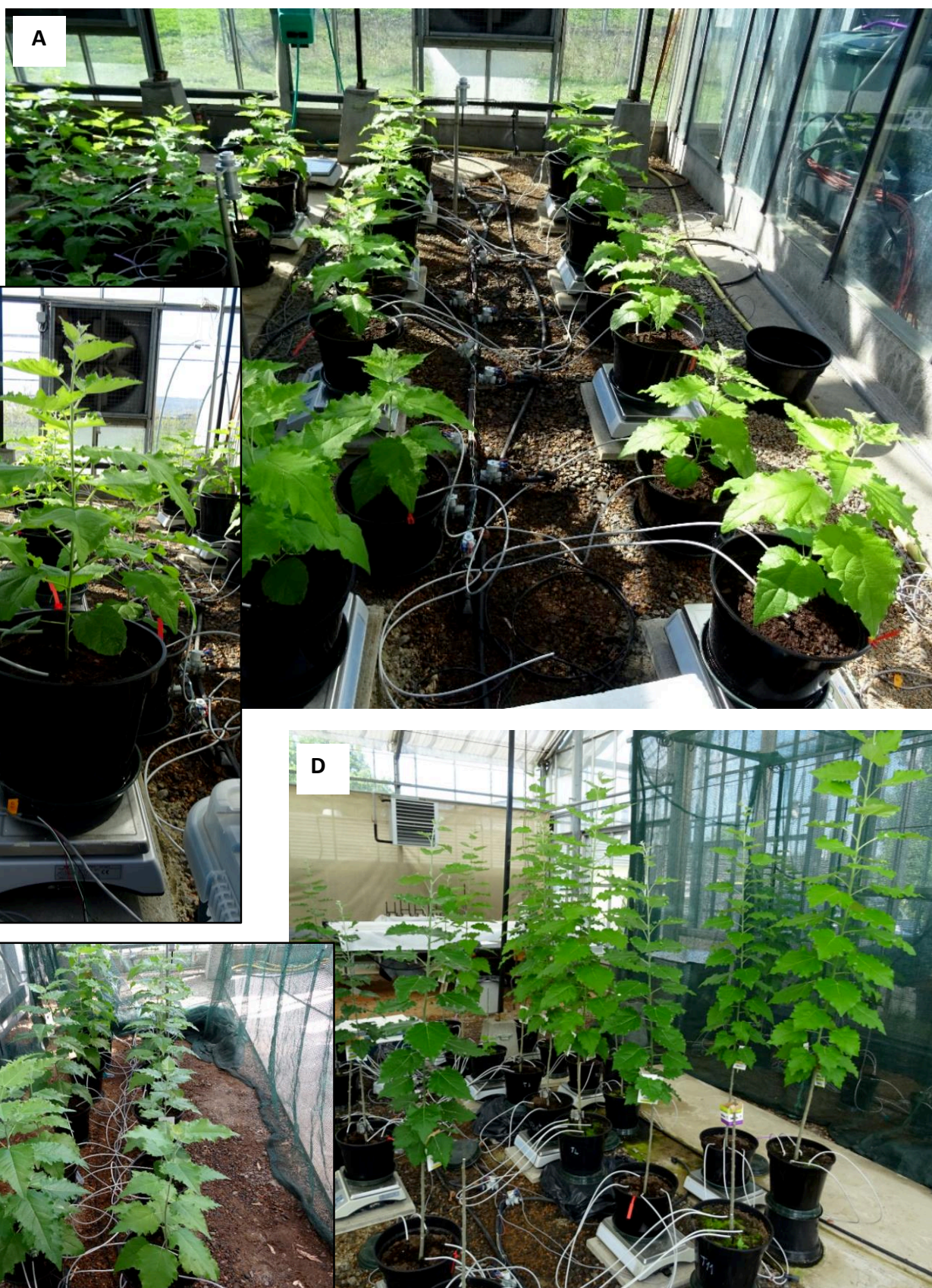


Figure 40 : Dispositif expérimental en serre. **A** : vue du dispositif lors de la mise en croissance des plants. **B** : vue à la même date d'un plant LD et de la balance permettant de piloter son irrigation. **C** : vue trois semaines plus tard des plants en condition SW. **D** : vue du dispositif le jour de la récolte.

Experimental setup: Plants were split in three groups submitted to different growth conditions (Fig. 40): (i) « LW » (full **L**ight, well-**W**atered), plants grew under full Sun light and watered at soil field capacity; (ii) « LD » (full **L**ight, **D**roughted), plants grew under full Sun light and watered at only 25-30 % of soil field capacity; (iii) « SW » (**S**hade, well-**W**atered) plants shaded by a shade-house that intercepts 30 % of incident light and watered at soil field capacity. For the nine LD plants, an irrigation at 25-30 % of soil field capacity was kept constant in each pot individually using balances and valves for irrigation as described in Niez *et al.* (2019). We measured the light interception by the shade house by comparison between the outside and inside light intensities; two sensors (PAR/CBE 80, Solems, Palaiseau, France) were placed inside the shade house and two sensors were placed outside. Both recorded during two months. The level of water stress was set to be the most restrictive while allowing growth to produce acclimatized xylem and enough material plant for further analyses. The stem diameter was continuously measured using a LVDT sensor (Linear Variable Differential Transformer) on 3 LD, 2 LW, 3 SW plants. Plant height was also measured regularly using a tape measure. Predawn water potential (Ψ_{pd}) were measured on all plants 1 hour before the sunrise using a pressure chamber (1505D, PMS Instrument, Albany, OR, USA) the day before sampling (Scholender *et al.*, 1965). The midday water potential (Ψ_{mid}) was measured at the solar noon, between 12h00 and 14h00 the same day.

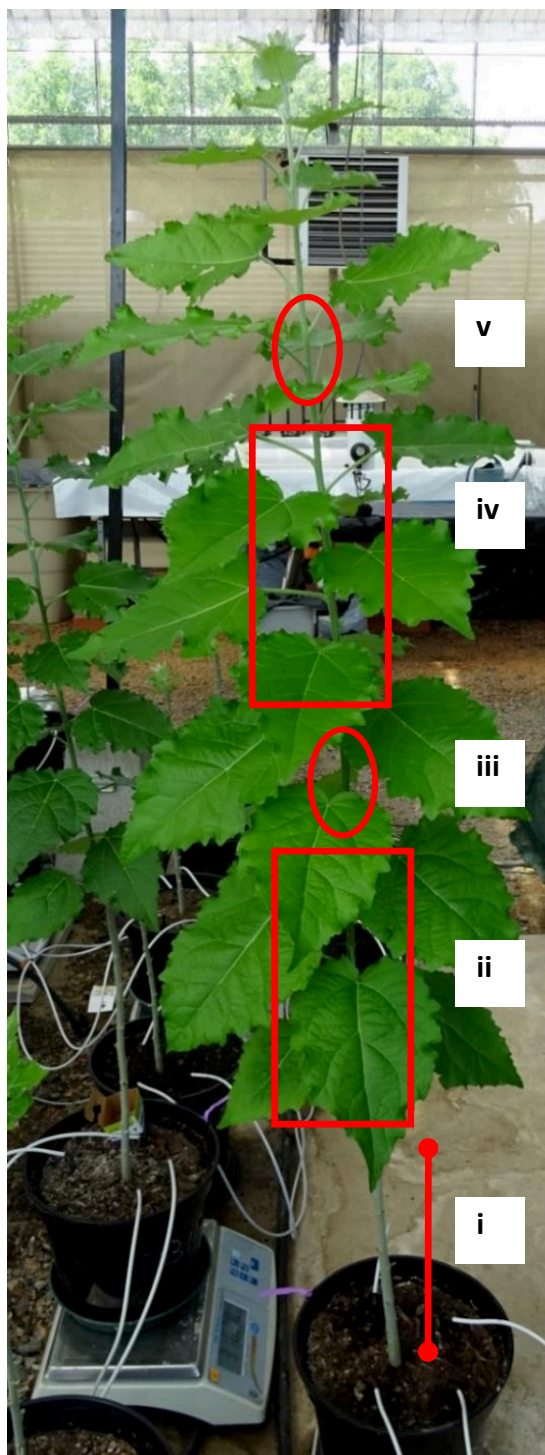
Sampling protocol: the sampling was performed on 28 August 2017. Plants were cut at 20 cm height. The plant shoot was immersed underwater. Then, the following stem segments were sampled, from basal to apical direction (Fig. 41):

- i) the 30 cm long basal part of the stem was removed because it was not fully grown under acclimating conditions;

Figure 41 : Plan d'échantillonnage pour chacun des individus.

- i)** segment de 50 cm, non utilisé ;
- ii)** segment de 50 cm, utilisé pour mesure de P_{50} au cavitron puis mesure longueurs de vaisseaux par injection de silicone ;
- iii)** segment de 6 cm, utilisé pour analyses en microscopie et subdivisé en trois échantillons : un échantillon de 4 cm pour observation en MEB, deux échantillons de 1 cm pour observation en MET et en microscopie optique ;
- iv)** segment de 50 cm, utilisé pour mesure de conductivité hydraulique spécifique puis pour mesure de P_{50} ;
- v)** segment de 10 cm, utilisé pour mesure d'embolie native.

Lorsque la croissance du plant ne le permettait pas, l'échantillon iv) n'a pas été prélevé.



ii) the first 50 cm long of the newly developed stem under the acclimation conditions was wrapped in wet paper in a plastic bag and stored at 4 °C before they were used for measurements of VC and vessel length;

iii) the above segment of 6 cm long was devoted to microscopy analyses. It was split into three subsamples using a razor blade: two segments of 1 cm long were immersed in Karnovsky's fixative solution and stored at 4 °C for light microscopy and TEM (following Li *et al.*, 2016), and a third segment of 4 cm long was immersed in a glutaraldehyde 3 % solution and stored at 4 °C for SEM;

iv) when the stem was long enough, an above segment of 50 cm long was wrapped in wet paper in a plastic bag, and stored at 4 °C for measurements of specific conductivity (K_s) and for additional measurements of VC;

v) the last 10 cm long was kept wrapped in humid paper for a native embolism measurement performed during the sampling day.

Leaves were sampled under water and the mean leaf area (LA) per plant was measured in the day using an area-meter (Li-3100c, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

After the sampling, plants were kept in the greenhouse, during the winter 2017. On March 2018, they started growing, still under the same environmental conditions as described above, and on July 2018 we performed a new sample collection: plants were cut at 25 cm height. Then the 30 cm long basal part of the stem were cut underwater. A 50 cm long sample was wrapped in wet paper and stored in a plastic bag at 4 °C for measurements of specific conductivity (K_s).

2) Hydraulic traits:

Vulnerability to cavitation. The 50 cm long stem segment was cut underwater at 43 cm long using a razor blade. Then, the VC was assessed using the Cavitron technique (Cochard, 2002; Cochard *et al.*, 2005) using a centrifuge (Sorvall RC3C, Thermo-Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA). The centrifugal forces increase water tension in branch segment and allows at the same time measurement of loss conductance using a reference ionic solution of 10 mM KCl and 1 mM CaCl₂ (Cochard *et al.*, 2009). A vulnerability curve was built by plotting the percentage loss xylem conductance (*PLC*) vs. xylem water pressure (*P*). A sigmoidal function was used to fit each curve using the equation (1) (Pammenter and Willigen, 1998).

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{\frac{S(P-P_{50})}{25}}} \quad (1)$$

Where *P*₅₀ is the pressure causing 50 % loss of conductance, and *S* the slope of the curve at this point. The VC was built.

Specific conductivity. stem segments of 50 cm long were cut underwater at a length (*L*_{stem}) of 40 cm long using a razor blade for LD (n = 8), LW (n = 9) and SW (n = 9) groups. The apical end of the sample was sealed to a tubing system (polytetrafluoroethylene film) and plugged to an embolism meter (Xyl'em, Bronkhorst, Montigny-lès-Cormeilles, France). The initial conductance (*K*_i) is then measured under low pressure (2 to 7 kPa). The xylem area of the apical end *A*_x was measured: a scanner (V800, Epson, Nagano, Japan) recorded the cross section of the sample and the area *A*_x was measured using the ImageJ software (version v.1.52c) (Schneider *et al.*, 2012). The Specific Conductivity *K*_s was defined according to equation (2).

$$K_s = \frac{K_i \times L_{stem}}{A_x} \quad (2)$$

Native Embolism. The native embolism of each 10 cm long stem segment was measured the day of their harvest for LD (n = 9), LW (n = 5) and SW (n = 6). Each sample was cut underwater using a razor blade to become 8 cm long. Then, the initial conductance (*K*_i) was measured under low pressure (2 to 7 kPa) with the same method as specific conductivity. Then, the sample was flushed with water two times for 5 min under high pressure (0.1 to 0.2 MPa) in order to remove embolism. A new measurement of conductance without embolism gives the maximum conductance (*K*_{max}) of the sample. The native embolism was calculated according to the equation (3).

Table 1: Definitions of the symbols

Symbol	Definition	Unit
LA	Mean leaf area	cm^2
A_p	Mean total pit area per vessel	mm^2
A_v	Mean area per vessel	mm^2
D_a	Mean pit aperture diameter	μm
D_p	Mean pit diameter	μm
D_v	Mean vessel diameter	μm
D_v^*	Vessel diameter	μm
F_c	Mean contact fraction: mean membrane length in contact with other vessels over total membrane length	%
F_c^*	Vessel contact fraction: for each vessel, fraction of membrane length in contact with other vessels	%
F_p	Mean pit fraction: mean total pit area in contact with other vessels over total vessel area	%
F_{pf}	Mean pit-field fraction: pit area over inter-vessel area	%
GI	Vessel grouping index	-
GS	Vessel group size	-
L_p	Mean pit chamber depth	μm
L_v	Median vessel length	μm
P_c	Pressure inducing cavitation in a vessel	MPa
SI	Vessel solitary index	%
T_m	Mean pit membrane thickness	μm
ϵ	Maximum membrane strain	-

$$Native\ Embolism = (1 - \frac{K_i}{K_{max}}) \times 100 \quad (3)$$

3) Light microscopy

Samples of 1 cm long were cut into 3 x 3 mm² blocks that were dehydrated in an ethanol series (50, 70, 80, 95 %) and embedded in LR White medium. Transverse slices of 2 to 3 µm thick were cut using an ultramicrotome (Om U2, Reichert, Vienna, Austria). Sections were stained with 1 % (w/v) toluidine blue, washed 4 times with water and mounted in Eukitt (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Images were processed using a microscope (Zeiss Axio Observer Z1), a digital camera (AxioCam MRc) and Zen imaging software system (Zeiss, Jena, Germany). Image analyses were performed using ImageJ software (Fig. 42). The vessel diameter (D_v) was estimated as the diameter of the circle having the same area as the vessel lumen (for the symbols, see Table 1). The contact fraction (F_c) was measured for each vessel as ratio of membrane length shared with other vessels over the vessel perimeter. The grouping index (GI) was measured as the mean number of vessels per group and the solitary index (SI) as the ratio of the number of solitary vessels to the total number of vessels. These parameters were measured for each individual slice containing a mean of 850 vessels, for LD (n = 9), LW (n = 5) and SW (n = 6) groups.

4) Vessel length

The vessel length was measured by the silicon injection method (Sperry *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2013 *b*) on the samples used for Cavitron technique, after five months of drying at room temperature. A fluorescent optical brightener (CAS number: 7128-64-5, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) was mixed in chloroform (1 % w/w) and added to a volume of silicon (BLUESIL RTV-141 A, Bluestar Silicones, Lyon, France) with a proportion of one drop of solution per gram of silicon. A Silicone hardener (BLUESIL RTV-141 B, Bluestar Silicones)

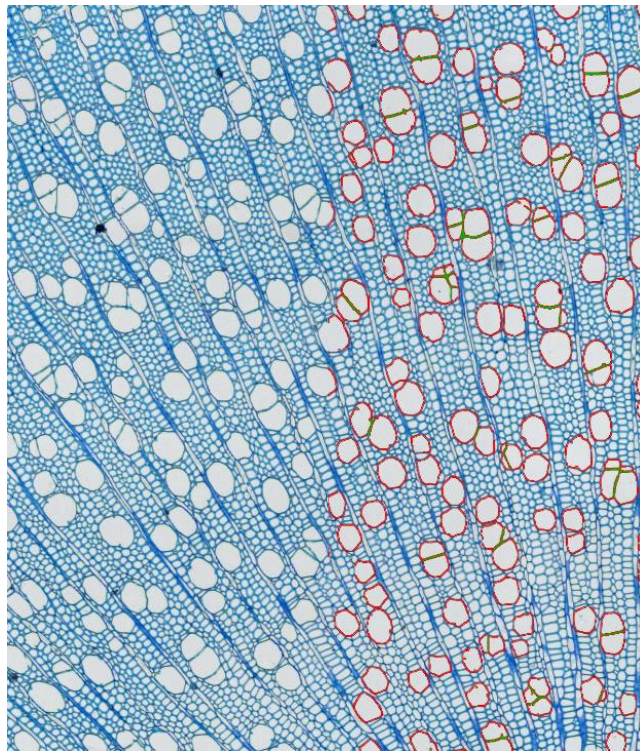


Figure 42 : Observation d'un xylème de peuplier en microscopie optique. Sur la partie droite de l'image, les résultats de l'analyse d'images ont été affichés, faisant ressortir les vaisseaux en rouge et les parois partagées entre plusieurs vaisseaux en vert.

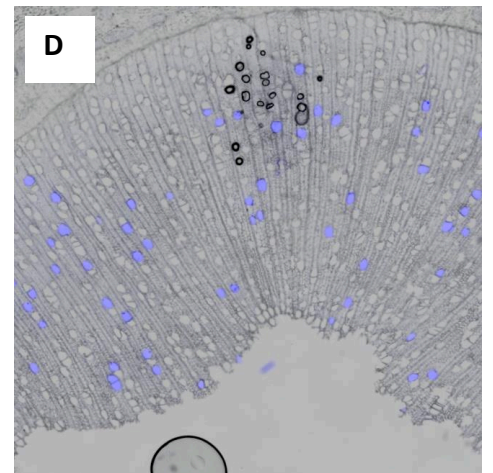
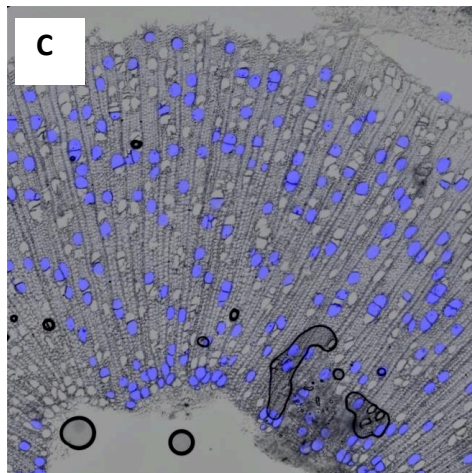
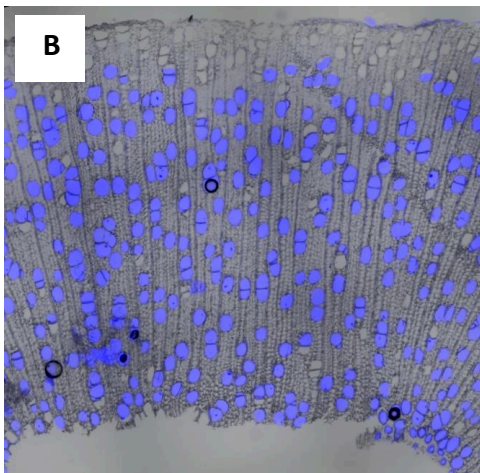


Figure 43 : Mesure de longueur de vaisseaux par méthode d'injection de silicone. De la silicone mélangée à un agent fluorescent a été injectée dans le segment de tige. **A** : positions des coupes transversales : première coupe à 0,5 cm du point d'injection de silicone (à gauche) puis tous les 2 cm. **B**, **C**, **D** : observation des coupes transversales en microscopie à fluorescence des coupes situées à des distances de 0,5 (**B**), 8,5 (**C**) et 14,5 cm (**D**) du point d'injection. On constate la diminution de la part de vaisseaux fluorescents à mesure que l'on s'éloigne du point d'injection.

was added to the mixture in 1:10 proportion. The mixture was then injected under pressure (30 to 40 kPa) basipetally in the stem sample using a pressure chamber during at least 8 hours. After silicone hardening (3 days at room temperature), the samples were cut 5 mm far from the injection point; then every 20 mm. For each segment, one 25 µm thick slice was cut using a rotary microtome (RM2165, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Cross section slices were dyed with Astra Blue and mounted with a Lugol's iodine solution.

Images were obtained using a fluorescence microscope (Axio Observer Z1) equipped with a 300 to 400 nm band pass excitation filter, a digital camera (AxioCam 506), Zen imaging software system (Zeiss, Jena, Germany) and analysed using the ImageJ software. Fluorescent vessels highlighted the open vessels, while white light allowed counting the total number of vessels (Fig. 43). The decrease of the ratio of open vessels (N_x) (*i.e.* fluorescent vessels) to the total number of vessels (N_0) over the distance (x) from the end of the sample followed a Weibull function (Equation 4) where k is the best-fit extinction coefficient (Cohen *et al.*, 2003).

$$N_x = N_0 \times e^{-kx} \quad (4)$$

The fraction of conduits of length x ($P(x)$) is given by x/N_0 times the second derivative of equation (4) (Wheeler *et al.*, 2005):

$$P(x) = x \times k^2 \times e^{-kx} \quad (5)$$

$$f(x) = \int_0^{L_v} x k^2 \cdot e^{-kx} dx \quad (6)$$

Equation (6) gives the continuous cumulative function of vessel length probability. When this cumulative function is equal to 0.5, this gives the median value of vessel length (L_v) (equation 7).

$$f(L_v) = -(kL_v + 1) \cdot e^{-kL_v} + 1 = 0.5 \quad (7)$$

The solution of the equation (7) gives the median vessel length $L_v = 1.678/k$. This vessel length was estimated for 7 LD, 5 LW and 5 SW stem samples.

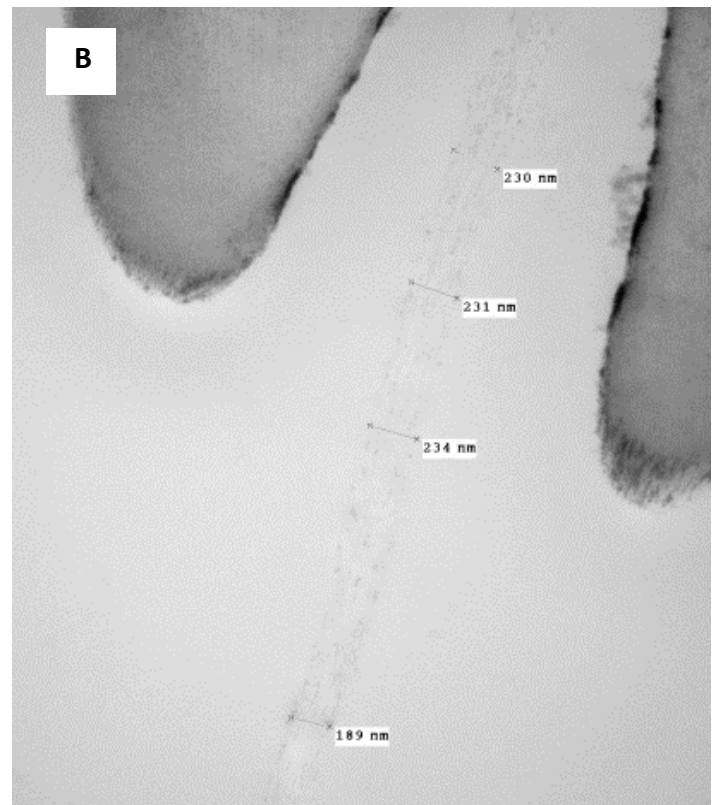
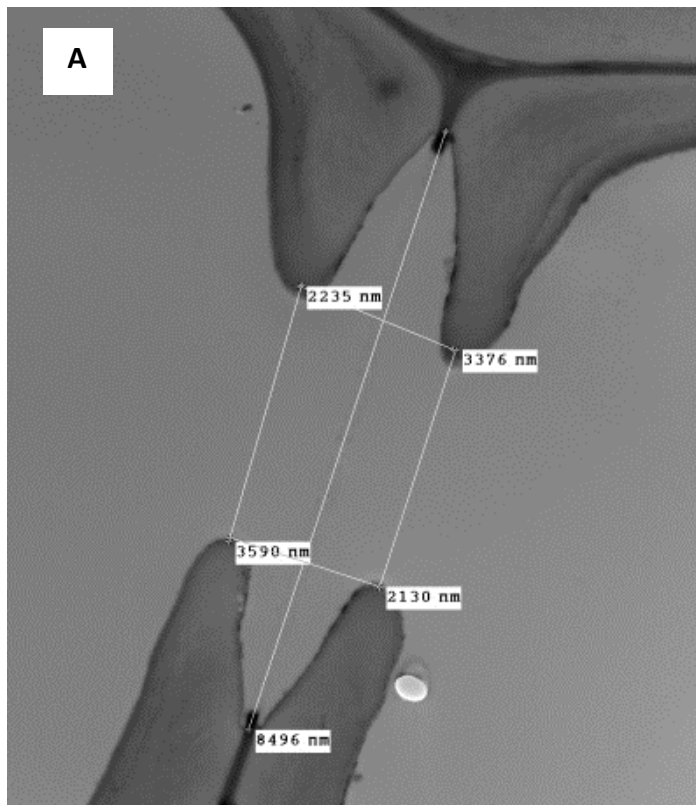


Figure 44 : Observation d'une ponctuation en microscopie électronique à transmission sur une coupe transversale. A : Mesure du diamètre de la ponctuation, des diamètres d'ouvertures de la ponctuation et de la profondeur de la chambre de ponctuation. B : Mesures de l'épaisseur de la paroi de ponctuation.

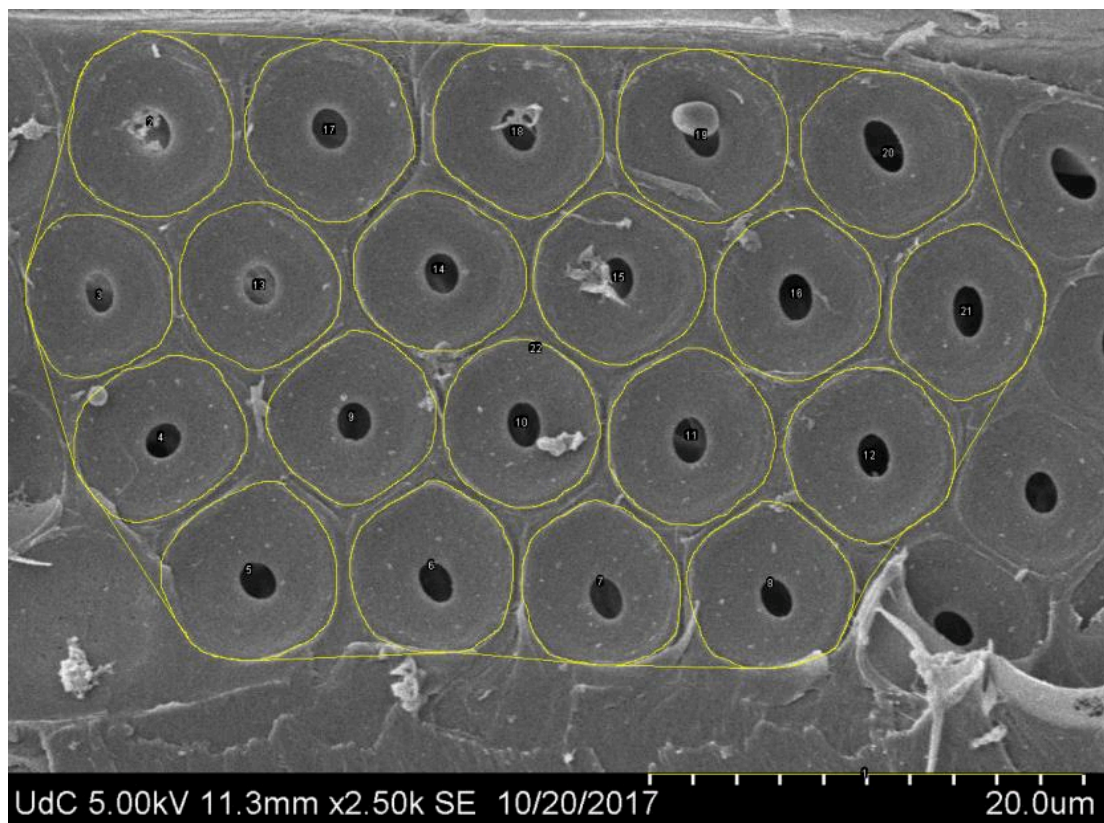


Figure 45 : Observation d'un champ de ponctuations en microscopie électronique à balayage sur une coupe longitudinale. Les contours des ponctuations ainsi que les limites du champ de ponctuation ont été réalisés manuellement.

5) Transmission Electron Microscopy

Samples of 1 cm long, Previously fixed in Karnovsky's fixative solution and stored at 4 °C, were cut into 2 x 4 mm² blocks that were dehydrated in an ethanol series (25, 50, 70, 100, 100 %) and embedded in Epoxy resin using Epoxy medium kit (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Then, ultra-thin sections (60-90 nm) were cut using an ultramicrotome (PowerTome PC, RMC Boeckeler, Tucson, AZ, USA). The sections were placed on 200- and 300-mesh copper grids and stained with contrast solutions: UranylLess (Delta Microscopies, Mauressac, France) and lead citrate. Sections were observed using a transmission electron microscope (H-7650, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at a voltage of 80 kV. Measurements of pit features were performed on images with pits showing two apertures (Fig. 34, A; Fig. 44). Pits were characterized for their diameter (D_p), their aperture diameter (D_a), their depth of pit chamber (L_p) and their membrane thickness (T_m). For each pit, D_a was the mean of two measurements while L_p and T_m were the mean of four measurements. Pit features were measured for five individual trees for each growth condition, with at least 10 pits measured per individual tree.

6) Scanning Electron Microscopy

Previously fixed in glutaraldehyde 3 % fixative solution and stored at 4 °C, samples of 4 cm long were cut in a longitudinal way and were dehydrated in an ethanol series (30, 50, 75, 100 %). After dehydration, samples were immersed in a 1:1 solution hexamethyldisilazane (HMDS) + ethanol 100 % for 30 min and immersed in pure HDMS for 30 min. After air drying overnight under a hood, the samples were mounted on aluminium stubs with carbon double-sided adhesive disks, coated with gold/palladium in a sputter coater (SC7640, Quorum Technologies Ltd, Newhaven, U.K.), and finally observed using a scanning electron microscope (S-3400N , Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at a voltage of

5 kV. The portion of area covered by bordered pits in each inter-vessel pit-field (F_{pf}) was measured using the ImageJ software (Fig. 45). Five samples were measured per growth condition, and seven pit-fields were characterized per sample.

7) Calculation of supplemental traits

Theoretical conductivities (K_h) of all samples characterized for light microscopy were calculated according to Scholtz *et al.* (2013 *b*) and converted into $\text{mol.s}^{-1}.\text{MPa}^{-1}.\text{m}^{-1}$ (equation 8).

$$K_h = \frac{\sum_{128} \frac{\pi D_v^4}{A_x} \eta}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \times \frac{\rho}{M_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (8)$$

with η the viscosity index of water ($1.002 \times 10^{-9} \text{ m}^4.\text{MPa}^{-1}.\text{s}^{-1}$ at 20 °C), ρ the density of water ($9.982 \times 10^5 \text{ g.m}^{-3}$), $M_{\text{H}_2\text{O}}$ the water molar mass (18.0 g.mol^{-1}) and A_x the xylem area.

The pit fraction (F_p) was defined for five individual for each growth condition as the product of the pit-field fraction (F_{pf}) and contact fraction (F_c) (Equation 9).

$$F_p = F_{\text{pf}} \times F_c \quad (9)$$

The vessel area (A_v) was calculated for 7 LD, 5 LW and 5 SW individuals the area of a cylinder according to the equation (10).

$$A_v = D_v \times L_v \times \pi + 2\pi \left(\frac{D_v}{2}\right)^2 \quad (10)$$

The pit area per vessel (A_p) was calculated for 4 LD, 5 LW and 4 SW individuals as the product of the two above-cited traits (Equation 11).

$$A_p = A_v \times F_p \quad (11)$$

Xylem water potentials at the beginning of xylem embolism (P_{12}) and full embolism (P_{88}) were calculated using equation (12) and (13) respectively (Domec and Gartner, 2001), with P_{50} and S from equation (1).

$$P_{12} = P_{50} + \frac{50}{S} \quad (12)$$

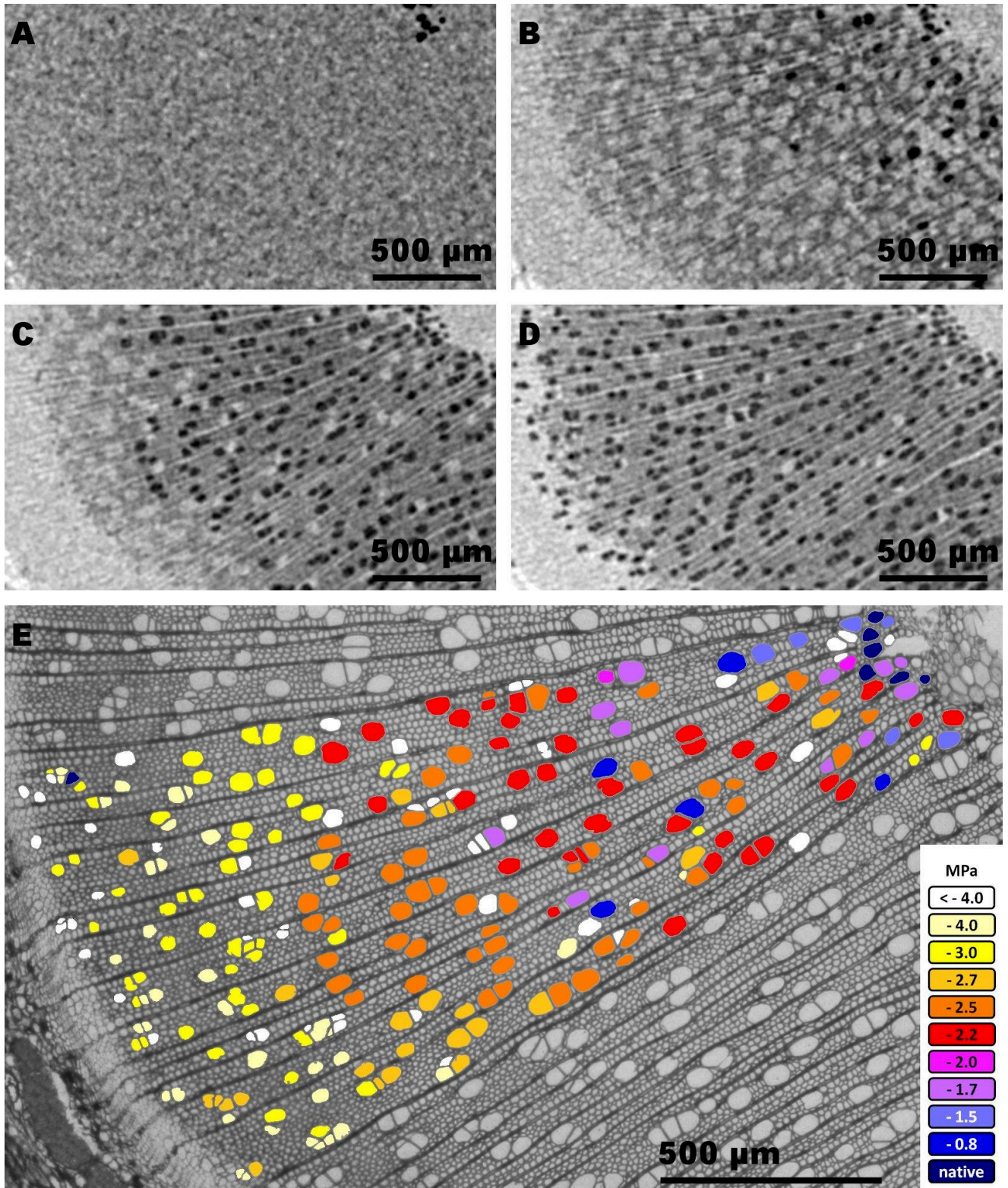


Figure 46: Measurement of the cavitation pressure (P_c) of each individual vessel. A-D: Direct observation of embolism spread using a x-ray microtomograph in an intact xylem stem under increasing tension. Black areas reveal the embolized vessels. A: native state ($\Psi = 0$ MPa). B: $\Psi = -1.5$ MPa. C: P_{50} state ($\Psi = -2.5$ MPa). D: final state ($\Psi = -4$ MPa). E: Cut of the same stem sample observed using light microscopy. The resulting image resolution allows us measuring accurately the anatomical traits. Colour represents the pressure of cavitation (P_c) of each vessel, as measured with x-ray microtomography. Shown images are from a subset of approx. 230 vessels on a LW plant.

$$P_{88} = P_{50} - \frac{50}{S} \quad (13)$$

8) Modelling pit membrane strain

The impact of the pit structural features measured with TEM on the membrane strain was assessed as described in Tixier *et al.* (2014). For each pit measured with the TEM, the pressure required to deflect the membrane against the inner aperture (Pb) was calculated according to equation (14).

$$Pb = \frac{1}{3} \times \frac{E}{(1-\nu^2)} \times \frac{T_m^3}{(D_p^2 - D_a^2)^2} \times L_p \quad (14)$$

Where E is the Young's modulus of pit membrane, measured by Capron *et al.* (2014) to be around 400 MPa on *Populus* and ν is the Poisson's ratio, estimated to be 0.3 by Tixier *et al.* (2014).

The maximum pit membrane strain (ε) was then calculated for each pit depending on the pressure (P):

When $P < Pb$, ε is calculated using equation (15); when $P > Pb$, ε is calculated using equation (16) where ε_1^* is ε_1 at $P = Pb$.

$$\varepsilon_1 = -\frac{3}{8} \times \frac{(1-\nu^2)}{E} \times \left(\frac{D_p}{2}\right)^2 \times P \quad (15)$$

$$\varepsilon_2 = -\frac{3}{8} \times \frac{(1-\nu^2)}{E} \times \left(\frac{D_a}{2}\right)^2 \times (P - Pb) \times (1 + \varepsilon_1^*) + \varepsilon_1^* \quad (16)$$

The ε vs. pressure curve were drawn for each measured pit and the mean curves for each condition were computed.

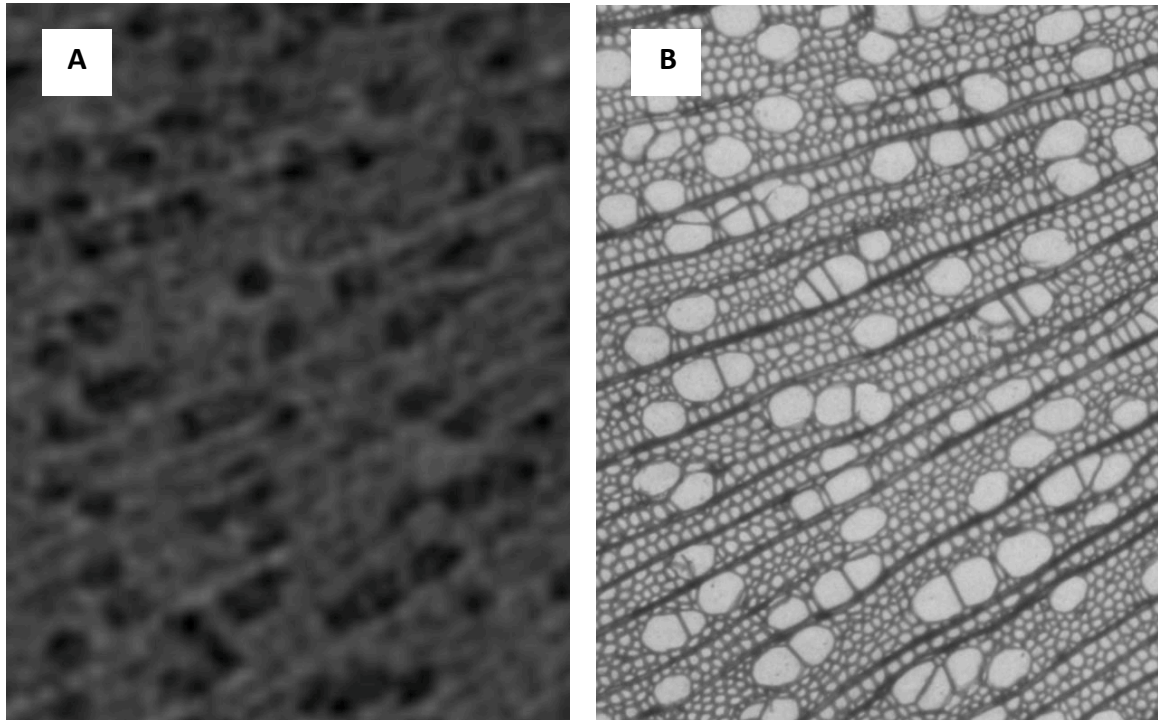


Figure 47 : Coupe transversale de xylème de peuplier réalisée au même endroit et observé selon deux techniques : microtomographie à rayons X (**A**) et microscopie optique (**B**). On constate que la plupart des vaisseaux sont identifiables sur les deux images.

9) Measurement of individual vessel VC using X-Ray microtomography

Four stem segments from LD and LW plants were sampled and prepared in the same condition as for VC measurements (see *Sampling protocol*). We used the techniques described in Cochard *et al.* (2015). Segments were cut underwater at 34 cm long using a razor blade, sealed in liquid paraffin wax in order to prevent dehydration during the microtomography scans. A first 21 min scan was acquired using a X-ray microtomography system (Phoenix nanotom, General Electric, Boston, MA, USA) at the centre of the segment as described below to reveal the native state of embolism in each shoot. The field-of view was $7.8 \times 7.8 \times 7.8 \text{ mm}^3$ and covered each full cross section of the samples. X-ray source settings were 60 kV and 240 μA . 1000 images were recorded during the 360 ° rotation of the sample.

Then, the paraffin was broken at the ends in order to allow the water flow and the sample was set in a centrifuge (Sorvall RC3C) during 5 min at 0.08 MPa, immersed in paraffin and scanned again with the microtomograph at the same location than previously to observe the new embolism status. The same procedure was repeated for increasing pressure steps, until - 4 MPa (Fig. 46).

Then, the stem sample was cut in the air at 5 mm above the scanned section in order to embolize 100 % of the functional vessels and a last microtomography scan was performed in order to visualize the complete vessel network.

The sample was then dried several days in room conditions and a 25 μm thick cross section slice was cut with a rotary microtome (RM2165, Leica Microsystems). Sections were dyed with series of baths as following: bleach (about 15 sec), acetic acid, Astra blue (1 min), acetic acid, safranin (1 min), acetic acid with a water bath between each solution, then an ethanol series (50, 70, 100, 100 %). The sections were mounted in Eukitt. Images were processed using a microscope (Zeiss Axio Observer Z1), a digital camera (AxioCam MRc) and Zen imaging

Table 2: Characterisation of sapling physiology grown under the three different conditions.

Factor	Unit	LD	LW	SW
Ψ_{pd}	Mpa	- 0.59 $\pm$ 0.44 ^a	- 0.14 $\pm$ 0.03 ^b	- 0.11 $\pm$ 0.02 ^b
Ψ_{min}	MPa	- 1.44 $\pm$ 0.33 ^a	- 0.98 $\pm$ 0.06 ^b	- 0.98 $\pm$ 0.11 ^b
<i>LA</i>	cm ²	87.64 $\pm$ 18.41 ^a	137.61 $\pm$ 17.55 ^b	184.13 $\pm$ 40.34 ^c
<i>Height</i>	mm	1685 $\pm$ 187 ^a	2237 $\pm$ 263 ^b	2282 $\pm$ 76 ^b
<i>Diameter</i>	mm	9.47 $\pm$ 0.83 ^a	13.96 $\pm$ 0.49 ^b	10.94 $\pm$ 0.61 ^b
K_h	mol.s ⁻¹ .MPa ⁻¹ .m ⁻¹	527.21 $\pm$ 186.63 ^a	766.92 $\pm$ 154.71 ^b	780.60 $\pm$ 110.01 ^b
K_s	mol.s ⁻¹ .MPa ⁻¹ .m ⁻¹	585.65 $\pm$ 406.76 ^a	579.50 $\pm$ 167.38 ^a	529.88 $\pm$ 183.41 ^a
P_{50}	MPa	- 3.03 $\pm$ 0.23 ^a	- 2.49 $\pm$ 0.10 ^b	- 2.27 $\pm$ 0.18 ^b
P_{12}	MPa	- 2.55 $\pm$ 0.34 ^a	- 2.02 $\pm$ 0.11 ^b	- 1.87 $\pm$ 0.11 ^b
P_{88}	MPa	- 3.51 $\pm$ 0.24 ^a	- 2.95 $\pm$ 0.11 ^b	- 2.68 $\pm$ 0.11 ^b
<i>Native</i> <i>Embolism</i>	%	1.81 $\pm$ 10.47 ^a	- 7.48 $\pm$ 7.91 ^{ab}	- 10.81 $\pm$ 7.84 ^b

Data are mean values $\pm$ standard deviation for each growth condition. Values on each line not followed by the same letter differ significantly at $p < 0.05$ (one-way ANOVA).



Figure 48 : Prélèvement de plants issus des trois conditions de croissance.

software system (Zeiss, Jena, Germany). Image analyses were performed using Fiji software (under ImageJ version 2.0.0-rc-68/1.52h) (Schindelin *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012). Diameter of each vessel (D_v^*) was estimated as the diameter of the circle with the same area as the vessel lumen. For each vessel, the number of vessel in the group (Group Size; GS) and the fraction of membrane in contact with other vessels (F_c^*) was also measured. The microtomography scans were reconstructed in three-dimension (3D) using Phoenix datosx 2 software (General Electric, Boston, MA, USA) with spatial resolution of $6.8 \times 6.8 \times 6.8 \mu\text{m}^3$ per voxel. Then, for each 3D-reconstruction, a cross section was extracted at the exact same location as with the microscopy section. Using the series of x-ray scans, the pressure inducing cavitation in a vessel (P_c) was defined as the pressure step from which the vessel appeared to be air-filled. A unique identification number was given to each vessel observed in both microtomography observation (virtual cross sections built by 3D reconstruction) and microscopy observation (stem cross section observed by light microscopy) in order to link the pressure of cavitation with anatomical parameters (Fig. 46, E ; Fig. 47). 2570 vessels could be identified in both techniques. Vessels were grouped per D_v^* , per F_c^* and per GS classes. Classes were sized to be as uniform as possible, counting from 183 up to 748 vessels. 1100 solitary vessels were grouped in the same class when required. Cumulative number of embolized vessels were plotted according to their P_c and, for each class, a Weibull function was fit (Equation 1).

10) Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the RStudio software (version 1.1.456; running under R core version 3.5.1, R Development Core Team, 2008). One way ANOVA were used for comparing the means between the three growth conditions. When we found a significant difference, we referred to Tukey's multiple range test at $P < 0.05$ to compare the mean values

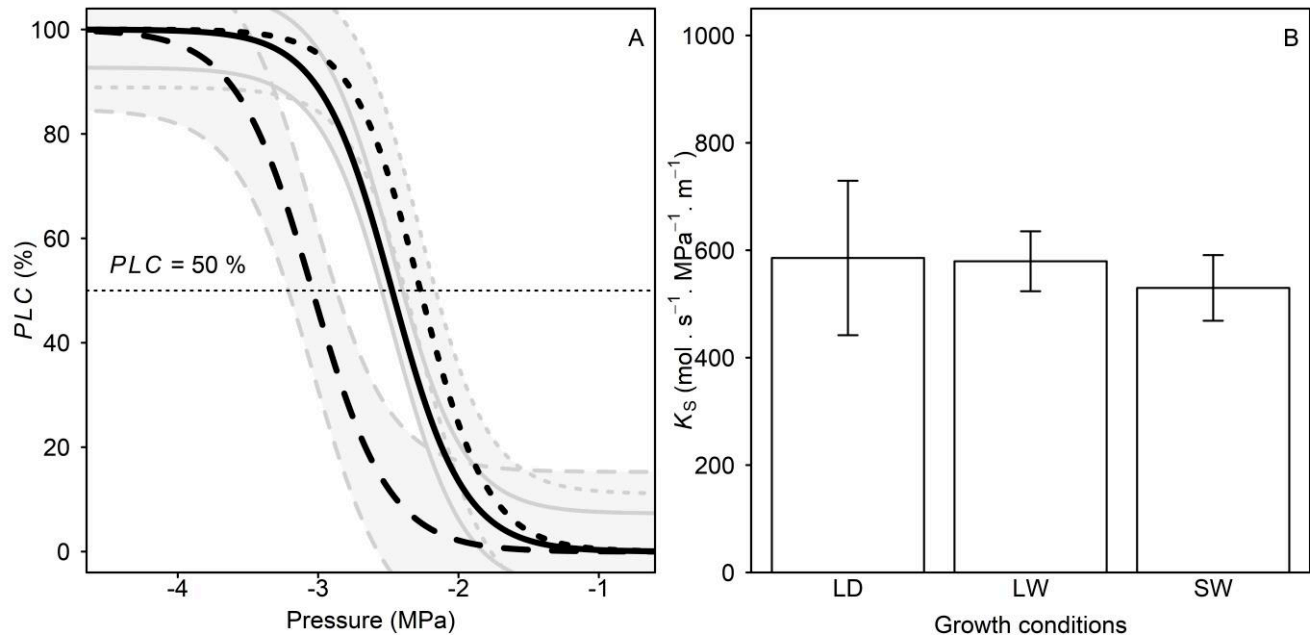


Figure 49: Xylem hydraulic traits in trees depending on the growth conditions. A: Xylem vulnerability to cavitation curve. Each line is the mean curve per condition: LD, $n = 9$ from 9 trees; LW, $n = 10$ from 5 trees; SW, $n = 12$ from 6 trees. Dashed line, LD plants; full line, LW plants; dotted line, SW plants. Grey areas represent the standard deviations around the means. Horizontal dotted line indicates the 50 % loss of conductance. B: Hydraulic specific conductivity (K_s). Data are mean values for LD, 8 trees; LW, 9 trees; SW, 9 trees. Error bars show the standard deviation.

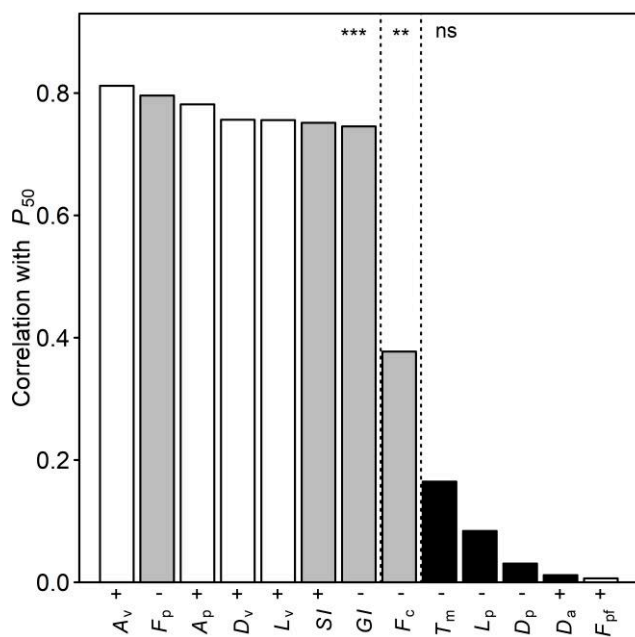


Figure 50: Correlation between P_{50} and several xylem structural traits. Data are squares of the coefficient of correlation (R^2) for each factor with P_{50} . On the x-axis, a "+" symbol indicates a positive correlation, while a "-" symbol indicates a negative one. The bar colours represent the three levels on which the traits were analysed: black refers to the pit-level; white refers to the vessel-level and grey refers to the tissue-level. Stars indicate the significance of the correlation: "****", $p\text{-value} < 0.001$; "****", $0.001 < p\text{-value} < 0.01$; "ns", non-significant correlation.

between growth conditions. The correlation between the structural traits and the P_{50} and P_c were calculated using linear regressions.

V. RESULTS

Continuous recordings of the radial growth showed a significant lower growth for the LD plants (Table 2). LD plants also showed a lower height (Fig. 48), lower LA , lower Ψ_{pd} and lower Ψ_{mid} , demonstrating that these plants grown under a constrained water regime were affected for their development when compared to LW and SW plants. The higher LA for SW plants compared to LW plants is an evidence that the shading conditions affected the plant development.

Growing clone plants under different environmental conditions aimed to induce wide variations in xylem vulnerability to cavitation (VC). The three growth conditions spread the measured P_{50} in a range from - 2.00 to - 3.47 MPa. A significantly lower P_{50} was found on LD when compared to LW and SW plants ($p\text{-value} < 0.001$, Table 2), while the slopes of the vulnerability curves were not different depending on the growth conditions (Fig. 49, A). Despite a slightly higher native embolism measured on LD plants compared to SW plants, Ψ_{mid} was higher than the inflexion point of the vulnerability curve (P_{12}) for each growth condition. This allows excluding any effect of these quite low native embolism on measured P_{50} . There was no difference on mean K_S between the growth conditions (Fig. 49, B), suggesting no plasticity for this trait in our experimental conditions. When considering the vessel diameter measured by light microscopy, a reduced K_h was measured in the LD plants compared to LW and SW plants (Table 2).

The analyses combining diverse observation methods (light microscopy, TEM, SEM), allowed measuring a large set of anatomical traits at tissue-, vessel- and pit levels. The correlation between these traits and the P_{50} was assessed (Fig. 50; Fig. S1 [p. 70]).

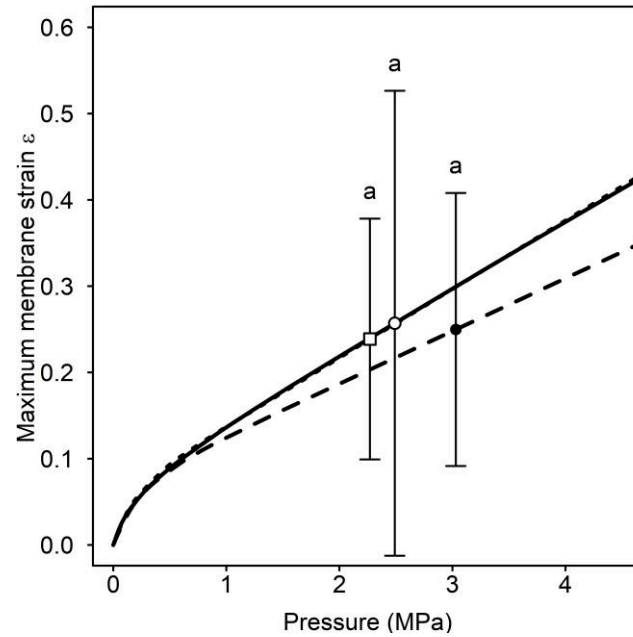


Figure 51: Maximum pit membrane strain depending on pressure in trees grown under three different conditions. The membrane strain vs. pressure curve was modelled for each pit we analysed. A line represent a mean curve of strain vs. pressure curves for at least 50 pits for each the growth condition: Dashed line refers to LD; Full line refers to LW and dotted line refers to SW. Dots show the strain at P_{50} for each condition: black circle refers to LD; white circle refers LW and white square refers to SW. Error bars show the standard deviation around the mean at P_{50} . Letters show the results of a one-way ANOVA ($p < 0.05$) at P_{50} .

The traits measured at tissue level (GI , SI and F_p) showed a strong linear correlation with P_{50} ($R^2 > 0.7$; $p\text{-value} < 0.001$; Fig. 50), except F_c that exhibited a weaker correlation ($R^2 = 0.38$; $p\text{-value} = 0.004$). These results put in light a relationship between vessel connectivity and VC (negative relationship for F_c , GI and F_p ; positive relationship for SI). However, we also found no correlation between Pit-field fraction (F_{pf}) and P_{50} , with no variation among the growth conditions (Table S1 [Supplementary Information]). We observe a strong positive relationship ($p\text{-value} < 0.001$) between P_{50} and the traits measured at vessel level (L_v , D_v and A_v) showing that larger vessels with larger pit area tend to be associated with an increase in VC ($R^2 > 0.75$; $p\text{-value} < 0.001$). The positive correlation between P_{50} and A_p ($R^2 = 0.78$; $p\text{-value} < 0.001$) enlightened the link between the area of vessel covered by bordered pits and the vulnerability of the xylem to cavitation.

No linear correlation appeared between the structural features of bordered pits (D_a , D_p , L_p and T_m) and the P_{50} : we observed no variation for D_a , D_p and T_m among growth conditions. The modelling of the mechanical behaviour of the pits (Tixier *et al.*, 2014) relying on pit dimensions did not show any difference for the pit membrane strains between the growth conditions (Fig. 51).

The direct microtomographic visualization of embolism spread inside the xylem (Fig. 46) allowed evaluating the VC of individual vessels classified depending on their structural parameters (Fig. 52). The correlation between D_v^* and P_c (Fig. 52, A) was clear: wider vessels appeared more vulnerable than the narrower ones. F_c^* showed a smaller influence on P_c (Fig. 52, B): solitary vessels ($F_c^* \leq 1\%$) and weakly connected vessels ($1 < F_c^* \leq 20\%$) were more vulnerable than the highly connected vessels ($F_c^* > 20\%$). The link between GS and P_c (Fig. 52, C) appeared to be the less clear: the most vulnerable vessels were the solitary ones whereas the grouped vessels ($GS \geq 2$) were less vulnerable. Despite a significant correlation between P_c and

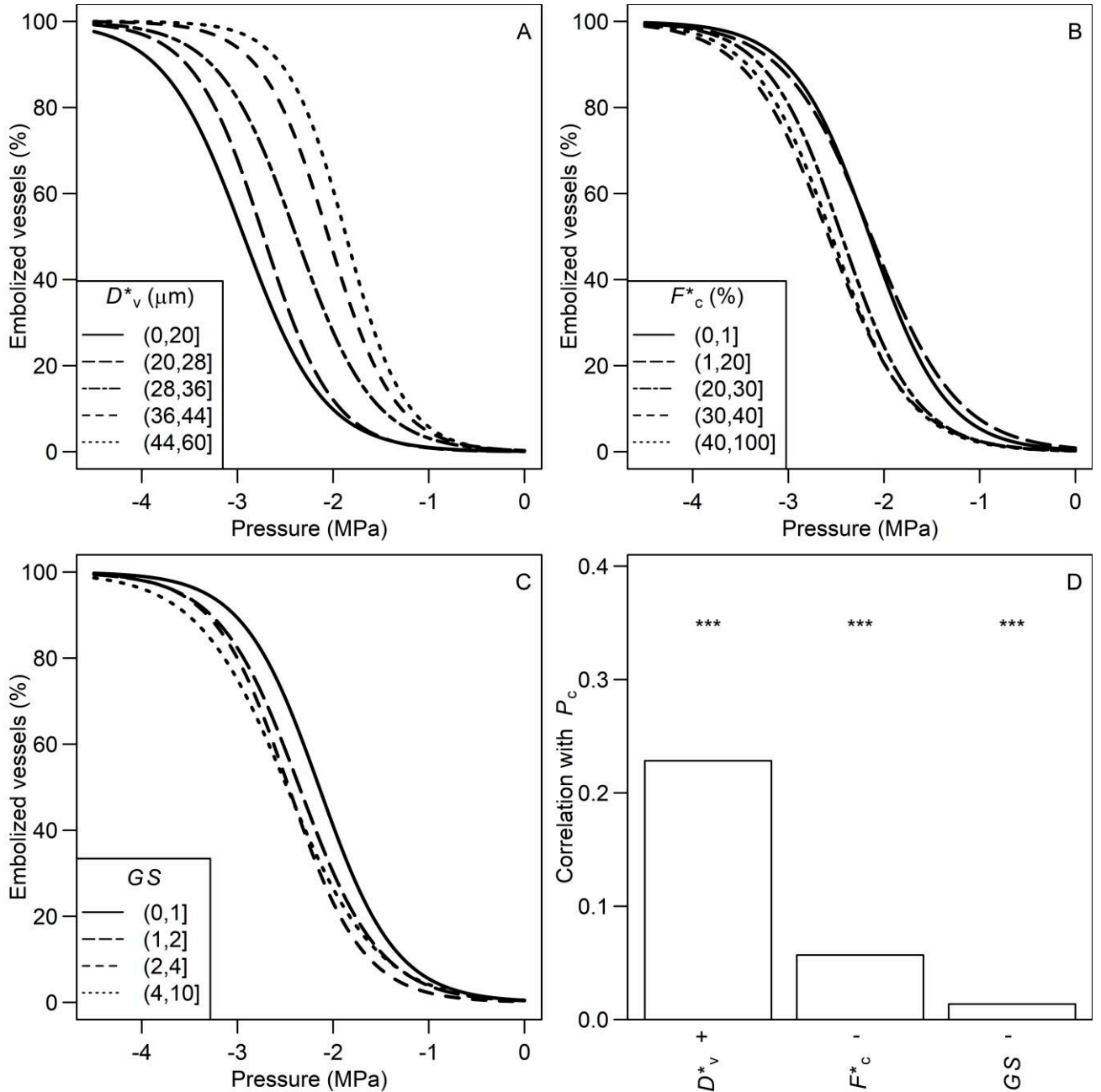


Figure 52: Structural determinants of cavitation pressure (P_c) of vessels. Data are all vessel measurements pooled from analyses on four individuals using X-ray microtomography. A-C: Vulnerability to cavitation curves of vessels grouped by classes depending on structural traits. A: Vessels grouped by diameter (D_v^*) classes. The dash sizes of the lines indicate the vessel diameter class: from full line (narrow vessels) to dotted line (wide vessels). B: Vessels grouped by classes for fraction of membrane length in contact with other vessels (F_c^*). The dash sizes of the lines indicate the vessel contact fraction class: from full line (non-contact vessels) to dotted line (vessels sharing high portion of membrane length). C: Vessels are grouped by group size (GS) classes. The dash sizes of the lines indicate the vessel group sizes: from full line (solitary vessels) to dotted line (vessels in large groups). D: Correlation between P_c and xylem structural traits. Data are squares of the coefficient of correlation (R^2) for each factor with P_c . On the x-axis, a "+" symbol indicates a positive correlation, while a "-" symbol indicates a negative one. Stars indicate the significance of the correlation for the trait: "****", p -value < 0.001.

385 D_v^* , F_c^* and GS ($p\text{-value} < 0.001$; Fig. 52, D), the strength of the correlation was very poor
386 ($R^2 < 0.25$).

387

388 **VI. DISCUSSION**

389 Our experimental setup was designed to constrain the plants for water availability as much as
390 possible without stopping their growth (Table 2), using balances and valves for irrigation to
391 finely control the watering of the droughted (LD) plants (between 30 and 25 % of soil field
392 capacity). The continuous growth measurements (radial growth, using LVDT) was used to
393 adjust the water stress as much as possible until the limit that stops the growth. When the LD
394 plants were close to the lower limit (25 % of soil field capacity), stem radial contraction was
395 observed; reflecting the water stress. The water potential measurements also indicate the water
396 stress intensity for LD plants. In our experiment, shade caused no significant change on P_{50}
397 probably because our light interception treatment (30 %) was too weak when compared to a
398 previous study (80 % in Plavcová and Hacke, 2012).

399 The range of plasticity on P_{50} induced by the growth conditions was large: 0.76 MPa between
400 the mean P_{50} of droughted (LD) and shaded (SW) plants (Table 2; Fig. 49, A) and up to 1.47
401 MPa between two individuals. This is consistent with previous studies: Awad *et al.* (2010) got
402 a difference of 0.63 MPa between droughted and well-watered plants; Plavcová and Hacke
403 (2012) go a difference of 1.08 MPa between droughted and shaded *Populus trichocarpa x*
404 *deltoides* plants. In this latter study, they reported a variation of P_{50} up to 1.56 MPa but their
405 setup also included treatment in nutrient availability, and they recorded r-shaped curves that
406 cannot be compared with our S-shaped curves. Therefore, the plasticity induced by our
407 experimental setup was probably close to the maximum we could expect according to the
408 literature.

The absence of difference in specific hydraulic conductivity (K_s) between LD and LW plants (Table 2; Fig. 49, B) was rather surprising since a correlation between VC and K_s has often been reported (Gleason *et al.*, 2016). Nevertheless, this lack of trade-off between hydraulic efficiency and safety was observed within species (Awad *et al.*, 2010, Plavcová and Hacke, 2012, Schuldt *et al.*, 2016). A significant decrease of the theoretical conductivities (K_h) was found for LD plants compared to other plants (Table 2), relying on a decrease in D_v (Table S1 [p. 69]); whereas the pit structure was not modified (Table S1 [p. 69]). The decrease in lumen conductance in LD plants may be offset by other changes we did not investigate, such as vessel wall carving, pit biochemistry or pit membrane porosity.

P_{50} was correlated with anatomical traits measured at the xylem and vessel levels (significant correlations with $R^2 > 0.7$ for 7 out of the 9 traits measured at this level; Fig. 50). By contrast, no correlation was found with the traits related to the pit dimensions (D_a , D_p , L_p and T_m ; Fig. 50). In a previous work, shading caused an increase in VC with a decrease in both T_m and D_v (Plavcová *et al.*, 2011). The mechanical properties of pit membranes showed no significant difference among the growth conditions (Fig. 51). Thus, the pit ultrastructure does not appear as a driver of the VC plasticity in *Populus tremula x alba*. The pit membrane porosity may contribute to the differences in VC (Jansen *et al.*, 2009); but this parameter is difficult to measure accurately assuming that only the largest diameter is relevant, not the mean diameter. Because the pore diameter strongly relates to T_m (Jansen *et al.*, 2009), the lack of difference in T_m suggests that there would be no change in the membrane porosity between growth conditions. The role of the biochemical composition of the pit membrane in VC plasticity cannot be excluded. Once again, pit biochemistry was investigated using immunolabelling (Kim *et al.*, 2011; Herbette *et al.*, 2015), but accurate techniques are needed to decipher within-species difference in P_{50} . Moreover, calcium in pit membrane was reported to be a major

determinant of between-species differences in VC, but not involved in the VC plasticity (Herbette and Cochard, 2010).

Our results suggest that the VC plasticity is controlled at the tissue and vessel level, and not at pit level. However, pit ultrastructure, especially the pit membrane thickness have been identified as the major traits involved in variation in VC between species (Jansen *et al.*, 2009; Tixier *et al.*, 2014). In addition, between species differences in VC also depend on pit mechanical behaviour (Tixier *et al.*, 2014). At the inter-specific level, the probability for air-seeding through large pores appears to be higher when more pits are present (rare pit hypothesis proposed by Christman *et al.*, 2009). The pit area can thus explain differences in VC among some angiosperm groups but not others (Lens *et al.*, 2013). This trait, which depends on the vessel dimensions and xylem organization, does not appear very relevant to explain variability in VC between species. Lens *et al.* (2011) tested the relationship between several pit properties and VC for 11 acer species. Unlike our study, they found that VC strongly correlated with depth of bordered pit chamber (L_p) pit membrane thickness (T_m) and diameter of pit membrane pore whereas no relationship was found between VC and vessel diameter (D_v) and total pit area per vessel (A_p). Thus, the mechanisms controlling the variability in VC inter-specific seem to be different from the drivers of the within species plasticity.

Vulnerability curves are commonly used for measuring embolism rates, but not the cavitation events. Because cavitation events in a vessel can induce different effects on the xylem conductance and thus the value of P_{50} , depending on vessel size and xylem organisation, “vulnerability to embolism” (VE) would be a more suitable term when we compare xylems for P_{50} . That is why we will use now the term VE in the following lines. Direct x-ray microtomography observations allow the visualisation of embolized vessels, and not the loss of hydraulic conductance. Thus, it really allows the comparison of vessels behaviour for VC.

Supplementary Table S1: Xylem structural traits depending on the growth conditions.

Trait	Unit	LD	LW	SW
<i>A_p</i>	mm ²	1.20 ± 0.51	2.94 ± 0.65	3.78 ± 0.27
<i>A_v</i>	mm ²	8.21 ± 3.93	20.63 ± 3.64	26.65 ± 8.22
<i>D_a</i>	µm	3.67 ± 0.34	3.37 ± 0.61	3.98 ± 0.81
<i>D_p</i>	µm	9.18 ± 0.69	8.64 ± 0.55	8.89 ± 0.72
<i>D_v</i>	µm	31.22 ± 6.14	40.07 ± 1.98	42.71 ± 2.28
<i>F_c</i>	%	20.35 ± 2.70	19.01 ± 1.13	17.04 ± 0.96
<i>F_p</i>	%	15.95 ± 1.13	14.15 ± 0.77	12.53 ± 0.56
<i>F_{pf}</i>	%	74.45 ± 1.33	74.46 ± 2.93	74.13 ± 2.75
<i>GI</i>	-	1.84 ± 0.20	1.63 ± 0.05	1.51 ± 0.05
<i>L_p</i>	µm	1.99 ± 0.06	2.08 ± 0.03	1.87 ± 0.11
<i>L_v</i>	mm	70.79 ± 25.14	136.99 ± 18.86	164.59 ± 48.4
<i>SI</i>	%	33.13 ± 5.43	38.46 ± 2.19	43.73 ± 3.11
<i>T_m</i>	µm	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02

Data are mean values ± standard deviation.

457 Our results showing a strong relationship between P_{50} and some vessel and xylem parameters
 458 provide three non-exclusive explanations for the acclimation of VE. These explanations are
 459 related to changes in VC or to changes in the effect of cavitation on conductance. First, at the
 460 vessel level, our study shows that vulnerable individuals exhibited bigger vessels (both longer
 461 (L_v) and wider (D_v); Fig. 50). A bigger vessel has a higher water volume: when cavitation occurs
 462 through an air-seeding event in a large vessel, it generates a greater impact on the hydraulic
 463 conductivity compared to a smaller vessel. Thus, a xylem having a high proportion of large
 464 vessels undergoes an important drop of conductivity after each air-seeding event. Second, we
 465 found that vulnerable xylems had a lower vessel connectivity, *i.e.* a greater SI and a lower GI
 466 and F_c . Redundancy in the xylem has already been linked with a lower VE using modelling
 467 (Ewers *et al.*, 2007). High connectivity is an efficient way to maintain the hydraulic
 468 conductance despite cavitation events in the xylem by providing alternative pathways to the
 469 water flow (Carlquist, 1966; Schuldt *et al.*, 2016). Third, larger vessels have a larger pit area
 470 per vessel (A_p) and would thus be more prone to cavitation, according to the pit area hypothesis
 471 (Christman *et al.*, 2009). For the first time, direct observations using X-ray microtomography
 472 allowed monitoring the emboli status of each individual vessel in the same stem sample during
 473 the entire cavitation process (Fig.46; Fig. 52). This approach supports the third explanation,
 474 since larger vessels (D_v^*) had a higher VC – as noticed by Cai and Tyree (2010) using a statistical
 475 and indirect and destructive technique. Nevertheless, the poor correlation (low R^2 values)
 476 between the cavitation pressure of each vessel (P_c) and D_v^* , F_c^* or GS give us clue that the rare
 477 pit hypothesis is far from being sufficient for explaining the VE inside a stem sample. Other
 478 additional mechanisms would be involved to explain the VE plasticity observed among growth
 479 conditions: they would include the effect of redundancy and of vessel embolized volume on the
 480 loss of conductance. That is why we assume that the different mechanisms we described here
 481 act together to design the VE during acclimation. The next step will be to test the respective

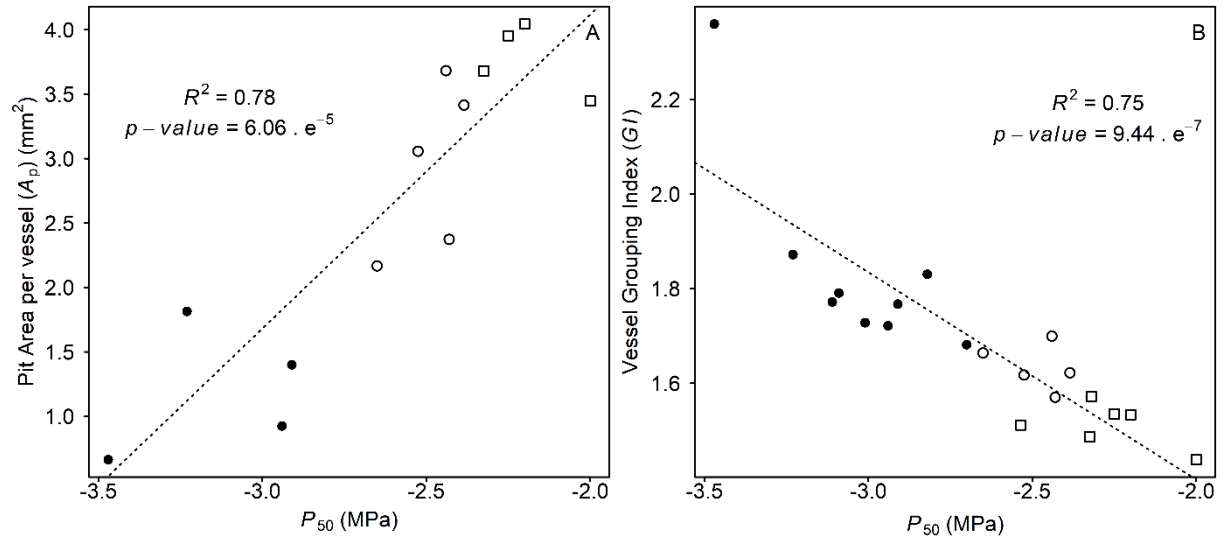


Figure S1: Correlation between P_{50} and two xylem structural traits. **A:** Relationship between P_{50} and pit area per vessel (A_p). **B:** Relationship between P_{50} and vessel grouping Index (GI). Each point represents the mean value for an individual tree. Black circles refer to LD plants; white circles refer to LW plants and white squares refer to SW plants. The dotted line is the regression line.

contribution of these mechanisms in VE plasticity using a model adapted from those reported by Mrad *et al.* (2018) that takes into account the features of the hydraulic network at the xylem and pit level.

In conclusion, we found that the acclimation of VC to contrasted growth conditions occurs without any change in pit ultrastructure, contrary to what was reported when comparing species. Thus, within-species plasticity and between-species variability for VC rely on different mechanisms. Instead, we showed that an increase in resistance to embolism in poplar is related to an increase in vessel connectivity and a decrease in vessel dimensions, leading to reduce the likely of air seeding in a vessel and the effect of cavitation events on hydraulic conductance. Such results will allow focusing on the relevant candidate genes controlling VE such as those involved in connectivity between vessels or vessel dimensions. These genes include the aquaporins involved in cell expansion during xylogenesis (Plavcová *et al.*, 2013), some transcription factors controlling the cell wall metabolism in xylem such as VND6, VND7 and MYB46 which expression levels changed in response to an abiotic stress (Plavcová *et al.*, 2013; Taylor-Teeple *et al.*, 2016) or CLE genes (CLE41 and CLE44) that repress the xylem differentiation (De Rybel *et al.*, 2016).

FUNDING INFORMATION This work was supported by European Union within the context of European Regional Development Fund (ERDF).

SUPPLEMENTARY DATA Table S1: Xylem structural trait measurements depending on the growth conditions. **Figure S1:** Correlation between P50 and two xylem structural traits.

ACKNOWLEDGEMENTS The authors thanks Christelle Boisselet and Brigitte Girard for plant production, Patrice Chaleil, Aline Faure and Stephane Ploquin for watching the plants in the greenhouse, André Marquier for PAR measurements, Christophe Serre for LDVT preparation, and Felix Hartmann for his help in vessel length calculation.

VII. LITERATURE CITED

- Allario T, Tixier A, Awad H *et al.* 2018. PtxtPME1 and homogalacturonans influence xylem hydraulic properties in poplar. *Physiologia Plantarum*, **163**: 502-515.
- Awad H, Barigah T, Badel E, Cochard H, Herbette S. 2010. Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum*, **139**: 280-288.
- Barigah TS, Charrier O, Douris M *et al.* 2013. Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany*, **112**: 1431-1437.
- Barigah TS, Ibrahim T, Bogard A *et al.* 2006. Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiology*, **26**: 1505-1516.
- Cai J, Tyree MT. 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.
- Capron M, Tordjeman P, Charru F, Badel E, Cochard H. 2014. Gas flow in plant microfluidic networks controlled by capillary valves. *Physical Review E*, **89**: 9.
- Carlquist S. 1966. Wood Anatomy of Compositae: A Summary, With Comments on Factors Controlling Wood Evolution. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, **6**: 3.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ *et al.* 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature*, **491**: 752.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR. 2009. Testing the 'rare pit' hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist*, **182**: 664-674.
- Cochard H. 2002. A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell and Environment*, **25**: 815-819.
- Cochard H, Badel E, Herbette S, Delzon S, Choat B, Jansen S. 2013. Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review. *Journal of Experimental Botany*, **64**: 4779-91.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Ameglio T. 2005. Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum*, **124**: 410-418.
- Cochard H, Delzon S, Badel E. 2015. X-ray microtomography (micro-CT): a reference technology for high-resolution quantification of xylem embolism in trees. *Plant, Cell & Environment*, **38**: 201-206.
- Cochard H, Holtta T, Herbette S, Delzon S, Mencuccini M. 2009. New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. *Plant physiology*, **151**: 949-54.
- Cohen S, Bennink J, Tyree M. 2003. Air method measurements of apple vessel length distributions with improved apparatus and theory. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 1889-1897.
- Cooke JEK, Martin TA, Davis JM. 2005. Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist*, **167**: 41-52.
- De Rybel B, Mähönen AP, Helariutta Y, Weijers D. 2016. Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **17**: 11.
- Domec J-C, Gartner BL. 2001. Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees*, **15**: 204-214.

- Ewers FW, Ewers JM, Jacobsen AL, López-Portillo J. 2007.** Vessel redundancy: Modeling safety in numbers. *Iawa Journal*, **28**: 373-388.
- Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S et al. 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.
- Gleason SM, Westoby M, Jansen S et al. 2016.** Weak tradeoff between xylem safety and xylem-specific hydraulic efficiency across the world's woody plant species. *New Phytologist*, **209**: 123-136.
- Herbette S, Bouchet B, Brunel N, Bonnin E, Cochard H, Guillon F. 2015.** Immunolabelling of intervessel pits for polysaccharides and lignin helps in understanding their hydraulic properties in *Populus tremula* x *alba*. *Annals of Botany*, **115**: 187-199.
- Herbette S, Cochard H. 2010.** Calcium is a major determinant of xylem vulnerability to cavitation. *Plant Physiol*, **153**: 1932-9.
- Herbette S, Wortemann R, Awad H, Huc R, Cochard H, Barigah TS. 2010.** Insights into xylem vulnerability to cavitation in *Fagus sylvatica* L.: phenotypic and environmental sources of variability. *Tree Physiology*, **30**: 1448-1455.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A. 2009.** Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany*, **96**: 409-419.
- Jinagool W, Lamacque L, Delmas M, Delzon S, Cochard H, Herbette S. 2018.** Is there variability for xylem vulnerability to cavitation in walnut tree cultivars and species (*Juglans* spp.)? *HortScience*, **53**: 132-137.
- Jinagool W, Rattanawong R, Sangsing K et al. 2015.** Clonal variability for vulnerability to cavitation and other drought-related traits in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Journal of Plant Hydraulics*, **2**: e001.
- Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K. 2011.** Temporal and spatial diversities of the immunolabeling of mannan and xylan polysaccharides in differentiating earlywood ray cells and pits of *Cryptomeria japonica*. *Planta*, **233**: 109-122.
- Lamy JB, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2011.** Uniform Selection as a Primary Force Reducing Population Genetic Differentiation of Cavitation Resistance across a Species Range. *Plos One*, **6**.
- Lamy JB, Plomion C, Kremer A, Delzon S. 2012.** Q(ST) < F-ST As a signature of canalization. *Molecular Ecology*, **21**: 5646-5655.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist*, **190**: 709-723.
- Lens F, Tixier A, Cochard H, Sperry JS, Jansen S, Herbette S. 2013.** Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**: 287-292.
- Li S, Lens F, Espino S, Karimi Z et al. 2016.** Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in angiosperm xylem. *Iawa Journal*, **37**: 152-171.
- Martínez-Vilalta J, Cochard H et al. 2009.** Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist*, **184**: 353-364.
- Mrad A, Domec JC, Huang CW, Lens F, Katul G. 2018.** A network model links wood anatomy to xylem tissue hydraulic behaviour and vulnerability to cavitation. *Plant Cell and Environment*, **41**: 2718-2730.
- Niez B, Dlouha J, Moulia B, Badel E. 2019.** Water-stressed or not, the mechanical acclimation is a priority requirement for trees. *Trees-Structure and Function*, **33**: 279-291.

- Pammenter NW, Vander Willigen C 1998.** A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree physiology*, **18**: 589-593.pdf
- Plavcová L, Hacke UG. 2012.** Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 6481-6491.
- Plavcová L, Hacke UG, Almeida-Rodriguez AM, Li EY, Douglas CJ. 2013.** Gene expression patterns underlying changes in xylem structure and function in response to increased nitrogen availability in hybrid poplar. *Plant Cell and Environment*, **36**: 186-199.
- Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS. 2011.** Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant Cell and Environment*, **34**: 501-513.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. 2012.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, **9**: 676-682.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, **9**: 671-675.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965.** Sap pressure in vascular plants. *Science*, **148**: 339-346.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S. 2013a.** How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science*, **4**: 11.
- Scholz A, Rabaey D, Stein A, Cochard H, Smets E, Jansen S. 2013b.** The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology*, **33**: 684-694.
- Schuldt B, Knutzen F, Delzon S et al. 2016.** How adaptable is the hydraulic system of European beech in the face of climate change-related precipitation reduction? *New Phytologist*, **210**: 443-458.
- Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK. 2005.** Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant Cell and Environment*, **28**: 456-465.
- Steudle E. 2001.** The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 847-875.
- Taylor-Teeple M, Lin L et al. 2015.** An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, **517**: 571-U307.
- Tixier A, Herbette S, Jansen S et al. 2014.** Modelling the mechanical behaviour of pit membranes in bordered pits with respect to cavitation resistance in angiosperms. *Annals of Botany*, **114**: 325-34.
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H. 1994.** Biophysical perspectives of xylem evolution. Is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction ? *IAWA Journal*, **15**: 335-360.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N. 2005.** Inter-vessel pitting and cavitation in woody Rosaceae and other vesselless plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell and Environment*, **28**: 800-812.
- Wortemann R, Herbette S et al. 2011.** Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree Physiology*, **31**: 1175-1182.
- Zimmermann MH, Jeje AA. 1981.** Vessel-length distribution in stems of some american woody plants. *Canadian Journal of Botany*, **59**: 1882-1892.

VIII. Conclusion du premier chapitre

Dans ce premier chapitre nous nous sommes attachés à étudier la question des bases structurelles de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation, car cette question est importante pour permettre la recherche de déterminants génétiques de cette plasticité et donc comprendre le comportement des forêts en réponse aux changements climatiques. En se focalisant sur l'étude de traits portant sur la quantité de ponctuations ainsi que leur structure, nous faisons le constat que la plasticité et la variabilité inter-spécifique de la vulnérabilité à la cavitation reposent sur des bases structurelles différentes. En effet, les variations de l'ultrastructure des ponctuations sont l'un des déterminants majeurs du P_{50} lorsque l'on compare les espèces entre elles (Jansen *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2016). Cependant, dans le cas de la plasticité, nos résultats ne mettent pas en évidence de changement de structure des ponctuations en lien avec un changement de P_{50} . Notre étude associe la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation à un changement d'organisation du xylème, avec des vaisseaux plus grands et porteurs d'une plus grande surface de ponctuations dans les xylèmes vulnérables. Par une analyse en observation directe par microtomographie à rayon X menée à l'échelle du vaisseau, nous avons pu déterminer que la diminution de la vulnérabilité à la cavitation est le fait d'un changement de l'impact de l'embolie sur la perte de conductance à l'échelle du xylème et non le fait d'un changement de vulnérabilité à la cavitation du vaisseau en lui-même.

La plasticité mesurée chez le peuplier pour la vulnérabilité à la cavitation du xylème dans ce premier chapitre est importante puisqu'en passant de - 2,27 à - 3,04 MPa entre les moyennes des plants issus des conditions de croissance SW et LD, le P_{50} a diminué de 34 %. Mais ce n'est pas parce qu'un trait varie beaucoup qu'il est important, ainsi se pose la question de l'impact de ce changement de P_{50} sur la survie d'un arbre placé en situation de sécheresse extrême. Car si jusqu'ici nous avons focalisé nos recherches sur la question de la vulnérabilité à la cavitation du xylème, nous avons vu en introduction de cette thèse que ce trait n'est pas le seul impliqué dans la sûreté hydraulique.

Dans un second chapitre, nous nous posons donc la question de l'importance de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation au regard de la plasticité d'autres traits. Nous nous concentrons sur la plasticité de traits foliaires, car, en permettant le contrôle des pertes en eau, ces traits sont impliqués dans la sûreté hydraulique. Pour induire une acclimatation à une contrainte hydrique, nous reprendrons un dispositif expérimental similaire à celui présenté en

premier chapitre, avec des peupliers en conditions de croissance contrastées pour l'eau du sol. Concernant le phénotypage des traits foliaires, nous pourrons nous appuyer sur de nouvelles méthodes (Brodrigg *et al.*, 2017 ; Cartailier *et al.*, 2018). Nous caractériserons ainsi le degré de plasticité d'un certain nombre de traits foliaires en réponse à la contrainte hydrique. Puis par l'utilisation d'un modèle reproduisant le fonctionnement des arbres en situation de sécheresse (Martin St-Paul *et al.*, 2017), nous étudierons l'importance relative de ces différents traits pour permettre de retarder le dysfonctionnement hydraulique lors d'une sécheresse extrême.

Chapitre 2 : Implication de traits fonctionnels dans la réponse à la sécheresse

I. INTRODUCTION

De nombreux phénomènes de dépérissements de massifs forestiers dus à la sécheresse sont observés à travers le globe (Allen *et al.*, 2010). Les modélisations des climats futurs indiquent que l'on doit s'attendre à une aggravation du phénomène dans les décennies à venir (Allen *et al.*, 2015). Étudier les mécanismes à l'origine de la mortalité due à la sécheresse est donc une piste de recherche essentielle (Adams *et al.*, 2017 ; Choat *et al.*, 2018). Une sécheresse se caractérise par une diminution des potentiels hydriques des plantes (Steudle, 2001), avec, dans les cas extrêmes, des forces de tension menant à l'embolie des vaisseaux (Cochard *et al.*, 2008 ; Cochard & Delzon, 2013). Lorsque la perte de conductance associée à l'embolie est trop élevée, un point de non-retour est atteint, qui mènera à la mort de l'individu (Barigah *et al.*, 2013 ; Adams *et al.*, 2017). De ce fait, contrôler les relations hydriques afin de ne pas atteindre ces niveaux d'embolie, et donc assurer la sûreté hydraulique, est un point essentiel dans la stratégie de survie des arbres (Brodribb *et al.*, 2014).

Plusieurs traits sont potentiellement impliqués dans la sûreté hydraulique et sont également liés à la résistance à la sécheresse. Le plus connu est le contrôle stomatique (Tardieu & Simonneau, 1998 ; Brodribb *et al.*, 2014), ou encore le point de perte de turgescence, représentant le potentiel à partir duquel les cellules de garde perdent leur turgescence et donc le stomate ne peut plus s'ouvrir (Bartlett *et al.*, 2012). Lorsque les stomates sont fermés, c'est la conductance stomatique minimale, c'est-à-dire les pertes en eau par diffusion à travers la cuticule ou des stomates mal fermés, qui jouerait un rôle important dans la résistance à la sécheresse (Schuster *et al.*, 2016 ; Schuster *et al.*, 2017). La vulnérabilité du xylème à la cavitation, quantifiée par le P_{50} (le potentiel pour lequel le xylème perd 50 % de sa conductance) est aussi un trait important de sûreté hydraulique et de résistance à la sécheresse (Maherali *et al.*, 2004 ; Blackman *et al.*, 2012 ; Lens *et al.*, 2013 ; Larter *et al.*, 2017). Bien évidemment,

d'autres traits peuvent aussi assurer la sûreté hydraulique : profondeur et densité racinaires, surface foliaire, densité stomatique etc.

En comparant le potentiel de fermeture stomatique et le potentiel de non-retour (P_{88}), il a été montré que les plantes fonctionnent en limite de rupture (Meinzer *et al.*, 2009 ; Choat *et al.*, 2012). De ce fait, cela pose la question des capacités de maintien des forêts dans un contexte climatique changeant (Allen *et al.*, 2015). Il a été montré que le P_{50} , le trait considéré comme majeur dans la résistance à la sécheresse (Cochard *et al.*, 2008 ; Lens *et al.*, 2013), pouvait varier par plasticité phénotypique en réponse à une contrainte hydrique (Awad *et al.*, 2010). Cependant, les faibles variations de P_{50} observées dans le cas de la plasticité phénotypique sont sans commune mesure avec les variations extrêmement importantes observées en comparant les espèces entre elles (Delzon *et al.*, 2010 ; Anderegg, 2015), ce qui pose question quant à la capacité de la plasticité du P_{50} à effectivement retarder le dysfonctionnement hydraulique (Allen *et al.*, 2015). De plus, le P_{50} n'est pas le seul à varier par plasticité phénotypique en réponse à une contrainte hydrique. Les traits susmentionnés font de ce fait l'objet d'une attention particulièrement intense ces dernières années, et leur suivi permet de comprendre les stratégies et coordinations entre traits mises en place par les plantes par plasticité phénotypique, en réponse à un stress hydrique (Cardoso *et al.*, 2018 ; Creek *et al.*, 2018), permettant d'assurer la survie même dans des conditions particulièrement stressantes (McDowell *et al.*, 2019). Toutefois, notons que notre étude propose une combinaison inédite de traits dans le cas de l'acclimatation à la sécheresse. Pour comprendre les capacités d'adaptation des forêts à un climat plus contraignant, il est indispensable de connaître l'apport de résistance à la sécheresse lié à la variation du P_{50} , tout en le mettant en relation avec les gains de résistance obtenus par les variations des autres traits (Skelton *et al.*, 2019). L'utilisation de modèles permet d'atteindre cet objectif (Gleason *et al.*, 2014 ; Blackman *et al.*, 2016 ; Martin-StPaul *et al.*, 2017), avec pour la première fois l'utilisation du modèle SurEau dans le cas de l'acclimatation à la sécheresse.

L'objectif de cette étude est d'explorer le degré de plasticité de différents traits de sûreté hydraulique puis d'analyser la contribution de chacun d'entre eux dans l'acclimatation du plant à la sécheresse. Dans un premier temps, des jeunes plants de peuplier ont été mis en croissance en serre sous deux conditions hydriques contrastées (favorable et sous contrainte) puis des mesures de traits ont permis de caractériser la réponse par plasticité phénotypique chez cette espèce. Dans un second temps, un modèle mécaniste (SurEau) simulant le fonctionnement hydraulique des arbres en situation de sécheresse sera utilisé. Il permettra d'estimer l'effet de l'acclimatation des plants sur le gain de résistance à la sécheresse, évalué comme le gain de

Tableau 1 : Paramètres d’entrée du modèle pour les conditions pédoclimatiques de croissance.

Paramètre	Température air mini	Température air maxi	RH air mini	RH air maxi	PAR maxi	Vent	Taille du pot
Unité	°C	°C	%	%	μmol.m ⁻² .s ⁻¹	m.s-1	L
Cycle jour-nuit	18,00	28,00	25,00	60,00	400	1,00	10
Conditions constantes	NA	28,00	NA	60,00	400	1,00	10

Ces données sont celles qui ont été relevées lors de l’expérimentation d’acclimatation des peupliers dans le chapitre 1 (Lemaire *et al.* soumis).

temps avant d'atteindre le point de non-retour, fixé à 88 % de perte de conductance (Barigah *et al.*, 2013 ; Martin-StPaul *et al.*, 2017). Enfin, une analyse de sensibilité sera également conduite afin de quantifier l'importance de chaque trait considéré isolément.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Dispositif expérimental :

Conditions de croissance : Une partie du dispositif expérimental a déjà été précédemment décrite (Lemaire *et al.*, *soumis*). Brièvement, nous avons utilisé des peupliers hybrides (*Populus tremula* x *alba* clone INRA 717-1B4) qui ont été multipliés *in vitro* puis replantés en pot de 10 L remplis de terreau et placés en serre. Les plants ont été séparés en 3 lots correspondant chacun à une condition de croissance. Dans cette étude, nous nous concentrerons sur deux conditions de croissance :

- Plants « LW » (full Light, well Watered) : les plants se sont développés en conditions hydriques favorables, arrosés à capacité au champ.
- Plants « LD » (full Light, Droughted) les plants se sont développés en conditions hydriques contraintes, afin d'induire une acclimatation en réponse à un stress hydrique. L'irrigation était en effet maintenue à 25-30 % de la capacité au champ.

Les plants ont été placés en croissance en serre à partir de mai 2017. Ces conditions sont suffisamment contraignantes pour induire des potentiels hydriques de base et minimums significativement plus bas chez les plants LD (Lemaire *et al.*, *soumis*).

La température et l'humidité relative en serre étaient suivies de façon continue durant toute la durée de l'expérience par un capteur de température/humidité relative (HOBO UX 100, Onset Computer, Bourne, MA, USA). Le PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) a été suivi durant le mois de juin par deux capteurs d'intensité lumineuse (PAR/CBE 80, Solems, Palaiseau, France). Les valeurs de température, d'humidité relative et de PAR correspondent arbitrairement aux valeurs journalières hautes et basses mesurées sur une période de plusieurs jours (pics exclus). Ces données de conditions de croissance seront celles utilisées pour définir les conditions pédoclimatiques dans la simulation du modèle SurEau (Tableau 1). Deux plants LW ont également été placés sur balances à partir de 25 juillet 2017 afin de suivre leur transpiration. L'évapotranspiration quotidienne a été calculée comme étant la moyenne de l'eau perdue quotidiennement sur 30 jours, du 26 juillet au 24 août 2017. Nous avons retenu cette

période car c'était celle pendant laquelle les plants étaient les plus grands et donc les plus proches des plants virtuels simulés par le modèle.

Echantillonnage : un premier échantillonnage a été effectué le 28 août 2017. Une partie de la méthode employée et des résultats ont déjà été décrits (Lemaire *et al.*, *soumis*). De cet échantillonnage, nous retirons des mesures de hauteur, de diamètre, de surface foliaire (LA), de conductivité hydraulique spécifique (K_s) et de vulnérabilité à la cavitation sur tiges. Les pots avec les tiges des plants ont été laissés en place durant l'hiver 2017-2018. A partir d'avril 2018, les plants ont été recépés à 25 cm et ils ont repris leur croissance dans des conditions inchangées. À partir du 02 juillet 2018, pour chacune des deux conditions de croissance les plants ont été divisés en deux lots :

- Les plants du premier lot ont servi à des mesures de vulnérabilité à la cavitation sur feuilles. Il s'agissait d'une méthode destructive qui nécessitait de sacrifier les plants.

- Les plants du second lot ont servi à des mesures de conductivité hydraulique spécifique (K_s), de conductance minimale (g_{min}) et de point de perte de turgescence (Ψ_{TLP}). Les tiges d'environ 190 cm ont été coupées à 25 cm de hauteur. Elles sont placées sous l'eau, et un premier segment de 30 cm a été éliminé, pour supprimer la partie de la tige embolisée par le prélèvement. Puis, un échantillon de tige de 50 cm a été coupé sous l'eau et il a servi à des mesures de conductivité hydraulique spécifique (décrites par Lemaire *et al.*, *soumis*). Des feuilles matures ont été prélevées, à partir de la huitième feuille en partant de l'apex : deux ont servi aux mesures de Ψ_{TLP} et six ou sept ont servi à estimer le g_{min} .

Les plants du second lot ont à nouveau été laissés en croissance en serre jusqu'au 20 septembre 2018 où un dernier échantillonnage a été réalisé. Les tiges d'environ 140 cm ont été coupées à 20 cm de hauteur. Puis les tiges ont été placées sous l'eau et un premier segment à 30 cm de la coupure est éliminé. Puis, un segment de 50 cm a été coupé sous l'eau et stocké à 4 °C, emballé dans du papier absorbant humide et dans un sac plastique opaque fermé hermétiquement. Il a servi aux mesures de vulnérabilité à la cavitation sur tige.

2) Vulnérabilité à la cavitation sur tiges

Juste avant la mesure, les échantillons de 50 cm ont été recoupés sous eau à 43 cm de long en utilisant une lame de rasoir. La vulnérabilité à la cavitation a été évaluée par méthode du Cavitron (Cochard, 2002 ; Cochard *et al.*, 2005) en utilisant une centrifugeuse modifiée

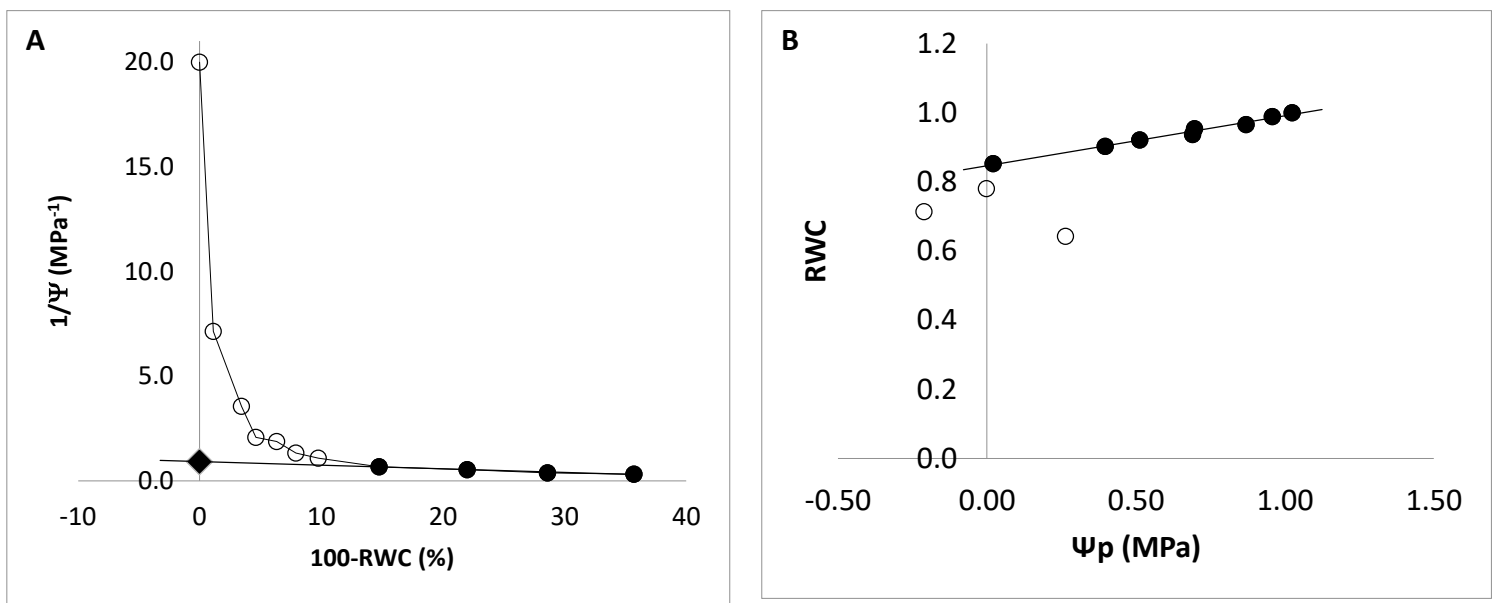


Figure 53 : Courbe pression-volume pour calculer le point de perte de turgescence. La courbe se fait sur une même feuille, chaque point blanc et noir représente une mesure de potentiel hydrique et de masse. A : Relation $1/\psi$ vs 100-RWC. La partie linéaire (points noirs) représente la relation une fois que le point de perte de turgescence est dépassé. L'inverse du potentiel osmotique à pleine turgescence ($1/\pi_0$) est l'ordonnée à l'origine de la partie linéaire de la courbe (losange noir). B : Relation entre RWC vs ψ_p (potentiel hydrostatique). Le module d'élasticité (ϵ) est la pente de la partie linéaire de la courbe (points noirs).

(Sorvall RC3C, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et une solution de référence, 10 mM KCl et 1 mM CaCl₂ dans de l'eau ultrapure (Cochard *et al.*, 2009). Une fonction sigmoïde est utilisée pour ajuster chaque courbe en utilisant la fonction suivante (Pammenter & Van der Willigen, 1998) :

$$PLC = \frac{100}{1 + e^{\frac{Pente_{Tige}(P - P_{50-Tige})}{25}}}$$

Avec $P_{50-Tige}$ la pression causant 50 % de perte de conductance et $Pente_{Tige}$ la pente de la courbe en ce point.

3) Potentiel de perte de turgescence

La mesure du potentiel de perte de turgescence (Ψ_{TLP}) a été faite par méthode de la chambre à pression (Tyree & Hammel, 1972 ; Sack *et al.*, 2003). Deux feuilles ont été prélevées par individu afin d'assurer des répétitions de mesure. Leur surface foliaire a été mesurée au planimètre (Li-3100c, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) puis elles ont été placées dans un bécher d'eau toute une nuit, pétiole immergé afin de les réhydrater à pleine turgescence. Nous avons successivement mesuré la masse à l'aide d'une balance de précision (Scout Pro SPU 123, Ohaus Corporation, Parsippany-Troy Hills, NJ, États-Unis) et le potentiel hydrique ($\Psi_{Feuille}$) à l'aide d'une chambre à pression (1505D, PMS Instrument, Albany, OR, USA). Ces mesures ont été répétées à un intervalle de temps permettant à la feuille de perdre environ 0,3 MPa. Pour éviter que le potentiel hydrique n'évolue le temps de la mesure de masse, la feuille était enfermée dans un sachet plastique étanche. En fin d'expérience, les feuilles ont été mises à sécher 72 h à 65 °C en étuve (Binder, Tuttlingen, Allemagne) à l'issue de quoi nous avons effectué une pesée de masse sèche à l'aide d'une balance de précision (BP 210 S, Sartorius, Göttingen, Allemagne). Il est ainsi possible de calculer la teneur en eau des feuilles ($RWC_{Feuille}$).

Les paramètres des courbes pression-volume ont été estimés à partir de la relation $100-RWC_{Feuille}$ versus $\frac{1}{\Psi_{Feuille}}$ selon des méthodes publiées précédemment (Tyree, 1981 ; Tyree & Richter, 1981 ; Sack *et al.*, 2003). Le potentiel osmotique à pleine turgescence (π_0 , en MPa) est calculé comme étant l'ordonnée à l'origine de la partie linéaire lorsque le point de turgescence est dépassé et donc que $\frac{1}{\psi} = \frac{1}{\psi_{\pi}}$ (Fig. 53.A) (Tyree & Richter, 1981). Le module d'élasticité isostatique (ϵ , en MPa) est la pente avant le point de perte de turgescence dans la relation $RWC_{Feuille}$ versus le potentiel hydrostatique Ψ_p (Fig. 53.B) (Tyree, 1981). À partir de ces deux paramètres, Ψ_{TLP} a été calculé d'après la relation suivante :



Figure 54 : Dispositif prototype « Drought Box », utilisé pour le phénotypage du $g_{\min}$ de feuilles de peuplier. Dans cette enceinte isolée, humidité relative et température sont finement contrôlées. Le suivi de la perte de masse des feuilles par les jauges de contraintes auxquelles elles sont suspendues permet de calculer leur conductance minimale.

$$\psi_{TLP} = \frac{\pi_0 \times \varepsilon}{\pi_0 + \varepsilon}$$

Le point de perte de turgescence a été mesuré pour cinq individus LD et six individus LW ; deux répétitions par individus.

4) Mesure de la conductance minimale

La mesure de la conductance minimale (ou transpiration résiduelle ; $g_{\min}$) des feuilles a été caractérisée à l'aide d'un dispositif prototype conçu spécialement pour ce type de mesure (Cartailler *et al.*, 2018 ; Billon *et al.*, en préparation). Pour chaque individu à caractériser, un lot de 6 à 7 feuilles, dont la surface totale a été mesurée à l'aide d'un planimètre (Li-3100c, Li-Cor Biosciences), est placé dans un bécher d'eau toute une nuit pétiole immergé afin de les réhydrater. Le lendemain, les échantillons de feuilles étaient placés dans une enceinte climatique conçue *ad hoc* et permettant de maintenir des conditions climatiques contrôlées et constantes (Température : 30 °C ; Humidité relative : 42 %) (Cartailler *et al.*, 2018). Dans cette enceinte, des bouquets de 6 à 7 feuilles étaient placés sur des jauges de contraintes (Fig. 54). La transpiration (E) est calculée selon la relation suivante :

$$E = \frac{\Delta n_{eau}}{\Delta t \times LA}$$

Avec Δn_{eau} la quantité d'eau perdue par l'échantillon (en mmol) pendant le laps de temps Δt (en s) et LA la normalisation par la surface foliaire totale du lot de feuilles (en m²). À partir de cette relation, il est possible de calculer le $g_{\min}$:

$$g_{\min} = \frac{E}{VPD} \times P_{atm}$$

Avec le VPD atmosphérique dans l'appareil (2,44 kPa) et P_{atm} la pression atmosphérique (101,6 kPa).

$g_{\min}$ a été mesuré pour cinq individus LD et six individus LW ; avec au moins deux répétitions par individu.

5) Vulnérabilité à la cavitation des feuilles

Nous avons déterminé la vulnérabilité à la cavitation des feuilles par méthode optique (Brodribb *et al.*, 2016 ; Lamarque *et al.*, 2018). Le plant a été déraciné la veille et rincé à l'eau afin de retirer le maximum de sol possible. Il a ensuite été laissé une nuit avec les racines dans

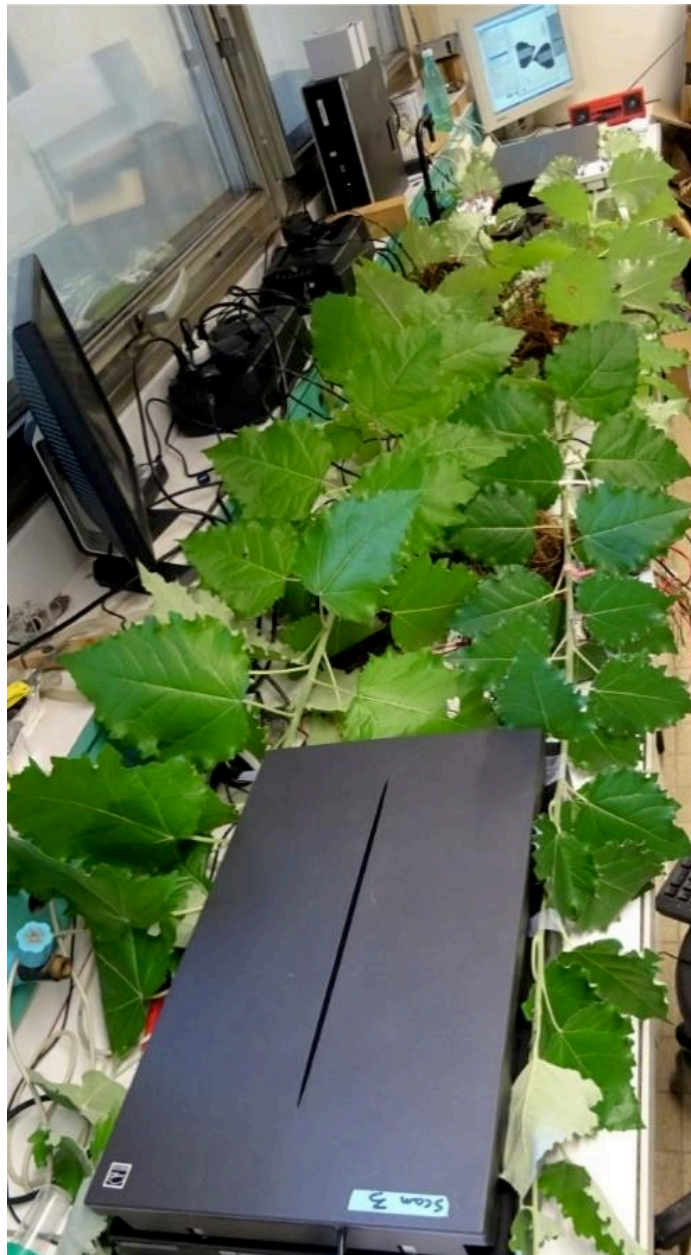


Figure 55 : Installation permettant la mesure de la vulnérabilité à la cavitation du xylème de feuilles de peuplier par méthode de vulnérabilité optique. Pour chaque plant, une feuille est placée dans le scanner. Deux plants sont installés par scanner.

un sac plastique avec du papier humide afin d'éviter leur dessèchement et afin de laisser les potentiels s'équilibrer dans tous les organes. Le lendemain, les plants ont été installés sur une paille. Un suivi de potentiel hydrique a été assuré par une mesure 2 à 3 fois par jour à la chambre à pression (1505D, PMS Instrument). Les potentiels suivant une évolution linéaire dans le temps, nous avons extrapolés les points situés entre deux mesures à la chambre à pression. Les événements de cavitation ont été suivis par scanner (V800, Epson, Nagano, Japan) paramétré pour une prise d'image en mode « film », ce qui permet de capturer les images en utilisant une lumière transmise à travers la feuille (Fig. 55). Durant toute l'expérience, une image était prise toutes les 5 minutes grâce à un logiciel spécialement conçu à cet effet EMBOLIVE_CaviScan (Université de Bordeaux, Bordeaux, France).

Les images acquises ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji (under ImageJ version 2.0.0-rc-68/1.52h) (Schindelin *et al.*, 2012 ; Schneider *et al.*, 2012). Le principe consiste en la soustraction des images deux à deux de façon à n'observer que les différences entre les deux images successives : les changements correspondent aux événements de cavitation. En effet, dans les vaisseaux remplis d'air la lumière transmise est diffractée et conduit donc à un signal lumineux significativement plus faible au niveau des vaisseaux embolisés (Brodribb *et al.*, 2016). Nous nous sommes concentrés sur les événements de cavitation ayant lieu sur la nervure centrale car elle est la première à être totalement embolisée, conduisant à une déconnexion hydraulique entre la tige et les nervures inférieures. Ainsi les événements de cavitation successives dans ces dernières n'ont plus de conséquence sur la tige. Pour chaque image, l'aire totale des événements de cavitation sur la nervure centrale est comptabilisée. Il est alors possible de construire des courbes de vulnérabilité ajustant les valeurs d'événements de cavitation et de potentiel hydrique selon une fonction de Weibull (voir « *Vulnérabilité à la cavitation sur tiges* »), permettant d'extraire les paramètres d'ajustement de la courbe $P_{50-Feuille}$ et $Pente_{Feuille}$.

La vulnérabilité à la cavitation des feuilles a été estimée sur cinq individus LW et quatre individus LD.

6) Simulations avec le modèle SurEau

Le modèle SurEau (Cochard, 2019 ; Martin-StPaul *et al.*, 2017) permet de simuler le comportement hydraulique d'un arbre en situation de sécheresse. Ce modèle mécaniste est basé sur une série d'équations régissant les relations hydriques et le fonctionnement d'une plante virtuelle placée en condition de sécheresse progressive (Martin-StPaul *et al.*, 2017). La version

Tableau 2 : Paramètres d'entrée du modèle représentant les plants LW et LD simulés.

Paramètre	<i>Surface foliaire</i>	<i>Hauteur</i> ¹	<i>Diamètre</i> ¹	g_s ³	g_{min}	ε	π_0	K_s - branche ³	P_{50} -Feuille	$Pente_{Feuille}$	P_{50} -Tige ²	$Pente_{Tige}$ ²
Unité	m ²	m	mm	mmol. m ⁻² .s ⁻¹	mmol.m ⁻² . s ⁻¹	MPa	MPa	mmol.m ⁻² . s ⁻¹ .MPa ⁻¹	MPa	%.MPa ⁻¹	MPa	%.MPa ⁻¹
LW	0,80	1,69	14,0	300	4,31	8,19	-1,04	1.10 ⁶	- 1,79	129,40	- 2,46	104,67
LD	0,38	2,24	9,5	300	3,66	8,59	- 1,20	1.10 ⁶	- 2,11	343,57	- 2,95	120,3

Les données proviennent de mesures réalisées dans le cadre de cette présente étude ou, pour les paramètres marqués d'un ¹, déjà publiées dans Lemaire et al. (soumis) ; pour les paramètres marqués d'un ², moyennes des données publiées par Lemaire *et al.* (2019) et des données issues de cette présente étude et pour les paramètres marqués d'un ³, valeurs fixées en cohérence avec les valeurs mesurées, utilisées pour ajuster le modèle.

du modèle utilisé était SurEau_C (version 13-06-2019), dont une version antérieure a déjà été utilisée ailleurs (Scoffoni *et al.*, 2018). Cette version simule un cycle jour-nuit, ce qui permet de se rapprocher des conditions réellement expérimentées par les plants (Cochard, 2019). Nous avons utilisé le modèle en utilisant le potentiel de perte de turgescence (Ψ_{TLP}) comme point de fermeture stomatique.

Les conditions climatiques telles que décrites précédemment ont servi de paramètres d'entrée du modèle pour décrire les conditions pédoclimatiques (Tableau 1). Les paramètres décrivant les plantes simulées étaient issus des mesures effectuées en serre, moyennées pour chacune des deux conditions de croissance (Tableau 2). Le modèle permet de suivre les relations hydriques sur la durée de la simulation. Mais son principal paramètre de sortie est le temps nécessaire avant d'atteindre 88 % d'embolie dans la tige (considéré comme seuil de dysfonctionnement hydraulique létal ; t_{HF}) (Martin-StPaul *et al.*, 2017 ; Cochard, 2019).

7) Statistiques

Pour chaque trait mesuré, le pourcentage de variation est toujours effectué en comparaison à la valeur mesurée sur le plant en conditions favorables (LW) (Tableau 2, ligne 1). Il en va de même pour le temps avant dysfonctionnement hydraulique, dont les valeurs présentées sont systématiquement comparées à la valeur t_{HF} obtenue lors de la simulation d'un plant en conditions favorables (LW). Les relations sont les suivantes :

$$\text{Variation du trait (en \%)} = \frac{\text{Valeur}_{\text{trait(LD)}} - \text{Valeur}_{\text{trait(LW)}}}{\text{Valeur}_{\text{trait(LW)}}} \times 100$$

$$\text{Variation de } t_{HF} \text{ (en \%)} = \frac{t_{HF(LD)} - t_{HF(LW)}}{t_{HF(LW)}} \times 100$$

Les moyennes ont été comparées par test t de Student sur échantillons indépendants ou sur échantillons appariés, en utilisant le logiciel RStudio (version 1.1.456; running under R core version 3.5.1, R Development Core Team, 2008).

III. RÉSULTATS

Les traits fonctionnels étudiés présentent un écart parfois important entre conditions de croissance (jusqu'à 50 % de réduction dans le cas de la surface foliaire) (Tableau 3). Toutefois, seules les différences pour le P_{50} et surface foliaire apparaissent significativement différentes

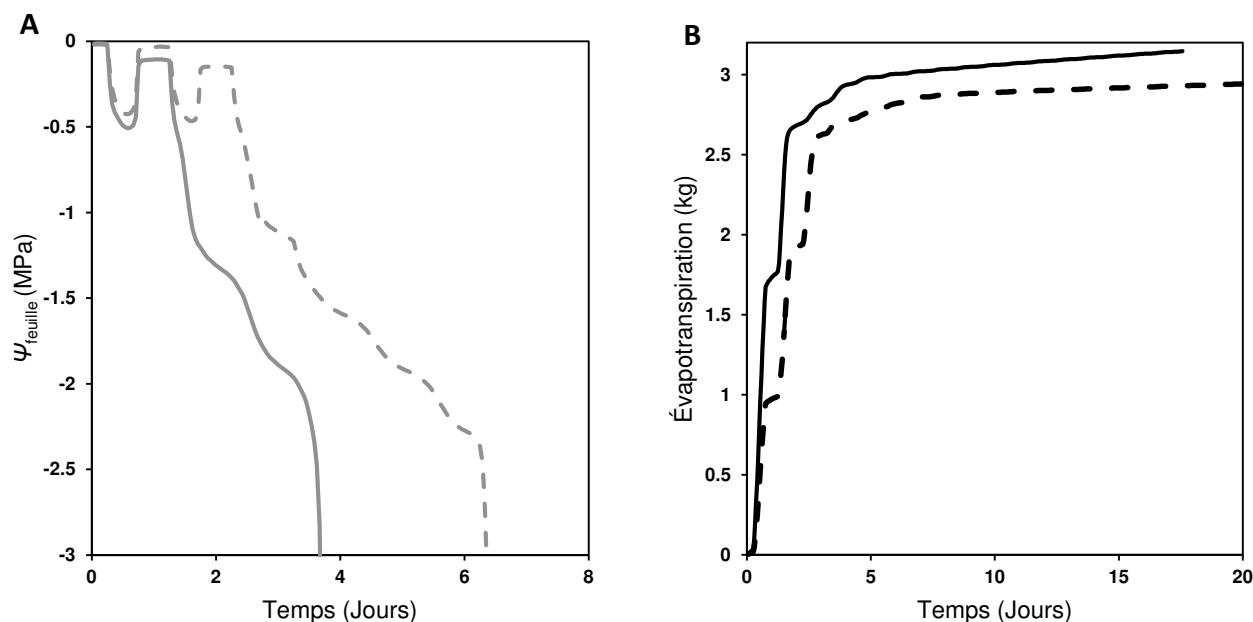


Figure 56 : Simulation d'évolution de trois traits d'après le modèle SurEau. Pas de temps utilisé pour les calculs du modèle: un point toutes les 0,01 sec ; pas de temps en sortie : un point par heure. A. : Evolution du potentiel hydrique foliaire en fonction du temps. B. : Evolution de la quantité d'eau cumulée transpirée en fonction du temps. La couleur renseigne sur l'organe suivi : feuilles (gris) et tiges (noir). Le type de courbe indique la condition de croissance des plants : LW (ligne pleine) et LD (ligne pointillée).

Tableau 3 : Traits fonctionnels des peupliers cultivés sous deux conditions de croissance contrastées pour l'irrigation.

Trait	LW	LD
Surface foliaire (m ²)	0,797 ± 0,107	0,377 ± 0,116 *
$g_{\min}$ (mmol.m ⁻² .s ⁻¹)	4,31 ± 0,40	3,66 ± 0,48 ^{ns}
Ψ_{TLP} (MPa)	- 1,21 ± 0,26	- 1,40 ± 0,10 ^{ns}
$P_{50-Feuille}$ (MPa)	- 1,79 ± 0,67	- 2,11 ± 0,18 ^{ns}
$P_{50-Tige}$ (MPa)	- 2,46 ± 0,06	- 2,95 ± 0,20 *
HSM (MPa)	1,25 ± 0,29	1,48 ± 0,26 ^{ns}

Les données sont des valeurs moyennes par condition ± écart-type. L'exposant sur les données de la colonne « LD » représente la significativité de la différence avec les données des plants « LW » (test *t* de Student) : ^{ns} différences non significatives, * *p*-value < 0,001.

entre nos deux conditions de croissance. Pour chacun des autres traits étudiés, les différences n'étaient pas significatives même si elles étaient parfois importantes (toutes supérieures à 10 % de variation entre les deux conditions). Dans le cas du $g_{\min}$, le test était marginalement significatif ($p = 0,062$) et dans le cas du P_{50} -Feuille nous pouvons attribuer l'absence de vulnérabilité à une valeur aberrante due à un individu LW particulièrement résistant à la cavitation. Dans ces deux cas, il est possible qu'un nombre trop faible d'échantillons pour caractériser finement ces traits soit à l'origine de l'absence de significativité. Un test t de Student sur échantillon apparié montre que les différences entre P_{50} de tige et foliaires sont significatives ($t = 10,77$; $p < 0,01$; données non représentées graphiquement). Il y a donc présence de segmentation hydraulique entre feuille et tige chez le peuplier.

Une simulation utilisant le modèle pour les plants issus des deux conditions permet d'explorer le comportement modélisé de nos plants virtuels (Fig. 56). En se concentrant sur les premières 24h, nous pouvons caractériser le fonctionnement des plants en conditions favorables, avant que le stress hydrique dû à la sécheresse n'affecte leur fonctionnement. Nous pouvons observer une diminution du potentiel dans la journée, avec un potentiel minimum de - 0,51 MPa atteint à 13 h 40 pour la condition bien irriguée (LW). Cette valeur est à mettre en relation avec la valeur de potentiel minimum mesuré en serre, $\Psi_{\min} = - 0,98$ MPa en moyenne pour cette même condition (Fig. 56.A ; Lemaire *et al.*, *soumis*). Un suivi de la transpiration montre que le plant LW virtuel transpire 1,73 kg d'eau en 24h (Fig. 56.B ; Lemaire *et al.*, *soumis*), ce qui est le double de la valeur mesurée en serre ($0,933 \text{ kg.jour}^{-1}$; donnée non représentée graphiquement).

Le modèle SurEau permet un suivi de l'évolution dans le temps de certains paramètres, notamment de la perte de conductance, dont les hauts niveaux sont associés à de la mortalité (Brodribb & Cochard, 2009 ; Barigah *et al.*, 2013 ; Urli *et al.*, 2013). La segmentation hydraulique entre feuille et tige constatée pour nos plants permet de nettement retarder l'embolie totale des tiges puisque si les feuilles sont embolisées à 99 % en 3 à 6 jours, les pertes en eau sont très réduites car restreintes exclusivement aux tiges (Fig. 57). Ainsi, ce n'est qu'au bout de 17 et 32 jours, respectivement dans les conditions LW et LD, que les tiges atteignent ces niveaux d'embolie. Le paramètre de sortie utilisé pour comparer les différentes simulations entre elles est la durée de sécheresse avant d'atteindre 88 % de perte de conductance dans le xylème, aussi appelé temps avant dysfonctionnement hydraulique, t_{HF} (*time to hydraulic failure*). Dans le cas de la simulation standard du modèle sur les deux conditions de croissance LW et LD, on constate que l'acclimatation du plant LD aux contraintes hydriques a permis de

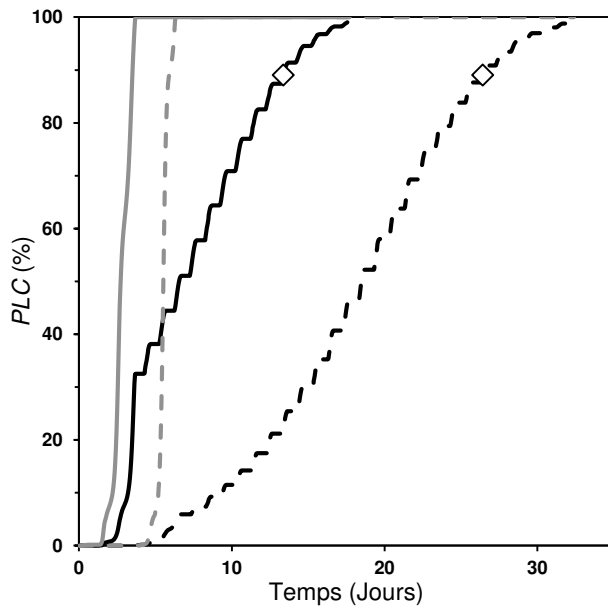


Figure 57 : Evolution temporelle de la perte de conductance simulée par le modèle SurEau. Le seuil de dysfonctionnement hydraulique létal t_{HF} de la plante ($PLC_{tige} = 88 \%$; Temps = t_{HF}) est repéré pour chacune des deux conditions de croissance par des losanges blancs. La couleur renseigne sur l'organe suivi : feuilles (gris) et tiges (noir). Le type de courbe indique la condition de croissance des plants : LW (ligne pleine) et LD (ligne pointillée).

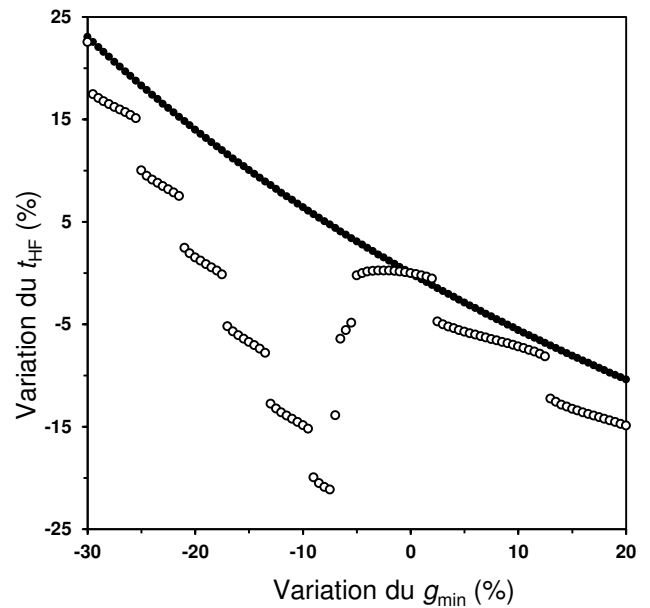


Figure 58 : Impact simulé de la variation de g_{min} sur le temps avant dysfonctionnement hydraulique létal t_{HF} . Chaque point correspond à une simulation d'un plant LW, en faisant varier uniquement la valeur de g_{min} dans les paramètres de départ. La couleur du figuré renseigne sur les conditions météorologiques utilisées par le modèle : blanc, modèle SurEau classique avec simulation du cycle jour-nuit et noir, avec conditions météorologiques constantes, égales à un midi solaire permanent. La couleur renseigne sur l'organe suivi : feuilles (gris) et tiges (noir). Le type de courbe indique la condition de croissance des plants : LW (ligne pleine) et LD (ligne pointillée).

doubler le t_{HF} en comparaison des individus non acclimatés LW, t_{HF} passant de 13,28 jours à 26,33 jours (Fig. 57).

Une analyse de sensibilité permet de constater l'effet que provoque la variation d'un et un seul paramètre sur le t_{HF} et ainsi d'estimer sa contribution dans l'augmentation de la résistance à la sécheresse liée à l'acclimatation du peuplier. Lorsque l'on utilise comme paramètres initiaux ceux d'un plant témoin et que l'on fait varier uniquement le g_{min} d'un faible pourcentage, on peut mesurer le gain ou la perte relative en temps avant dysfonctionnement hydraulique (Fig. 58). On constate que t_{HF} suit un schéma cyclique en fonction des variations de g_{min} dans les paramètres de départ. Cette cyclicité est due à l'alternance jour-nuit et aux fortes variations de déficit de pression de vapeur d'eau (VPD) qui l'accompagnent. L'amplitude des cycles est telle que le résultat t_{HF} d'une simulation pour une valeur donnée de g_{min} est stochastique. Ainsi, afin d'avoir des résultats fiables et comparables entre eux, il est nécessaire de réduire au maximum le « bruit » dû à l'alternance jour-nuit. La piste retenue consiste en un changement des paramètres météorologiques de manière à éliminer le cycle jour-nuit. Cette décision empêche de comparer les simulations à des conditions réelles mais a l'avantage de permettre la comparaison des simulations entre elles. Lorsque les conditions météorologiques simulées sont constantes et égales au maximum journalier, t_{HF} suit une évolution exponentielle en fonction des variations de g_{min} . Le cycle journalier à l'origine de la valeur stochastique de t_{HF} en fonction des conditions initiales a bien été exclu de la modélisation. Concernant le comportement des plants simulés sous cette modalité, la valeur de t_{HF} en fonction des conditions de croissance est également doublée entre les plants LW avec un $t_{HF} = 7,48$ jours et les plants LD avec un $t_{HF} = 15,94$ jours (non représenté graphiquement). Ainsi, pour les analyses suivantes nous utiliserons le modèle avec des conditions météorologiques constantes. Cela se rapproche de la version du modèle initialement publiée par Martin-StPaul *et al.* (2017) qui n'incluait pas de cycle jour-nuit.

L'utilisation du modèle apporte des possibilités que nous ne pourrions pas tester *in planta*. Une analyse de sensibilité a été menée afin de tester l'impact de chaque trait individuellement sur le t_{HF} . Pour cela, nous avons considéré un plant LW (Tableau 2 ligne 1) pour lequel nous avons remplacé la valeur d'un trait par celle mesurée chez les plants LD (Tableau 2 ligne 2). Cette simulation a été reproduite pour chacun des traits considérés dans cette analyse (Tableau 3). À noter que dans le cas de la vulnérabilité à la cavitation, ce n'est pas seulement le P_{50} qui a été testé mais l'ensemble des paramètres de la courbe de vulnérabilité, $P_{50} + Pente$.

La surface foliaire est fortement réduite entre les plants LW et LD (- 52,68 %) et le modèle nous indique que cette réduction permet une augmentation de 22,23 % du t_{HF} (Fig. 59). La

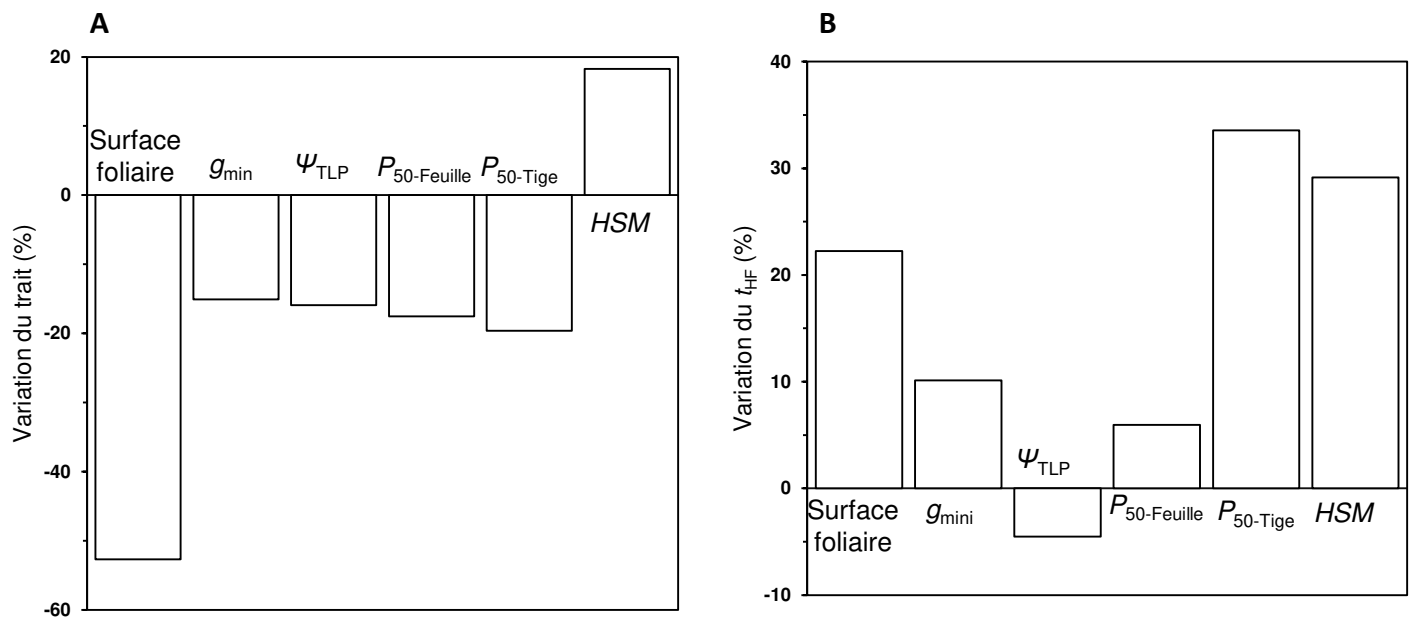


Figure 59. Variations de traits de sureté hydrauliques entre peupliers cultivés sous des régimes hydriques contrastés (A) et impact de chacune de ces variations sur t_{HF} (B). A. : Variation mesurée entre plants témoins LW et plants acclimatés LD sur certains traits fonctionnels. Pour chaque trait, les valeurs obtenues ont été moyennées par conditions puis la variation a été calculée selon le rapport $(LD-LW)/LW * 100$. Mesure de surface foliaire sur 5 (LW) et 9 (LD) plants ; g_{min} sur 6 (LW) et 5 (LD) plants ; ψ_{TLP} sur 6 (LW) et 5 (LD) plants ; $P_{50-Feuilles}$ sur 9 (LW) ; 10 (LD) plants, $P_{50-Tige}$; *HSM* sur 5 (LW) et 5 (LD) plants. B. : Variations simulées de changement de temps pour parvenir au dysfonctionnement hydraulique (t_{HF}). Ces variations sont calculées en affectant, à un plan LW la valeur d'un trait mesuré chez LD, toutes choses étant égales par ailleurs. Pour chaque trait, la différence relative entre la valeur de t_{HF} pour chacune des deux conditions a été calculée selon le rapport : $(t_{HF-LD} - t_{HF-LW})/t_{HF-LW} * 100$.

diminution de 19,61 % du P_{50} (passant de - 2,46 chez LW à - 2,95 MPa chez LD) permet une augmentation de 33,56 % du t_{HF} (Fig. 59). Pour les autres traits, si la différence entre conditions n'était pas significative, l'impact de la variation a tout de même été testée. La marge de sécurité hydraulique (HSM), définie ici comme étant la différence entre le P_{50} et le point de perte de turgescence (Ψ_{TLP}) a été augmentée de 18 % et la variation de ce trait entraîne une augmentation du temps avant dysfonctionnement hydraulique de 29,15 %. Le g_{min} et le P_{50} -Feuille ont été réduits respectivement de 15,08 et 17,56 %, ce qui d'après le modèle entraîne une augmentation du temps de résistance à la sécheresse de respectivement 10,13 et 5,96 %. Enfin, le Ψ_{TLP} a été diminué de 15,94 % chez les plants acclimatés, ce qui conduit au dysfonctionnement hydraulique avec un temps réduit de 4,52 %.

IV. DISCUSSION :

Acclimatation à la sécheresse et plasticité des traits fonctionnels

Les résultats des simulations montrent que la variation par plasticité phénotypique permet d'augmenter la résistance des individus à une sécheresse sévère puisque le temps avant dysfonctionnement hydraulique est doublé (Fig. 57). Malgré de nombreuses études qui ont suivi la perte de conductance associée à une sécheresse extrême en conditions expérimentales jusqu'au point de non-retour de plants de nombreuses espèces (Brodribb & Cochard, 2009, Barigah *et al.*, 2013 ; Urli *et al.*, 2013 ; O'Brien *et al.*, 2015 ; Blackman *et al.*, 2019 ; Hammond *et al.*, 2019), très peu ont pris en compte la plasticité à des conditions climatiques dans la conduite de ces expériences (CO_2 et température atmosphériques pour (Duan *et al.*, 2013) ; Lumière pour (O'Brien *et al.*, 2014)) et aucune étude n'a pris en compte l'acclimatation à une contrainte hydrique.

Concernant l'étendue de la variation des traits étudiés, nous pouvons noter que la plasticité du g_{min} et du Ψ_{TLP} sont plus faibles que l'acclimatation observée par des méta-analyses en réponse à la sécheresse, chez de nombreuses espèces (Bartlett *et al.*, 2014 ; Duursma *et al.*, 2019). Il est possible que la signalisation à l'origine de la plasticité sur ces deux traits foliaires ne réponde pas seulement à un stimulus provenant du sol ou du xylème (par exemple, le potentiel hydrique) mais également aux conditions atmosphériques (par exemple, déficit hydrique, ou VPD). Or, l'unique différence entre les conditions de croissance LD et LW résidait dans la quantité d'eau du sol. La surface foliaire a été observée comme étant réduite chez les

arbres par plasticité phénotypique en réponse à une sécheresse expérimentale (Limousin *et al.*, 2012 ; Grossiord *et al.*, 2017), de même que le P_{50} foliaire (Cardoso *et al.*, 2018 ; Lucani *et al.*, 2019). L'acclimatation du P_{50} de tige a déjà été discutée ailleurs et a été considérée comme dans la gamme attendue compte tenu de nos conditions expérimentales (Lemaire *et al.*, *soumis*).

Traits permettant la majeure partie de l'acclimatation à la sécheresse

L'étude de sensibilité montre que le P_{50} de tige, la surface foliaire et le $g_{\min}$ sont les trois traits principaux pour expliquer la tolérance à la sécheresse puisque chacun d'eux est à l'origine d'au moins 10 % du gain de t_{HF} . Ce résultat confirme l'importance de ces trois traits mise en avant par Brodribb (2017) et Martin-StPaul *et al.* (2017). Les variations du P_{50} , de la surface foliaire et du $g_{\min}$ permettent une augmentation du t_{HF} de respectivement 33,56 %, 22,23 % et 10,13 %. Cependant, la variation observée pour chacun des traits retenus montre qu'aucun de ces traits n'est à l'origine de la totalité du gain de t_{HF} à lui seul (Fig. 59). En accord avec la littérature sur le sujet, il s'agit donc bien de variations coordonnées de plusieurs traits qui chacun permet d'augmenter la résistance jusqu'à obtenir doublement de t_{HF} pour l'individu acclimaté (Martínez-Vilalta *et al.*, 2009 ; Cardoso *et al.*, 2018). L'augmentation de la sûreté due à chacun des trois traits mis en avant ci-dessus a un coût en carbone. En effet, le P_{50} est corrélé à la densité du bois (Hacke *et al.*, 2006 ; Rosner, 2017), le $g_{\min}$ a été associé à une masse plus importante de cire par unité de surface de feuille (Bueno *et al.*, 2019) et diminuer la surface foliaire s'accompagne d'autant de réduction de l'assimilation (Limousin *et al.*, 2012 ; Grossiord *et al.*, 2017). Cela se traduit par une croissance en hauteur et en diamètre moindre pour ces peupliers acclimatés (Niez *et al.*, 2019 ; Lemaire *et al.*, *soumis*).

Plasticité des traits foliaires avec une contribution négative au t_{HF}

Il est à noter que deux traits foliaires, le P_{50} foliaire et le potentiel de perte de turgescence ($P_{50\text{-Feuille}}$ et Ψ_{TLP}) ont une contribution faible voire négative au t_{HF} (Fig. 59). En effet, la limitation des pertes en eau par les feuilles par fermeture stomatique est une stratégie de résistance des plantes à la sécheresse qui permet de conserver de plus grandes réserves d'eau dans le sol et ainsi retarder la diminution du potentiel hydrique du sol (Tardieu & Simonneau, 1998 ; Brodribb *et al.*, 2014). Si les potentiels continuent malgré tout à diminuer du fait des pertes minimales, alors le xylème est embolisé. S'il y a segmentation hydraulique, comme dans le cas de cette étude, le xylème foliaire est embolisé avant le xylème de tige, entraînant *de facto* une réduction des surfaces de transpiration (Tyree *et al.*, 1993 ; Wolfe *et al.*, 2016). La segmentation hydraulique est une stratégie permettant de limiter les pertes en eau et donc de conserver davantage de réserves dans le sol (Tyree *et al.*, 1993 ; Rojas-Jiménez *et al.*, 2007). Une diminution du seul $P_{50\text{-Feuille}}$ retarderait le temps avant abscision des feuilles et rendrait

donc les individus acclimatés plus vulnérables. La modification de ces traits dans un sens en apparence paradoxal, qui rend les individus plus vulnérables, montre que la sûreté de la résistance à la cavitation n'est pas le seul objectif à atteindre lors de l'acclimatation de la résistance à la sécheresse. Ainsi, les modifications doivent aussi permettre de maintenir des échanges gazeux (donc une assimilation de carbone via la photosynthèse) aussi optimisés que possible. Les plants sont donc contraints de garder les stomates ouverts le plus longtemps possible et ne peuvent sacrifier leurs feuilles qu'en tout dernier recours, pour maintenir leur métabolisme carboné (Anderegg *et al.*, 2018). Dans un environnement plus sec, fermer ses stomates plus tôt pourrait exposer les plantes aux risques de carence en carbone (McDowell *et al.*, 2008 ; Sala *et al.*, 2010).

En ce sens, évaluer la stratégie de fermeture stomatique rend compte du compromis entre assurer la sûreté hydraulique sans compromettre la fixation de carbone utile au développement de la plante et à la mise en place de défense et d'acclimatation (Delzon & Cochard, 2014 ; Skelton *et al.*, 2015 ; Anderegg *et al.*, 2018). La marge de sécurité hydraulique (*HSM*), définie comme la différence entre le potentiel de fermeture stomatique et le P_{50} , permet d'illustrer les effets observés sur nos plants (Meinzer *et al.*, 2009). À l'échelle inter-spécifique, il a été montré que la marge de sécurité hydraulique est un trait relativement conservé chez les plantes quel que soit le biome dans lequel elles se développent (Choat *et al.*, 2012). Nous observons que la marge de sécurité hydraulique augmente de 18,29 % entre plants non acclimatés et acclimatés (Fig. 59.A). Ainsi, malgré la diminution du potentiel de perte de turgescence allant vers une stratégie plus dispendieuse en eau et permettant de favoriser les échanges gazeux, la coordination entre P_{50} et Ψ_{TLP} va dans le sens d'une plus grande sécurité hydraulique (Fig. 59.B).

Il est à noter que dans le cas de la vulnérabilité à la cavitation des feuilles, la plasticité de la résistance à la sécheresse s'est aussi accompagnée d'une augmentation de la pente de la courbe de vulnérabilité, ce qui permet un gain de t_{HF} malgré le changement de $P_{50\text{-Feuille}}$ (Fig. 59). La pente est un paramètre intéressant en ce qu'il permet à un individu de modifier le potentiel d'entrée de l'embolie (P_{12}) et potentiel de non-retour (P_{88}) sans avoir à modifier le P_{50} (Martin-StPaul *et al.*, 2017, Appendix S1). Ce paramètre a toutefois été peu discuté dans la littérature. Delzon *et al.* (2010) remarquent une corrélation linéaire entre ces deux traits sur un graphique log-log. Mais chez le peuplier, la plasticité de la résistance à la cavitation au niveau de la tige se traduit par une acclimatation du P_{50} mais pas de la pente (Awad *et al.*, 2010 ; Lemaire *et al.*, *soumis*). Cela signifie que c'est l'ensemble des vaisseaux qui s'acclimate et pas seulement une proportion des plus sensibles ou des plus vulnérables.

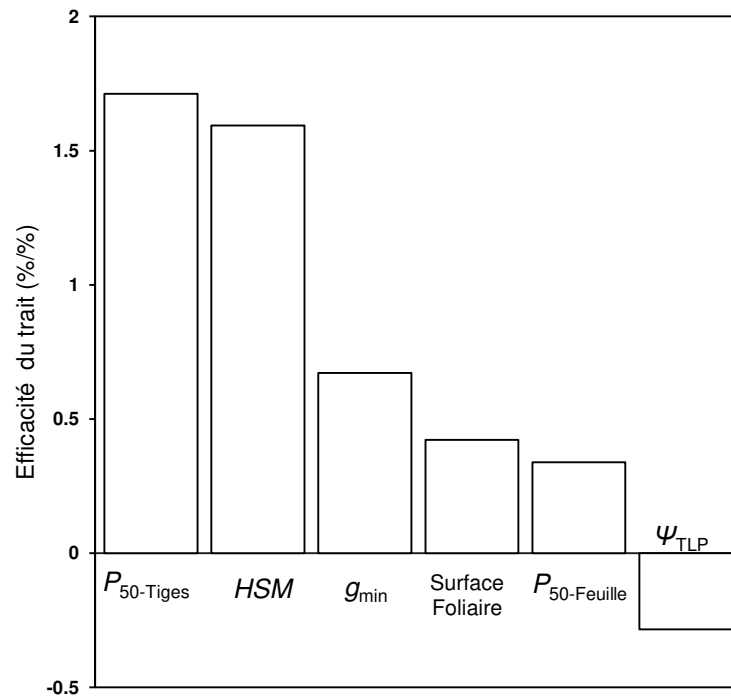


Figure 60 : Rapport Trait/t_{HF} pour chacun des traits étudiés. Pour chaque trait, il s'agit du pourcentage de variation du trait mesuré en serre entre les conditions de croissance divisé par le pourcentage de variation du t_{HF} induite par la variation du trait, tel que simulé entre les deux conditions de croissance par le modèle SurEau.

Rapport Variation(Trait)/Variation(t_{HF})

La notion de compromis entre sûreté hydraulique et maintien de l'assimilation est donc un paramètre qui détermine quels traits varient sous l'effet de l'acclimatation de la résistance à la sécheresse et dans quelle proportion (Skelton *et al.*, 2019). L'acclimatation s'est effectuée en priorité sur le P_{50} de tige et la surface foliaire. Nous pouvons calculer un rapport pour chaque trait entre le pourcentage de variation du trait tel que rapporté en Fig. 59.A et le pourcentage de variation du t_{HF} pour le même trait tel que rapporté en Fig. 59.B, selon la formule $\text{rapport} = \text{Variation(Trait)}/\text{Variation}(t_{HF})$. Or, nous observons que le P_{50} de tige et la surface foliaire ont le *rapport Trait/ t_{HF}* le plus fort puisque ce sont les deux traits offrant le meilleur pourcentage de gain de t_{HF} par rapport au pourcentage de variation du trait (Fig. 60). Il est toutefois à noter que si d'après notre estimation le P_{50} est le trait qui offre le meilleur *rapport Trait/ t_{HF}* avec 1,71, ce n'est pas lui qui a été préférentiellement sélectionné. Malgré un *rapport Trait/ t_{HF}* de seulement 0,42, la surface foliaire a subi la plus grande variation moyenne entre les plants en condition favorable (LW) et ceux acclimatés (LD) (Fig. 59). La variation de surface foliaire en réponse à un stress hydrique va dans le sens d'une économie en carbone (produire moins de surface foliaire) tandis que la variation du P_{50} -Tige va dans le sens d'un coût plus élevé (produire un xylème acclimaté). Aussi, il est possible que ce soit le coût de production de ce type de xylème qui ne permette pas de faire varier davantage le P_{50} .

Le g_{min} , lui, a un rapport moins élevé et varie de façon moindre entre les deux conditions de croissance (Fig. 59 ; Fig. 60). Si ce trait varie peu, peut-être avons-nous là aussi atteint les limites d'acclimatation sur ce trait. Toutefois, cette explication est contraire aux observations des études regroupées par Duursma *et al.* (2019), qui en déduit que pour ce trait nous pouvons observer une réduction de 30-40 % de g_{min} par plasticité phénotypique en réponse à un stress hydrique. Enfin, le Ψ_{TLP} est le trait qui a le *rapport Trait/ t_{HF}* le plus faible, avec seulement - 0,28. De ce fait, la plasticité sur ce trait, qui est également le seul à varier de façon à diminuer le t_{HF} , affecte moins le t_{HF} que les autres traits étudiés.

Ces résultats confirment l'importance majeure du P_{50} dans la résistance à la sécheresse. Cela conforte les résultats avancés en premier chapitre de cette thèse sur l'importance de se concentrer sur la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation lorsque l'on s'intéresse à l'acclimatation à la sécheresse (Lemaire *et al.*, *soumis*). En ce point, l'étude que nous vous présentons à travers ce chapitre montre que, dans le cas de l'acclimatation à des conditions plus sèches, les variations du P_{50} sont les plus utiles pour augmenter le temps avant un

dysfonctionnement hydraulique. La coordination entre les différents traits permet de mettre en lumière les compromis auxquels sont soumises les plantes entre coût de développement des structures acclimatées et la capacité des plants acclimatés à fixer du carbone. L'importance de l'étude des pertes minimales et ses modalités d'acclimatation est également confirmée. L'importance de la variation du P_{50} dans l'acclimatation de la plante à la sécheresse montre l'intérêt de favoriser ce trait, que ce soit par la mise en place de pratiques culturales favorisant la plasticité du P_{50} ou par l'utilisation de ce trait pour la sélection d'idéotypes. Une validation expérimentale par un design expérimental prenant en compte la plasticité pourrait permettre de vérifier ces résultats à l'échelle du fonctionnement de la plante entière, mais seule la modélisation permet de découpler l'effet de chacun des traits.

Discussion générale

Les résultats présentés dans cette thèse permettent de mettre en évidence l'importance de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation en réponse à des conditions hydriques contraintes. De plus, nous avons pu montrer que c'est à l'échelle du xylème et du vaisseau et non des ponctuations que se situent les bases structurelles de plasticité de la vulnérabilité à la cavitation. À la lumière de ces résultats, nous discuterons dans cette partie i) des bases structurelles de la variation de la vulnérabilité à la cavitation, plus précisément en expliquant que la plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation ne repose pas sur les ponctuations et également en explorant d'autres sources de variabilité de structure du xylème à l'échelle intra-spécifique ; ii) de la distinction entre la vulnérabilité à la cavitation et la vulnérabilité à l'embolie ; iii) de la plasticité des autres types de xylèmes, notamment du xylème primaire et iv) de l'impact de la vulnérabilité à la cavitation au niveau fonctionnel et écologique.

I. Sources de variation de la résistance à la cavitation et leurs bases structurelles

1) La plasticité phénotypique de la vulnérabilité à la cavitation ne repose pas sur les ponctuations.

Au cours de cette étude portant sur la plasticité chez le peuplier, nous avons pu lier les variations de la résistance à la cavitation à la structure du xylème et non aux ponctuations. Cela est différent de ce qui est classiquement admis lorsque l'on compare les espèces, où la structure des ponctuations joue un rôle majeur (Delzon *et al.*, 2010 ; Jansen *et al.*, 2009 ; Lens *et al.*, 2011). De telles différences entre les déterminants structuraux à l'échelle inter-spécifique et ceux de la plasticité peuvent être expliquées par deux hypothèses qui sont non exclusives.

Tout d'abord, les ponctuations opposent une grande résistance au flux d'eau, comptant pour 50 à 80 % de la résistance totale opposée par le xylème (Choat *et al.*, 2006 ; Schulte *et al.*,

2015). Il est possible qu'un changement de l'organisation du xylème plutôt que des structures des ponctuations permette un changement de vulnérabilité à la cavitation tout en minimisant l'augmentation de résistance. Certains traits peuvent avoir un impact sur la résistance à la cavitation sans en avoir sur la résistance au flux (Meinzer *et al.*, 2010 ; Gleason *et al.*, 2016). La structure des ponctuations ayant une telle importance dans la résistance au flux, modifier seulement l'organisation du xylème sans modifier les ponctuations permettrait de ne pas impacter la conductance dans le cas de la plasticité. Nous avons vu dans le premier chapitre que la variation de P_{50} n'est pas associée à un changement de conductivité hydraulique spécifique. Cela est conforme à ce qui a été observé sur d'autres études menées à l'échelle intra-spécifique (Martínez-Vilalta *et al.*, 2009 ; Awad *et al.*, 2010, Plavcová & Hacke, 2012, Schuldt *et al.*, 2016). Toutefois, les xylèmes les plus résistants que nos peupliers ont construits étaient plus compartimentés (davantage d'interconnexions et des vaisseaux plus courts). Il reste à expliquer comment, alors que les terminaisons de vaisseaux sont plus nombreuses, la conductivité hydraulique spécifique n'a pas été impactée.

Enfin, il est possible que la structure des ponctuations soit fixée à l'échelle de l'individu sans changement possible en réponse à un stress. Lorsque l'on compare les espèces, on observe des structures de ponctuations très différentes (Jansen *et al.*, 2009), ce qui doit reposer sur un contrôle génétique et métabolique complexe dans la conception de ces ponctuations, tel que des modifications de la paroi et des dépôts secondaires pour les bordures. De tels changements peuvent être possibles à l'échelle du temps de l'évolution (spéciation) mais seraient trop complexes à mettre en place sur le temps de la plasticité phénotypique. Ceci pourrait expliquer que des traits liés à la qualité des ponctuations (et principalement l'épaisseur de la paroi) soient des traits majeurs lorsque l'on compare les espèces entre elles (Jansen *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2016), mais que ce ne soit pas le cas à l'échelle intra-spécifique, dans le cas de l'acclimatation.

Dans les ponctuations, le calcium peut déterminer les propriétés mécaniques des parois et donc la vulnérabilité à la cavitation du xylème (Herbette & Cochard, 2010). Lorsque l'on compare les espèces pour leur vulnérabilité à la cavitation, le calcium apparaît comme étant un déterminant expliquant une grande part de la variabilité. Mais cette relation ne tient pas dans le cas de la plasticité phénotypique (Herbette & Cochard, 2010). Cela montre que les mécanismes de la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation à l'échelle inter- et intra-spécifique sont différents (Herbette & Cochard, 2010). Cet exemple vient appuyer notre hypothèse selon laquelle la variation de vulnérabilité à la cavitation dans le cas de la plasticité ne repose pas sur des changements au niveau des ponctuations.

2) Autres sources de variation de la structure du xylème à l'échelle intra-spécifique

En plus des variations de la vulnérabilité à la cavitation et de la structure du xylème liées aux conditions environnementales, il existe de la variabilité pour ces paramètres à l'échelle de l'individu. L'indice de connectivité des vaisseaux diminue et le diamètre des vaisseaux augmente à mesure que l'on s'éloigne du sommet de l'arbre (Zhao, 2016 ; Petit *et al.*, 2010). Il a aussi été montré que les branches les plus hautes étaient plus résistantes à la cavitation que les plus basses (Farnese & Torres-Ruiz, *communication personnelle*). Ces différences s'expliqueraient par le fait que les branches les plus hautes des arbres sont soumises à des potentiels hydriques plus bas du fait de la hauteur (Koch *et al.*, 2004 ; Domec *et al.*, 2008). Les variations de diamètres et de connectivité des vaisseaux limitent les résistances hydrauliques à la base et ainsi permettent d'atteindre des hauteurs plus importantes (Petit *et al.*, 2010 ; Williams *et al.*, 2019). L'existence de ce mécanisme montre que les arbres peuvent ajuster l'organisation de leur xylème en réponse à des contraintes, et nous retrouvons les mêmes prérequis que dans le cas de l'acclimatation à la sécheresse : il s'agit d'un mécanisme qui se produit au sein d'un individu, agissant sur l'organisation du xylème. Les déterminants structuraux à l'origine de la plasticité du xylème en réponse à un stress hydrique (comme nous l'avons décrit dans cette thèse) ou en réponse à la hauteur (comme évoqué ci-dessus) pourraient ainsi être les mêmes.

Les connaissances sur l'élargissement du xylème et sa signalisation peuvent expliquer les mécanismes impliqués dans l'acclimatation à des conditions environnementales. L'augmentation des dimensions des vaisseaux proches de la base de l'arbre est due à une durée d'élongation cellulaire plus importante (Anfodillo *et al.*, 2012). Les mécanismes de signalisation hormonale pouvant influencer sur l'activité cambiale ont fait l'objet d'une revue (Sorce *et al.*, 2013).

La mise en place de la plasticité des structures du xylème en réponse à des conditions environnementales pose également la question du stimulus à l'origine de cette réponse. Son identification est l'objet de débats depuis longtemps entre le potentiel hydrique (et ses composantes : le potentiel osmotique et le potentiel hydrostatique) et le contenu relatif en eau (Sinclair & Ludlow, 1985). Une méta-analyse récente semble montrer que le potentiel osmotique serait le stimulus le plus adapté pour décrire certains processus physiologiques

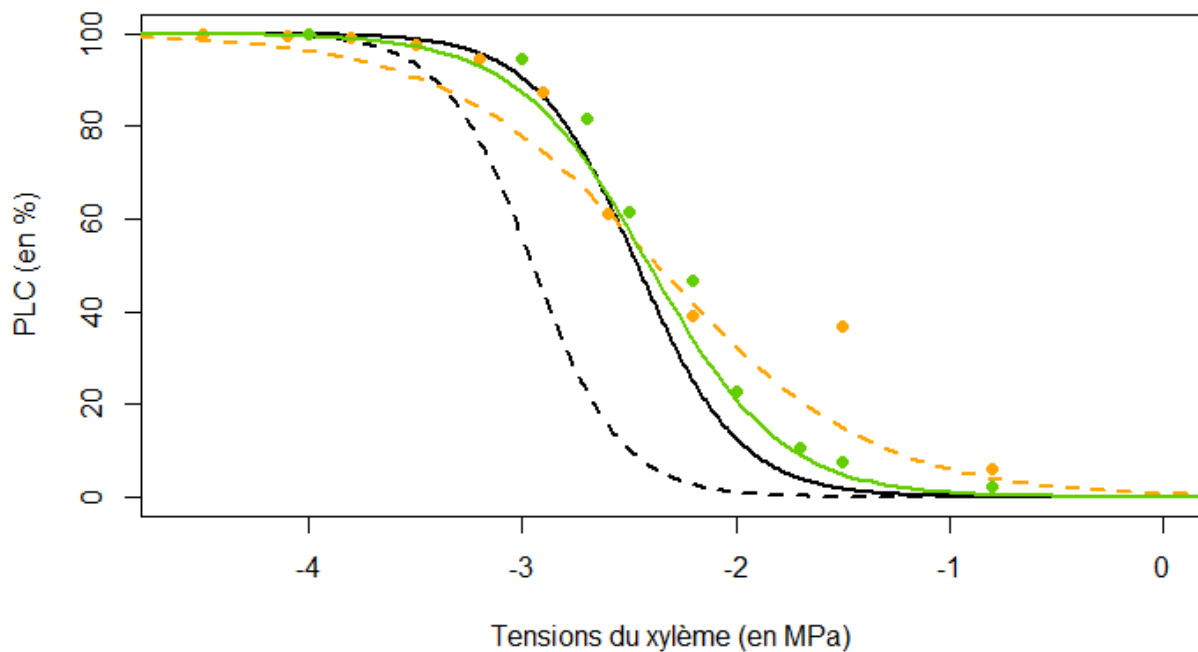


Figure 61 : Courbes de vulnérabilité à la cavitation de tiges de peupliers par méthode du cavitron (en noir) et par tomographie à rayon X (en couleur). Le type de ligne renseigne sur les conditions de croissance : Ligne pleine, individus en conditions favorables (LW) ; ligne pointillée, individus en stress hydrique (LD). Chaque point est la somme totale des diamètres des vaisseaux embolisés¹ pour chaque pallier de pression. Les couleurs renseignent sur les conditions de croissance : vert, individus en conditions favorables (LW) ; orange, individus en stress hydrique (LD).

¹ Afin de pondérer hydrauliquement le poids de chaque vaisseau dans la conductance, chaque diamètre a été élevé à la puissance 4.

(Bartlett *et al.*, 2012). Les mécanismes sensoriels permettant de percevoir ce stimulus ne sont pas clairement connus mais diverses pistes ont fait l'objet d'une revue (Scharwies & Dinneny, 2019). Nous pouvons citer l'identification d'une protéine qui peut changer de conformation et acquérir de nouvelles fonctions sous l'effet d'un changement de potentiel osmotique ou des canaux mécano-sensibles qui réagissent à des changements de pression de turgescence chez *Arabidopsis thaliana* (Cuevas-Velazquez *et al.*, 2016 ; Hamilton *et al.*, 2015).

De plus, il est possible que l'interaction entre cet élargissement et plasticité de la vulnérabilité à la cavitation s'effectue au détriment de la capacité d'acclimatation des grands arbres à la sécheresse ou de leur hauteur maximale.

II. Vulnérabilité à la cavitation ou vulnérabilité à l'embolie ?

La résistance à la cavitation désigne la capacité d'un vaisseau à ne pas se remplir d'air en fonction du potentiel hydrique auquel le xylème est exposé. L'embolie est l'obstruction des vaisseaux par les bulles d'air ; ainsi, la résistance à l'embolie désigne la capacité d'un xylème à conserver sa conductance hydraulique en fonction du potentiel auquel il est exposé. C'est cette dernière qui est à privilégier si l'on s'intéresse au fonctionnement de l'arbre (Lens *et al.*, 2013). Pour illustrer la différence entre les deux concepts, nous pouvons prendre un exemple : d'après les résultats d'un modèle reproduisant la propagation de la cavitation dans un xylème simulé, lorsque le xylème a perdu 90 % de sa conductance, 40 à 60 % des vaisseaux restent non cavités (mais non fonctionnels car isolés) (Mrad *et al.*, 2018). La méthode du cavitron mesure une perte de conductance : *stricto sensu*, il ne permet pas de mesurer la vulnérabilité à la cavitation d'un échantillon mais sa vulnérabilité à l'embolie. La microtomographie à rayons X permet de connaître le statut (embolisé ou non) de chaque vaisseau du xylème et donc mesure bien la résistance à la cavitation de l'échantillon. Nous pouvons constater que si la résistance à l'embolie mesurée au cavitron a bien varié par plasticité phénotypique en fonction des conditions de croissance (passant en moyenne de - 2,46 MPa pour les individus en conditions favorables LW à - 2,97 MPa pour les individus stressés LD), ce n'est pas le cas de la résistance à la cavitation, qui est similaire dans les deux conditions (- 2,40 MPa pour les individus LW ; - 2,36 MPa pour les individus LD) (Fig. 61). Cela complète les résultats observés au premier chapitre selon lesquels l'acclimatation à la sécheresse passe par un changement d'organisation



Figure 62 : Vue du dispositif d'exclusion de pluies permettant d'étudier la réponse du blé à un stress hydrique. Sur cette photographie, une des quatre parcelles « abritées » avec en fond le toit amovible qui vient la recouvrir en cas de précipitations.

du xylème qui permet au système d'être moins vulnérable à l'embolie, via la mise en place d'une redondance plus importante. En revanche, cela pose question quant à une organisation du xylème qui permettrait de minimiser la surface en ponctuations afin d'écarter le risque que les vaisseaux soient porteurs d'une ponctuation faible. Nous avons observé une relation à l'échelle du xylème (Fig. 61), mais nous n'observons pas de gain de résistance à la cavitation à l'échelle du vaisseau entre les deux conditions de croissance. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Niez (2018) qui avait comparé par observation directe en microtomographie la vulnérabilité à la cavitation de xylèmes de tiges de peupliers acclimatés à un stress hydrique et mécanique. Les plants ayant subis un stress hydrique avaient un P_{50} 8,4 % plus faible que les autres mais cette différence ne se retrouvait pas pour le P_{90} , confirmant une variation faible de la résistance à la cavitation. Nos résultats et ceux de Niez (2018) mettent en évidence le rôle considérable de la plasticité de la vulnérabilité à l'embolie dans l'acclimatation à la sécheresse.

III. Qu'en est-il des autres types de xylème ?

Notre étude a porté sur du xylème secondaire de peuplier, une angiosperme dont le bois est hétéroxylé. Nous avons montré que c'est l'organisation du xylème qui est à l'origine de la plasticité de la résistance à la cavitation. Mais le bois hétéroxylé n'est pas le seul type de xylème que l'on retrouve. Les gymnospermes ont un bois homoxylé dont les éléments conducteurs sont les trachéides. De plus, les herbacées ou les très jeunes arbres ont un xylème primaire prépondérant qui présente aussi une organisation différente, en faisceaux. Dans ces deux cas, l'organisation du xylème est fixée. Les déterminants structuraux que nous avons soulevés dans le cas d'un bois hétéroxylé ne peuvent donc pas expliquer la plasticité de ce type de structures. Dans le cas des gymnospermes, leur capacité à faire varier leur P_{50} semble limitée comparée à celle des angiospermes (Lamy *et al.*, 2014 ; Anderegg, 2015). Pour ce qui est du xylème primaire, notons que la gamme de variation du P_{50} d'une seule famille, les Poacées, recouvre à 94 % celle des angiospermes ligneuses, montrant que ce trait n'est pas pertinent seulement dans le cas des arbres (Lens *et al.*, 2016). De plus, la plasticité sur le P_{50} a pu être mise en évidence récemment sur des feuilles ou sur des herbacées (Cardoso *et al.*, 2018 ; Lucani *et al.*, 2019 ; Matzner *et al.*, 2019). Afin d'explorer la plasticité du P_{50} du xylème primaire, à la lueur des mécanismes mis en évidence dans le premier chapitre, nous nous sommes attachés à caractériser ce trait en réponse à un stress hydrique sur du blé cultivé en champ. Nous avons pu nous appuyer

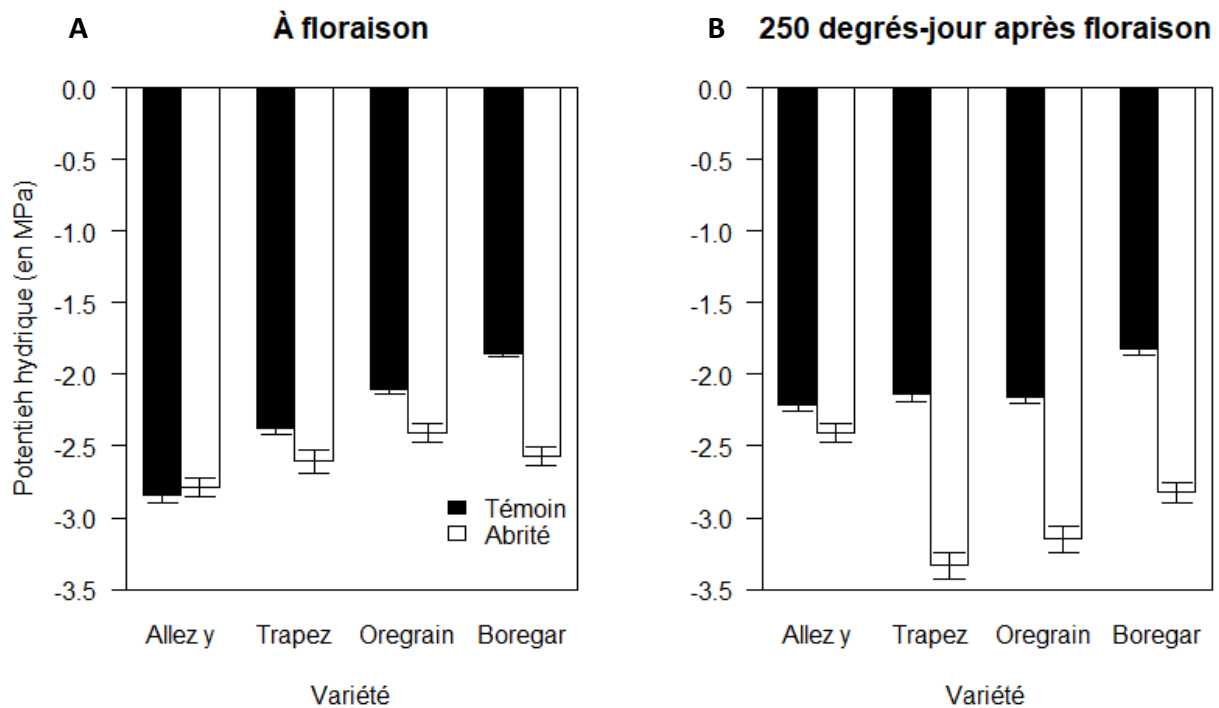


Figure 63 : Potentiels minimums de chacune des quatre variétés de blé, cultivées sous deux modalités et à deux stades phénologiques : à floraison (A) et à 250 °Cd après floraison (B). Les valeurs sont les moyennes pour cinq à six individus pour chacune des deux répétitions pour chacun des quatre blocs ; les barres d'erreurs représentent les erreurs standards.

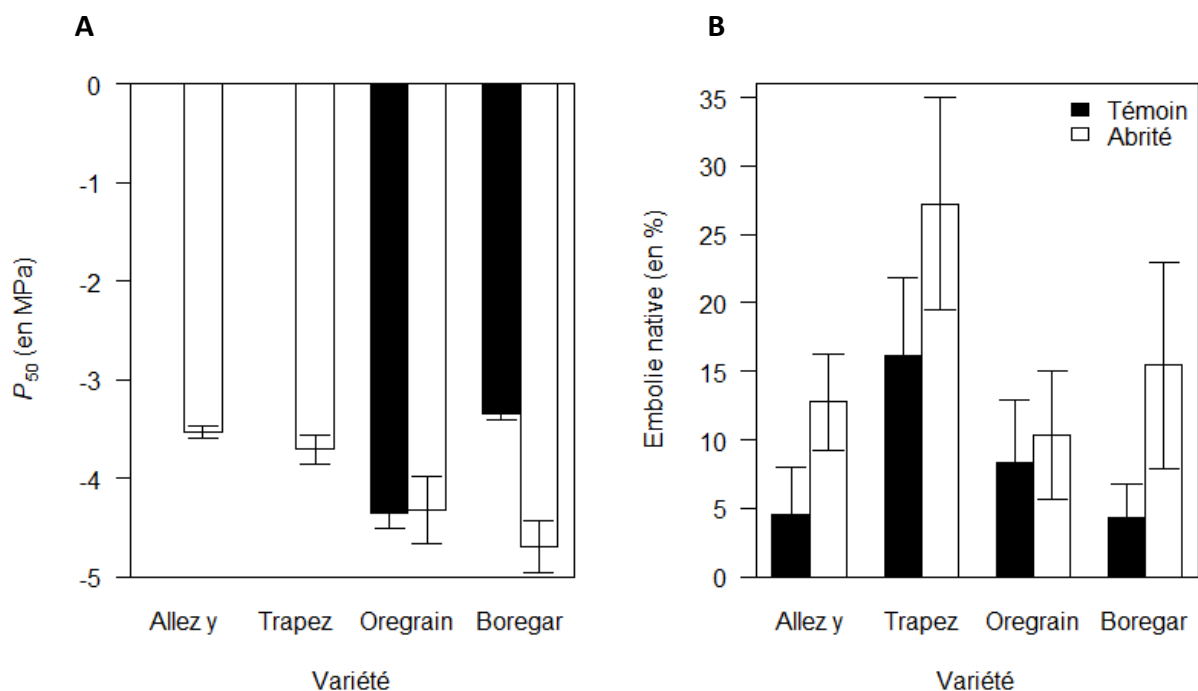


Figure 64 : Résistance à la cavitation chez le blé en fonction des deux conditions de croissance et pour chacune des quatre variétés. A : Potentiel hydrique induisant 50 % de perte de conductance (P_{50}) dans le xylème d'un segment de tige. B : Pourcentage d'embolie native dans le xylème d'un segment de tige. Les valeurs sont les moyennes pour chacun des deux individus pour chacune des deux répétitions pour chacun des quatre blocs ; les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

sur un dispositif d'exclusion de pluie en champs déjà en place (Fig. 62) (Voir méthode en Annexe 1).

Brièvement, des plants de blé de quatre variétés ont été cultivés en champ selon deux modalités : Abrités (les parcelles étaient abritées des précipitations par un mécanisme d'exclusion de pluies) et Témoins (les parcelles étaient exposées aux intempéries). Les valeurs de potentiels hydriques, significativement plus faibles en parcelles abritées par rapport à celles exposées aux intempéries, montrent que les plants abrités étaient exposés à un stress hydrique plus fort (Fig. 63). Des plants des quatre variétés et de chaque modalité ont été caractérisés pour leur vulnérabilité à la cavitation et leur niveau d'embolie native.

Les courbes de vulnérabilité à la cavitation montrent que chacune des quatre variétés retenues présente une grande résistance, avec des P_{50} moyens à - 4 MPa (Fig. 64.A). Cela est inférieur aux P_{50} déjà publiés sur le blé, de - 2,87 MPa mesuré par vulnérabilité optique sur feuille par Johnson *et al.*, (2018) et un P_{50} de - 1,92 MPa par méthode acoustique sur feuilles par Jia *et al.* (2006), dans les deux cas sur des plants en pot. Cette valeur est également inférieure à ce qui a été mesuré dans d'autres études sur des céréales cultivées : - 1,6 MPa par méthode de déshydratation sur des plants en champ (Stiller *et al.*, 2003), et sur des plants en pot : - 1,9 MPa par méthode de centrifugation sur des feuilles de riz (Stiller *et al.*, 2003) ; - 1,56 et - 1,78 MPa par méthode du Cavitron sur tiges, pour deux variétés de maïs (Li *et al.*, 2009) ; - 1,15 MPa par méthode de déshydratation sur tiges de maïs (Gleason *et al.*, 2017). Nos observations ont été confirmées par Creek *et al.* (*Communication personnelle*), qui ont trouvé des valeurs de P_{50} similaires aux nôtres lorsque mesurées par méthode de vulnérabilité optique, lors d'une campagne de prélèvements effectuée sur le même dispositif deux années plus tard. Les P_{50} que nous avons observés restent dans la gamme de résistance des autres espèces herbacées (Lens *et al.*, 2016). Ces résultats montrent une vulnérabilité à la cavitation pour les céréales moins importante que ce qui est classiquement admis dans la littérature. Cela peut être le signe de l'existence de variabilité génétique ou plastique sur ce trait pour les monocotylédones.

Malheureusement il n'a pas été possible de tester l'existence de plasticité chez chacune de nos quatre variétés puisque les contraintes techniques ne nous ont pas permis de mesurer les P_{50} chez deux variétés en conditions Témoins (*Allez-y* et *Trapez*). Concernant les deux variétés que nous avons pu phénotyper, l'une (variété *Oregrain*) n'a pas vu son P_{50} varier sous l'effet des conditions de croissance ($P_{50} = - 4,34 \pm 0,71$ MPa) tandis que l'autre (variété *Boregar*) a vu son P_{50} diminuer entre les conditions Témoins et les conditions Abritées, passant de $- 3,35 \pm 0,20$ à $- 4,70 \pm 0,76$ MPa ($p = 0,0012$) (Fig. 64.A). Cela montre la présence de plasticité de la vulnérabilité à la cavitation sur au moins l'une des variétés. Globalement, les niveaux élevés

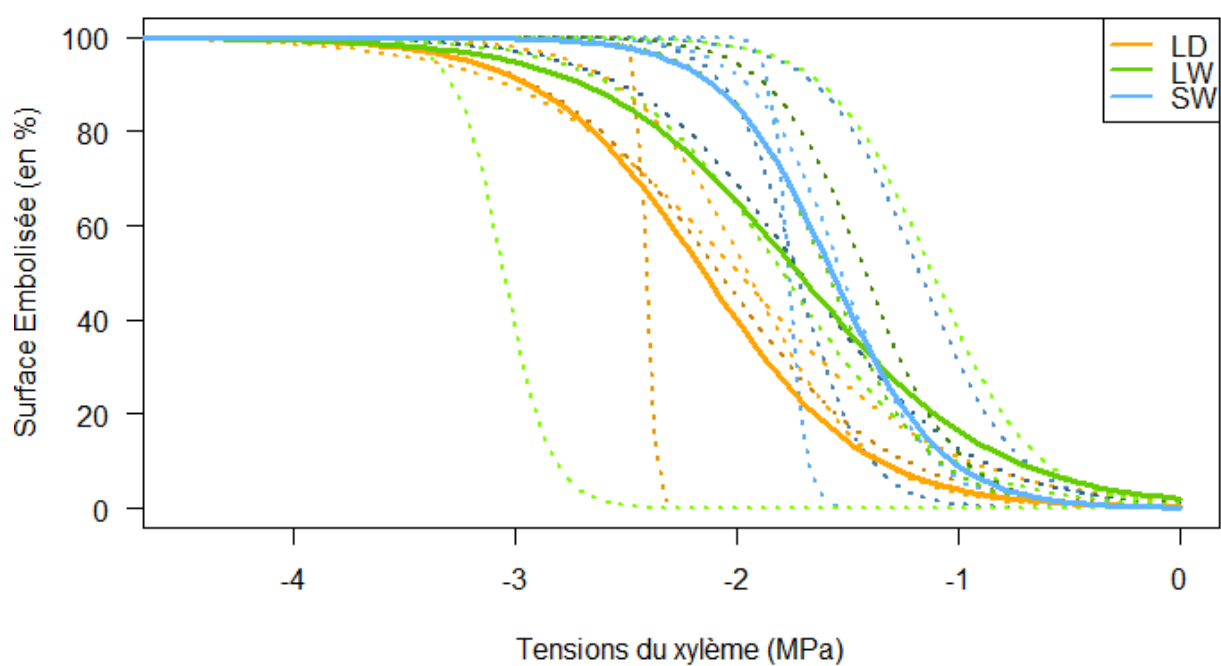


Figure 65 : Courbes de vulnérabilité à la cavitation de la nervure principale de feuilles de peupliers. Chaque ligne pointillée représente un individu, les lignes pleines représentent les courbes moyennes pour chacune des trois conditions de croissance : orange, stressés hydriques (LD) ; vert, témoins (LW) ; bleu, sous ombrière (SW).

d'embolie et les potentiels hydriques très bas montrent que le blé, dans les conditions de croissance de notre dispositif expérimental, est en limite de dysfonctionnement hydraulique (Fig. 64.B). Cela confirme que les herbacées sont exposées au risque de dysfonctionnement hydraulique, et montre l'importance de plasticité phénotypique sur la résistance à la cavitation chez les espèces monocotylédones.

De la même manière, nous avons comparé la résistance à la sécheresse des feuilles de peuplier par vulnérabilité optique selon les conditions de croissance (voir Chapitre 2, partie II.5. *Vulnérabilité à la cavitation des feuilles*). Nous nous sommes intéressés à ces structures car la feuille est un organe répondant aux conditions environnementales par plasticité et dont l'importance est majeure dans la balance hydrique des arbres (Wolfe *et al.*, 2016 ; Hochberg *et al.*, 2017). Nous nous sommes concentrés sur la nervure principale, d'une part car cette structure est moins résistante à la cavitation que les nervures inférieures et d'autre part car, si elle est embolisée, c'est toute la feuille qui est hydrauliquement isolée du reste de la plante (Brodrigg *et al.*, 2016 ; Hochberg *et al.*, 2017). Mais les différences de P_{50} que nous observons ne sont pas significatives ($p = 0,31$) (Fig. 65). Il est à noter la présence dans nos données d'une valeur extrême (un individu LW présentant une résistance extrêmement élevée, avec $P_{50} = - 3,05$). Par exemple, les différences entre les P_{50} d'individus LD et SW sont significatives lorsque comparées par un test de Student (LD, $P_{50} = - 2,11 \pm 0,18$; LW, $P_{50} = - 1,58 \pm 0,25$; $p = 0,01$). Le nombre d'échantillons caractérisés par condition de croissance pourrait être trop faible pour mettre en évidence une variation aussi fine et une consolidation de ce résultat par la caractérisation d'un plus grand nombre d'individus est nécessaire. Ces résultats sont à rapprocher d'études récentes qui ont également mis en évidence la plasticité de la résistance à la cavitation dans des feuilles d'Eucalyptus (Lucani *et al.*, 2019) ou de tournesols (Cardoso *et al.*, 2018).

Des études réalisées sur des herbacées ont mis en lien la variabilité de la vulnérabilité à la cavitation et des changements dans la structure du xylème primaire. Une variation du P_{50} chez le haricot en réponse à un stress mécanique a déjà été associée à une diminution de diamètre des vaisseaux (Matzner *et al.*, 2019). Chez le maïs, Li *et al.* (2009) observent des différences de P_{50} entre deux hybrides maïs n'observent pas de différence anatomique entre les xylèmes, à l'exception du nombre de faisceaux de vaisseaux. Enfin, la quantité de xylème secondaire ou la part de tissus lignifiés est associée à des différences de résistance à la cavitation d'herbacées (Ahmad *et al.*, 2018 ; Dória *et al.*, 2019). La recherche de déterminants structuraux de la plasticité de la résistance à la cavitation du xylème primaire est encore peu explorée.

L'absence de mesure anatomique associée à nos mesures de vulnérabilité à la cavitation ne nous permet pas de présenter des déterminants structuraux possibles pour la plasticité de la résistance à la cavitation du xylème primaire. Notre étude montre toutefois l'importance de la résistance à la cavitation dans la réponse du blé à la sécheresse, avec des potentiels minimums très bas et des niveaux d'embolie native élevés, ce qui est le signe de marges de sécurité hydrauliques extrêmement faibles pour les variétés étudiées. Dans le cas du blé, la pression des changements climatiques ajoutée à son importance dans l'alimentation humaine font de la recherche de déterminants structuraux ou génétique de la vulnérabilité à la cavitation et de sa plasticité des axes de recherche essentiels.

IV. Impacts fonctionnel et écologique de l'acclimatation de la vulnérabilité à la cavitation

Un compromis a souvent été présenté dans la littérature entre efficacité du transport de l'eau et sureté du système hydraulique (Hacke *et al.*, 2006 ; Meinzer *et al.*, 2010). Ce compromis s'observe pour de nombreux traits structuraux, qui sont corrélés de façon inverse à la conductance et au P_{50} (Lens *et al.*, 2011). D'après Meinzer *et al* (2010), des modifications structurelles à un niveau d'organisation, par exemple modification de l'architecture du xylème allant dans le sens d'une plus grande sureté hydraulique, pourraient être compensées par des modifications structurelles à un autre niveau d'observation, par exemple des ponctuations assurant un transport de l'eau plus efficace. Dans le cas de notre étude, si l'organisation du xylème a bien été modifiée par plasticité phénotypique, l'ultrastructure des ponctuations n'a pas été modifiée. Mais il reste possible que les modifications aient eu lieu au niveau de la porosité ou de la composition biochimique des parois de ponctuations, deux paramètres que nous n'avons pas explorés. L'acclimatation à la sécheresse peut avoir eu des conséquences sur d'autres traits, avec des changements impactant par exemple des traits liés à l'acquisition des ressources (Skelton *et al.*, 2019). Parmi les traits que nous avons étudiés, nous pouvons noter que les plants acclimatés présentaient une croissance ralentie, ainsi qu'une surface foliaire réduite. Cela montre le coût de l'acclimatation à la sécheresse en terme de production de biomasse. La réponse des peupliers aux conditions de croissance a certainement eu lieu à d'autres niveaux, par exemple, au niveau de la densité stomatique ou de traits racinaires. Une

évaluation du bilan carbone de la plante, un calcul du coût de construction des structures acclimatées, des mesures de transpiration ou d'efficacité d'utilisation de l'eau sont des perspectives possibles aux travaux que nous avons présentés.

Alors que Choat *et al.* (2012) notaient que la plupart des espèces avaient une marge de sécurité faible, Benito-Garzón *et al.* (2018) ajoutaient que, pour la plupart des espèces étudiées, la marge de sécurité était même négative pour au moins une population. Ces résultats sont valables en considérant que la plasticité phénotypique sur le P_{50} est nulle ou très réduite. Nos résultats montrent que la plasticité sur ce trait ne peut pas être ignorée car, dans l'acclimatation en réponse à un stress hydrique, elle est l'un des leviers les plus importants pour décaler l'arrivée du dysfonctionnement hydraulique. Il faut garder à l'esprit que si la réponse plastique est utile à la survie en cas de sécheresse extrême, elle ne se met pas en place lors de la production du xylème. Il faut donc des conditions moyennes stressantes pour provoquer l'acclimatation de l'arbre. L'orientation vers des pratiques culturales permettant la mise en place de la plasticité de la vulnérabilité à la cavitation pourrait limiter la mortalité malgré une augmentation d'intensité et de fréquence des sécheresses.

Enfin, l'identification des bases structurelles permet la recherche des bases génétiques de la plasticité de la résistance à la cavitation par une approche gène-candidat. Cela rendra possible la recherche ou le développement de variétés mieux adaptées aux contraintes environnementales locales dans un climat plus sec, ainsi que l'étude de la réponse des populations naturelles face aux changements climatiques.

Références

- Adams HD, Zeppel MJB, Anderegg WRL, Hartmann H, Landhäuser SM, Tissue DT, Huxman TE, Hudson PJ, Franz TE, Allen CD, Anderegg LDL, Barron-Gafford GA, Beerling DJ, Breshears DD, Brodribb TJ, Bugmann H, Cobb RC, Collins AD, Dickman LT, Duan H, Ewers BE, Galiano L, Galvez DA, Garcia-Forner N, Gaylord ML, Germino MJ, Gessler A, Hacke UG, Hakamada R, Hector A, Jenkins MW, Kane JM, Kolb TE, Law DJ, Lewis JD, Limousin J-M, Love DM, Macalady AK, Martínez-Vilalta J, Mencuccini M, Mitchell PJ, Muss JD, O'Brien MJ, O'Grady AP, Pangle RE, Pinkard EA, Piper FI, Plaut JA, Pockman WT, Quirk J, Reinhardt K, Ripullone F, Ryan MG, Sala A, Sevanto S, Sperry JS, Vargas R, Vennetier M, Way DA, Xu C, Yopez EA, McDowell NG. 2017. A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nature Ecology & Evolution* 1: 1285–1291.
- Ahmad HB, Lens F, Capdeville G, Burlett R, Lamarque LJ, Delzon S. 2018. Intraspecific variation in embolism resistance and stem anatomy across four sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions. *Physiologia Plantarum* 163: 59–72.
- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1: 95–111.
- Alder NN, Pockman WT, Sperry JS, Nuismer S. 1997. Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany* 48: 665–674.
- Allario T, Tixier A, Awad H, Lemaire C, Brunel N, Badel É, Barigah TS, Julien J-L, Peyret P, Mellerowicz EJ, Cochard H, Herbette S. 2018. PtxtPME1 and homogalacturonans influence xylem hydraulic properties in poplar. *Physiologia Plantarum* 163: 502–515.
- Allen CD, Breshears DD, McDowell NG. 2015. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6: 1–55.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted), Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim J-H, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259: 660–684.
- Anderegg WRL. 2015. Spatial and temporal variation in plant hydraulic traits and their relevance for climate change impacts on vegetation. *New Phytologist* 205: 1008–1014.
- Anderegg WRL, Wolf A, Arango-Velez A, Choat B, Chmura DJ, Jansen S, Kolb T, Li S, Meinzer FC, Pita P, Dios VR de, Sperry JS, Wolfe BT, Pacala S. 2018. Woody plants optimise stomatal behaviour relative to hydraulic risk. *Ecology Letters* 21: 968–977.
- André J, Catesson AM, Liberman M. 1999. Characters and origin of vessels with heterogenous structure in leaf and flower abscission zones. *Canadian Journal of Botany* 77: 253–261.
- Anfodillo T, Deslauriers A, Menardi R, Tedoldi L, Petit G, Rossi S. 2012. Widening of xylem conduits in a conifer tree depends on the longer time of cell expansion downwards along the stem. *Journal of Experimental Botany* 63: 837–845.
- Angeles G, Bond B, Boyer JS, Brodribb T, Brooks JR, Burns MJ, Cavender-Bares J, Clearwater M, Cochard H, Comstock J, Davis SD, Domec J-C, Donovan L, Ewers F, Gartner B, Hacke U, Hinckley T, Holbrook NM, Jones HG, Kavanagh K, Law B, López-Portillo J, Lovisolo C, Martin T, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Meinzer FC, Melcher P, Mencuccini M, Mulkey S, Nardini A, Neufeld HS, Passioura J, Pockman WT, Pratt RB, Rambal S, Richter H, Sack L, Salleo S, Schubert A, Schulte P, Sparks JP, Sperry J, Teskey R, Tyree MT. 2004. The Cohesion-Tension Theory. *New Phytologist* 163: 451–452.
- Aranda I, Cano FJ, Gascó A, Cochard H, Nardini A, Mancha JA, López R, Sánchez-Gómez D. 2015. Variation in photosynthetic performance and hydraulic architecture across European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations supports the case for local adaptation to water stress. *Tree Physiology* 35: 34–46.

- von Arx G, Kueffer C, Fonti P. 2013. Quantifying plasticity in vessel grouping – added value from the image analysis tool ROXAS. *IAWA Journal* **34**: 433–445.
- Asner GP, Brodrick PG, Anderson CB, Vaughn N, Knapp DE, Martin RE. 2016. Progressive forest canopy water loss during the 2012–2015 California drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: E249–E255.
- Atkin OK, Macherel D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* **103**: 581–597.
- Attia Z, Domec J-C, Oren R, Way DA, Moshelion M. 2015. Growth and physiological responses of isohydric and anisohydric poplars to drought. *Journal of Experimental Botany* **66**: 4373–4381.
- Avci U, Petzold HE, Ismail IO, Beers EP, Haigler CH. 2008. Cysteine proteases XCP1 and XCP2 aid microautolysis within the intact central vacuole during xylogenesis in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **56**: 303–315.
- Awad H, Barigah T, Badel É, Cochard H, Herbette S. 2010. Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiologia Plantarum* **139**: 280–288.
- Awad H, Herbette S, Brunel N, Tixier A, Pilate G, Cochard H, Badel É. 2012. No trade-off between hydraulic and mechanical properties in several transgenic poplars modified for lignins metabolism. *Environmental and Experimental Botany* **77**: 185–195.
- Badel É, Ewers FW, Cochard H, Telewski FW. 2015. Acclimation of mechanical and hydraulic functions in trees: impact of the thigmomorphogenetic process. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Bamber RK. 1961. Staining reaction of the pit membrane of wood cells. *Nature* **191**: 409–410.
- Barigah TS, Charrier O, Douris M, Bonhomme M, Herbette S, Améglio T, Fichot R, Brignolas F, Cochard H. 2013. Water stress-induced xylem hydraulic failure is a causal factor of tree mortality in beech and poplar. *Annals of Botany* **112**: 1431–1437.
- Barigah TS, Ibrahim T, Bogard A, Faivre-Vuillin B, Lagneau LA, Montpied P, Dreyer E. 2006. Irradiance-induced plasticity in the hydraulic properties of saplings of different temperate broad-leaved forest tree species. *Tree Physiology* **26**: 1505–1516.
- Barrs HD. 1964. Heat of respiration as a possible cause of error in the estimation by psychrometric methods of water potential in plant tissue. *Nature* **203**: 1136–1137.
- Bartlett MK, Scoffoni C, Sack L. 2012. The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecology Letters* **15**: 393–405.
- Bartlett MK, Zhang Y, Kreidler N, Sun S, Ardy R, Cao K, Sack L. 2014. Global analysis of plasticity in turgor loss point, a key drought tolerance trait. *Ecology Letters* **17**: 1580–1590.
- Baskin TI. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: A review and a model. *Protoplasma* **215**: 150–171.
- Bauch J, Berndt H. 1973. Variability of the chemical composition of pit membranes in bordered pits of gymnosperms. *Wood Science and Technology* **7**: 6–19.
- van Bel AJE. 1990. Xylem-phloem exchange via the rays: The undervalued route of transport. *Journal of Experimental Botany* **41**: 631–644.
- Benito-Garzón M, González-Muñoz N, Wigneron J-P, Moisy C, Fernández-Manjarrés J, Delzon S. 2018. The legacy of water deficit on populations having experienced negative hydraulic safety margin. *Global Ecology and Biogeography* **27**: 346–356.
- Billon L-M, Blackman CJ, Cochard H, Hitmi A, Cartailier J, Souchal R, Torres-Ruiz JM. *soumis*. The DroughtBox: A new standard tool for phenotyping plant residual transpiration.
- Blackman CJ, Brodrick TJ, Jordan GJ. 2012. Leaf hydraulic vulnerability influences species' bioclimatic limits in a diverse group of woody angiosperms. *Oecologia* **168**: 1–10.
- Blackman CJ, Creek D, Maier C, Aspinwall MJ, Drake JE, Pfautsch S, O'Grady A, Delzon S, Medlyn BE, Tissue DT, Choat B. 2019. Drought response strategies and hydraulic traits contribute to mechanistic understanding of plant dry-down to hydraulic failure. *Tree Physiology* **39**: 910–924.
- Blackman CJ, Pfautsch S, Choat B, Delzon S, Gleason SM, Duursma RA. 2016. Toward an index of desiccation time to tree mortality under drought. *Plant, Cell & Environment* **39**: 2342–2345.

- Borghetti M, Edwards WRN, Grace J, Jarvis PG, Raschi A. 1991.** The refilling of embolized xylem in *Pinus sylvestris* L. *Plant, Cell & Environment* **14**: 357–369.
- Bouche PS, Jansen S, Sabalera JC, Cochard H, Burlett R, Delzon S. 2016.** Low intra-tree variability in resistance to embolism in four Pinaceae species. *Annals of Forest Science* **73**: 681–689.
- Bouche PS, Larter M, Domec J-C, Burlett R, Gasson P, Jansen S, Delzon S. 2014.** A broad survey of hydraulic and mechanical safety in the xylem of conifers. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4419–4431.
- Brendel O, Cochard H, Birot Y, Gracia C, Palahí M. 2011.** How plant species cope with water stress. *Water for forest and people in the Mediterranean: a challenging balance*. European Forest Institute, Finland: 76–80.
- Briggs LJ. 1955.** Maximum superheating of water as a measure of negative pressure. *Journal of Applied Physics* **26**: 1001–1003.
- Brodersen CR, Knipfer T, McElrone AJ. 2018.** In vivo visualization of the final stages of xylem vessel refilling in grapevine (*Vitis vinifera*) stems. *New Phytologist* **217**: 117–126.
- Brodersen CR, Lee EF, Choat B, Jansen S, Phillips RJ, Shackel KA, McElrone AJ, Matthews MA. 2011.** Automated analysis of three-dimensional xylem networks using high-resolution computed tomography. *New Phytologist* **191**: 1168–1179.
- Brodersen CR, McElrone AJ, Choat B, Matthews MA, Shackel KA. 2010.** The dynamics of embolism repair in xylem: In vivo visualizations using high-resolution computed tomography. *Plant Physiology* **154**: 1088–1095.
- Brodrribb TJ. 2017.** Progressing from ‘functional’ to mechanistic traits. *New Phytologist* **215**: 9–11.
- Brodrribb TJ, Bienaimé D, Marmottant P. 2016.** Revealing catastrophic failure of leaf networks under stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 4865–4869.
- Brodrribb TJ, Bowman DJMS, Nichols S, Delzon S, Burlett R. 2010.** Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist* **188**: 533–542.
- Brodrribb TJ, Carriqui M, Delzon S, Lucani C. 2017.** Optical Measurement of Stem Xylem Vulnerability. *Plant Physiology* **174**: 2054–2061.
- Brodrribb TJ, Cochard H. 2009.** Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant Physiology* **149**: 575–584.
- Brodrribb TJ, Cochard H, Dominguez CR. 2019.** Measuring the pulse of trees; using the vascular system to predict tree mortality in the 21st century. *Conservation Physiology* **7**.
- Brodrribb TJ, Holbrook NM, Edwards EJ, Gutiérrez MV. 2003.** Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell & Environment* **26**: 443–450.
- Brodrribb TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Martins SCV. 2014.** Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 14489–14493.
- Bryla DR, Bouma TJ, Eissenstat DM. 1997.** Root respiration in citrus acclimates to temperature and slows during drought. *Plant, Cell & Environment* **20**: 1411–1420.
- Bryla DR, Bouma TJ, Hartmond U, Eissenstat DM. 2001.** Influence of temperature and soil drying on respiration of individual roots in citrus: integrating greenhouse observations into a predictive model for the field. *Plant, Cell & Environment* **24**: 781–790.
- Bueno A, Alfarhan A, Arand K, Burghardt M, Deininger A-C, Hedrich R, Leide J, Seufert P, Staiger S, Riederer M. 2019.** Effects of temperature on the cuticular transpiration barrier of two desert plants with water-spender and water-saver strategies. *Journal of Experimental Botany* **70**: 1613–1625.
- Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH, Ye Z-H. 2001.** A Katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *The Plant Cell* **13**: 807–827.
- Butterfield BG, Meylan BA. 1982.** Cell wall hydrolysis in the tracheary elements of the secondary xylem In: Baas P, ed. *Forestry Sciences. New Perspectives in Wood Anatomy: Published on the occasion of the 50th Anniversary of the International Association of Wood Anatomists*. Dordrecht: Springer Netherlands, 71–84.
- Cai J, Li S, Zhang H, Zhang S, Tyree MT. 2014.** Recalcitrant vulnerability curves: methods of analysis and the concept of fibre bridges for enhanced cavitation resistance. *Plant, Cell & Environment* **37**: 35–44.
- Cai J, Zhang S, Tyree MT. 2010.** A computational algorithm addressing how vessel length might depend on vessel diameter. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1234–1238.

- Calabrò F, Lee KP, Mattia D. 2013.** Modelling flow enhancement in nanochannels: Viscosity and slippage. *Applied Mathematics Letters* **26**: 991–994.
- Canny MJ. 1997.** Vessel contents during transpiration—embolisms and refilling. *American Journal of Botany* **84**: 1223–1230.
- Cardoso AA, Brodribb TJ, Lucani CJ, DaMatta FM, McAdam SAM. 2018.** Coordinated plasticity maintains hydraulic safety in sunflower leaves. *Plant, Cell & Environment* **41**: 2567–2576.
- Cartailler J, Souchal R, Billon L-M, Cochard H. 2018.** LA DROUGHT(1)-BOX pour mesurer les cinétiques de transpiration résiduelle des arbres. In: *J2M2018 - 15e journées de la mesure et de la métrologie* (p. 31), St Pierre d'Oléron, FRA (2018-10-08 - 2018-10-11).
- Chaffey NJ, Barnett JR, Barlow PW. 1997.** Cortical microtubule involvement in bordered pit formation in secondary xylem vessel elements of *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae): A correlative study using electron microscopy and indirect immunofluorescence microscopy. *Protoplasma* **197**: 64–75.
- Charrier G, Delzon S, Domec J-C, Zhang L, Delmas CEL, Merlin I, Corso D, King A, Ojeda H, Ollat N, Prieto JA, Scholach T, Skinner P, van Leeuwen C, Gambetta GA. 2018.** Drought will not leave your glass empty: Low risk of hydraulic failure revealed by long-term drought observations in world's top wine regions. *Science Advances* **4**: eaao6969.
- Charrier G, Torres-Ruiz JM, Badel É, Burlett R, Choat B, Cochard H, Delmas CEL, Domec J-C, Jansen S, King A, Lenoir N, Martin-StPaul N, Gambetta GA, Delzon S. 2016.** Evidence for hydraulic vulnerability segmentation and lack of xylem refilling under tension. *Plant Physiology* **172**: 1657–1668.
- Chauvin T. 2019.** Adaptation au changement climatique et potentiel évolutif du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Franco.): rôle des traits hydrauliques, microdensitométriques et anatomiques du xylème. *Thèse*, AgroParisTech.
- Chauvin T, Cochard H, Segura V, Rozenberg P. 2019.** Native-source climate determines the Douglas-fir potential of adaptation to drought. *Forest Ecology and Management* **444**: 9–20.
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J. 2003.** Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology* **131**: 41–48.
- Choat B, Brodersen CR, McElrone AJ. 2015.** Synchrotron X-ray microtomography of xylem embolism in *Sequoia sempervirens* saplings during cycles of drought and recovery. *New Phytologist* **205**: 1095–1105.
- Choat B, Brodie TW, Cobb AR, Zwieniecki MA, Holbrook NM. 2006.** Direct measurements of intervessel pit membrane hydraulic resistance in two angiosperm tree species. *American Journal of Botany* **93**: 993–1000.
- Choat B, Brodribb TJ, Brodersen CR, Duursma RA, López R, Medlyn BE. 2018.** Triggers of tree mortality under drought. *Nature* **558**: 531–539.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann J, Pratt RB, Sperry JS, Westoby M, Wright IJ, Zanne AE. 2012.** Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752–755.
- Choat B, Jansen S, Zwieniecki MA, Smets E, Holbrook NM. 2004.** Changes in pit membrane porosity due to deflection and stretching: the role of vested pits. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1569–1575.
- Choat B, Nolf M, López R, Peters JMR, Carins-Murphy MR, Creek D, Brodribb TJ. 2019.** Non-invasive imaging shows no evidence of embolism repair after drought in tree species of two genera. *Tree Physiology* **39**: 113–121.
- Christman MA, Sperry JS, Adler FR. 2009.** Testing the 'rare pit' hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytologist* **182**: 664–674.
- Cochard H. 1992.** Vulnerability of several conifers to air embolism. *Tree Physiology* **11**: 73–83.
- Cochard H. 2002.** A technique for measuring xylem hydraulic conductance under high negative pressures. *Plant, Cell & Environment* **25**: 815–819.
- Cochard H. 2019.** A new mechanism for tree mortality due to drought and heatwaves. *bioRxiv*: 531632.
- Cochard H, Badel E, Herbette S, Delzon S, Choat B, Jansen S. 2013.** Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: a critical review. *Journal of Experimental Botany* **64**: 4779–4791.

- Cochard H, Barigah ST, Kleinhentz M, Eshel A. 2008.** Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *Journal of Plant Physiology* **165**: 976–982.
- Cochard H, Bodet C, Améglio T, Cruiziat P. 2000.** Cryo-Scanning Electron Microscopy observations of vessel content during transpiration in walnut petioles. Facts or artifacts? *Plant Physiology* **124**: 1191–1202.
- Cochard H., Bréda N, Granier A, Aussenac G. 1992a.** Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L). *Annales des Sciences Forestières* **49**: 225–233.
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M. 2007.** Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiology* **27**: 1761–1767.
- Cochard H, Coll L, Roux XL, Améglio T. 2002.** Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiology* **128**: 282–290.
- Cochard H, Cruiziat P, Tyree MT. 1992b.** Use of positive pressures to establish vulnerability curves: Further support for the air-seeding hypothesis and implications for pressure-volume analysis. *Plant Physiology* **100**: 205–209.
- Cochard H, Damour G, Bodet C, Tharwat I, Poirier M, Améglio T. 2005.** Evaluation of a new centrifuge technique for rapid generation of xylem vulnerability curves. *Physiologia Plantarum* **124**: 410–418.
- Cochard H, Delzon S. 2013.** Hydraulic failure and repair are not routine in trees. *Annals of Forest Science* **70**: 659–661.
- Cochard H, Delzon S, Badel É. 2015.** X-ray microtomography (micro-CT): a reference technology for high-resolution quantification of xylem embolism in trees. *Plant, Cell & Environment* **38**: 201–206.
- Cochard H, Froux F, Mayr S, Coutand C. 2004.** Xylem wall collapse in water-stressed pine needles. *Plant Physiology* **134**: 401–408.
- Cochard H, Herbette S, Barigah T, Badel É, Ennajeh M, Vilagrosa A. 2010.** Does sample length influence the shape of xylem embolism vulnerability curves? A test with the Cavitron spinning technique. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1543–1552.
- Cochard H, Hölttä T, Herbette S, Delzon S, Mencuccini M. 2009.** New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. *Plant Physiology* **151**: 949–954.
- Cochard H, Peiffer M, Le Gall K, André G. 1997.** Developmental control of xylem hydraulic resistances and vulnerability to embolism in *Fraxinus excelsior* L.: impacts on water relations. *Journal of Experimental Botany* **48**: 655–663.
- Cohen S, Bennink J, Tyree M. 2003.** Air method measurements of apple vessel length distributions with improved apparatus and theory. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1889–1897.
- Cooke JEK, Martin TA, Davis JM. 2005.** Short-term physiological and developmental responses to nitrogen availability in hybrid poplar. *New Phytologist* **167**: 41–52.
- Corcuera L, Cochard H, Gil-Pelegrin E, Notivol E. 2011.** Phenotypic plasticity in mesic populations of *Pinus pinaster* improves resistance to xylem embolism (P50) under severe drought. *Trees* **25**: 1033–1042.
- Cowan IR. 1965.** Transport of water in the soil-plant-atmosphere system. *Journal of Applied Ecology* **2**: 221–239.
- Creek D, Blackman CJ, Brodribb TJ, Choat B, Tissue DT. 2018.** Coordination between leaf, stem, and root hydraulics and gas exchange in three arid-zone angiosperms during severe drought and recovery. *Plant, Cell & Environment* **41**: 2869–2881.
- Crombie DS, Hipkins MF, Milburn JA. 1985.** Gas penetration of pit membranes in the xylem of *Rhododendron* as the cause of acoustically detectable sap cavitation. *Functional Plant Biology* **12**: 445–453.
- Cuevas-Velazquez CL, Saab-Rincón G, Reyes JL, Covarrubias AA. 2016.** The unstructured N-terminal region of Arabidopsis group 4 Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit. *Journal of Biological Chemistry* **291**: 10893–10903.
- Darwin F. 1916.** On the relation between transpiration and stomatal aperture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **207**: 413–437.
- David-Schwartz R, Paudel I, Mizrahi M, Delzon S, Cochard H, Lukyanov V, Badel É, Capdeville G, Shklar G, Cohen S. 2016.** Indirect evidence for genetic differentiation in vulnerability to embolism in *Pinus halepensis*. *Frontiers in Plant Science* **7**.

- Davin LB, Lewis NG. 2000.** Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology* **123**: 453–462.
- Delzon S, Cochard H. 2014.** Recent advances in tree hydraulics highlight the ecological significance of the hydraulic safety margin. *New Phytologist* **203**: 355–358.
- Delzon S, Douthe C, Sala A, Cochard H. 2010.** Mechanism of water-stress induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal capillary-seeding. *Plant, Cell & Environment* **33**: 2101–2111.
- Dietrich L, Delzon S, Hoch G, Kahmen A. 2019.** No role for xylem embolism or carbohydrate shortage in temperate trees during the severe 2015 drought. *Journal of Ecology* **107**: 334–349.
- Dimond AE. 1966.** Pressure and flow relations in vascular bundles of the tomato plant. *Plant Physiology* **41**: 119–131.
- Dixon HH, Joly J. 1895.** On the ascent of sap. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. (B.)* **186**: 563–576.
- Domec J-C, Gartner BL. 2001.** Cavitation and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees* **15**: 204–214.
- Domec J-C, Lachenbruch B, Meinzer FC, Woodruff DR, Warren JM, McCulloh KA. 2008.** Maximum height in a conifer is associated with conflicting requirements for xylem design. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 12069–12074.
- Domec J-C, Warren JM, Meinzer FC, Lachenbruch B. 2009.** Safety factors for xylem failure by implosion and air-seeding within roots, trunks and branches of young and old conifer trees. *IAWA Journal* **30**: 101–120.
- Dória LC, Meijs C, Podadera DS, Del Arco M, Smets E, Delzon S, Lens F. 2019.** Embolism resistance in stems of herbaceous Brassicaceae and Asteraceae is linked to differences in woodiness and precipitation. *Annals of Botany* **124**: 1–14.
- Duan H, Amthor JS, Duursma RA, O’Grady AP, Choat B, Tissue DT. 2013.** Carbon dynamics of eucalypt seedlings exposed to progressive drought in elevated [CO₂] and elevated temperature. *Tree Physiology* **33**: 779–792.
- Duursma RA, Blackman CJ, López R, Martin-StPaul NK, Cochard H, Medlyn BE. 2019.** On the minimum leaf conductance: its role in models of plant water use, and ecological and environmental controls. *New Phytologist* **221**: 693–705.
- Edlefsen N, Anderson A. 1943.** Thermodynamics of soil moisture. *Hilgardia* **15**: 31–298.
- El Aou-ouad H, López R, Venturas M, Martorell S, Medrano H, Gullás J. 2017.** Low resistance to cavitation and xylem anatomy partly explain the decrease in the endemic *Rhamnus ludovici-salvatoris*. *Flora* **229**: 1–8.
- Ewers FW, Améglio T, Cochard H, Beaujard F, Martignac M, Vandame M, Bodet C, Cruiziat P. 2001.** Seasonal variation in xylem pressure of walnut trees: root and stem pressures. *Tree Physiology* **21**: 1123–1132.
- Ewers FW, Ewers JM, Jacobsen AL, López-Portillo J. 2007.** Vessel redundancy: Modeling safety in numbers. *IAWA Journal* **28**: 373–388.
- Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, Laurans F, Cochard H, Brignolas F. 2010.** Common trade-offs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1553–1568.
- Fichot R, Brignolas F, Cochard H, Ceulemans R. 2015.** Vulnerability to drought-induced cavitation in poplars: synthesis and future opportunities. *Plant, Cell & Environment* **38**: 1233–1251.
- Fisher JC. 1948.** The fracture of liquids. *Journal of Applied Physics* **19**: 1062–1067.
- Freudenberg K. 1959.** Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature* **183**: 1152–1155.
- Fritts HC. 1958.** An analysis of radial growth of beech in a central Ohio forest during 1954–1955. *Ecology* **39**: 705–720.
- Fromm J, Rockel B, Lautner S, Windeisen E, Wanner G. 2003.** Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques. *Journal of Structural Biology* **143**: 77–84.
- Gardner WR. 1960.** Dynamic aspects of water availability to plants. *Soil Science* **89**: 63.

- Gardner WR, Ehlig CF. 1962.** Impedance to water movement in soil and plant. *Science* **138**: 522–523.
- Giordano R, Salleo A, Salleo S, Wanderlingh F. 1978.** Flow in xylem vessels and Poiseuille's law. *Canadian Journal of Botany* **56**: 333–338.
- Gleason SM, Blackman CJ, Cook AM, Laws CA, Westoby M. 2014.** Whole-plant capacitance, embolism resistance and slow transpiration rates all contribute to longer desiccation times in woody angiosperms from arid and wet habitats. *Tree Physiology* **34**: 275–284.
- Gleason SM, Westoby M, Jansen S, Choat B, Hacke UG, Pratt RB, Bhaskar R, Brodribb TJ, Bucci SJ, Cao K-F, Cochard H, Delzon S, Domec J-C, Fan Z-X, Feild TS, Jacobsen AL, Johnson DM, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, McCulloh KA, Mencuccini M, Mitchell PJ, Morris H, Nardini A, Pittermann J, Plavcová L, Schreiber SG, Sperry JS, Wright IJ, Zanne AE. 2016.** Weak tradeoff between xylem safety and xylem-specific hydraulic efficiency across the world's woody plant species. *New Phytologist* **209**: 123–136.
- Gleason SM, Wiggans DR, Bliss CA, Comas LH, Cooper M, DeJonge KC, Young JS, Zhang H. 2017.** Coordinated decline in photosynthesis and hydraulic conductance during drought stress in *Zea mays*. *Flora* **227**: 1–9.
- González-Muñoz N, Sterck F, Torres-Ruiz JM, Petit G, Cochard H, Arx G von, Lintunen A, Caldeira MC, Capdeville G, Copini P, Gebauer R, Grönlund L, Hölttä T, Lobo-do-Vale R, Peltoniemi M, Stritih A, Urban J, Delzon S. 2018.** Quantifying in situ phenotypic variability in the hydraulic properties of four tree species across their distribution range in Europe. *PLOS ONE* **13**: e0196075.
- van der Graaff N, Baas P. 1974.** Wood anatomical variation in relation to. *Blumea*, **22**: 101–121.
- Green JL, Durben DJ, Wolf GH, Angell CA. 1990.** Water and solutions at negative pressure: Raman spectroscopic study to -80 megapascals. *Science* **249**: 649–652.
- Groover A, DeWitt N, Heidel A, Jones A. 1997.** Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. *Protoplasma* **196**: 197–211.
- Grossiord C, Sevanto S, Adams HD, Collins AD, Dickman LT, McBranch N, Michaletz ST, Stockton EA, Vigil M, McDowell NG. 2017.** Precipitation, not air temperature, drives functional responses of trees in semi-arid ecosystems. *Journal of Ecology*: 163–175.
- Guérin C, Roche J, Allard V, Ravel C, Mouzeyar S, Bouzidi MF. 2019.** Genome-wide analysis, expansion and expression of the NAC family under drought and heat stresses in bread wheat (*T. aestivum* L.). *PLOS ONE* **14**: e0213390.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA. 2001a.** Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**: 457–461.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L. 2006.** Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiology* **26**: 689–701.
- Hacke UG, Spicer R, Schreiber SG, Plavcová L. 2017.** An ecophysiological and developmental perspective on variation in vessel diameter. *Plant, Cell & Environment* **40**: 831–845.
- Hacke UG, Stiller V, Sperry JS, Pittermann J, McCulloh KA. 2001b.** Cavitation Fatigue. Embolism and Refilling Cycles Can Weaken the Cavitation Resistance of Xylem. *Plant Physiology* **125**: 779–786.
- Hacke UG, Venturas MD, MacKinnon ED, Jacobsen AL, Sperry JS, Pratt RB. 2015.** The standard centrifuge method accurately measures vulnerability curves of long-vesselled olive stems. *New Phytologist* **205**: 116–127.
- Hamilton ES, Jensen GS, Maksaev G, Katims A, Shero AM, Haswell ES. 2015.** Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* **350**: 438–441.
- Hammond WM, Yu K, Wilson LA, Will RE, Anderegg WRL, Adams HD. 2019.** Dead or dying? Quantifying the point of no return from hydraulic failure in drought-induced tree mortality. *New Phytologist* **223**: 1834–1843.
- Hartmann H, Moura CF, Anderegg WRL, Ruehr NK, Salmon Y, Allen CD, Arndt SK, Breshears DD, Davi H, Galbraith D, Ruthrof KX, Wunder J, Adams HD, Bloemen J, Cailleret M, Cobb R, Gessler A, Grams TEE, Jansen S, Kautz M, Lloret F, O'Brien M. 2018.** Research frontiers for improving our understanding of drought-induced tree and forest mortality. *New Phytologist* **218**: 15–28.

- Hartmann H, Ziegler W, Kolle O, Trumbore S. 2013.** Thirst beats hunger – declining hydration during drought prevents carbon starvation in Norway spruce saplings. *New Phytologist* **200**: 340–349.
- Herbette S, Bouchet B, Brunel N, Bonnin E, Cochard H, Guillon F. 2015.** Immunolabelling of intervessel pits for polysaccharides and lignin helps in understanding their hydraulic properties in *Populus tremula* × *alba*. *Annals of Botany* **115**: 187–199.
- Herbette S, Cochard H. 2010.** Calcium Is a Major Determinant of Xylem Vulnerability to Cavitation. *Plant Physiology* **153**: 1932–1939.
- Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. 2010.** TDIF Peptide Signaling Regulates Vascular Stem Cell Proliferation via the *WOX4* Homeobox Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 2618–2629.
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y, Fukuda H. 2008.** Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 15208–15213.
- Hiro K, Ohde Y, Tanzawa Y. 2003.** Stagnations of increasing trends in negative pressure with repeated cavitation in water/metal Berthelot tubes as a result of mechanical sealing. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**: 592–597.
- Hochberg U, Albuquerque C, Rachmilevitch S, Cochard H, David-Schwartz R, Brodersen CR, McElrone A, Windt CW. 2016.** Grapevine petioles are more sensitive to drought induced embolism than stems: evidence from in vivo MRI and microcomputed tomography observations of hydraulic vulnerability segmentation. *Plant, Cell & Environment* **39**: 1886–1894.
- Hochberg U, Rockwell FE, Holbrook NM, Cochard H. 2018.** Iso/anisohydry: A plant–environment interaction rather than a simple hydraulic trait. *Trends in Plant Science* **23**: 112–120.
- Hochberg U, Windt CW, Ponomarenko A, Zhang Y-J, Gersony J, Rockwell FE, Holbrook NM. 2017.** Stomatal closure, basal leaf embolism, and shedding protect the hydraulic integrity of grape stems. *Plant Physiology* **174**: 764–775.
- Holbrook NM, Burns MJ, Field CB. 1995.** Negative xylem pressures in plants: A test of the balancing pressure technique. *Science* **270**: 1193–1194.
- Holbrook NM, Zwieniecki MA. 1999.** Embolism repair and xylem tension: Do we need a miracle? *Plant Physiology* **120**: 7–10.
- van den Honert TH. 1948.** Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society* **3**: 146–153.
- Huang C, Zhang R, Gui J, Zhong Y, Li L. 2018.** The receptor-like kinase *AtVRLK1* regulates secondary cell wall thickening. *Plant Physiology* **177**: 671–683.
- Im K-H, Cosgrove DJ, Jones AM. 2000.** Subcellular localization of expansin mRNA in xylem cells. *Plant Physiology* **123**: 463–470.
- Impens II, Schalck JM. 1965.** A very sensitive electric dendrograph for recording radial changes of a tree. *Ecology* **46**: 183–184.
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H. 2006.** Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**: 842–845.
- Jacobsen AL, Pratt RB. 2018.** Going with the flow: Structural determinants of vascular tissue transport efficiency and safety: Structural determinants of hydraulic transport. *Plant, Cell & Environment* **41**: 2715–2717.
- Jacobsen AL, Pratt RB, Tobin MF, Hacke UG, Ewers FW. 2012.** A global analysis of xylem vessel length in woody plants. *American Journal of Botany* **99**: 1583–1591.
- Jacobsen AL, Pratt RB, Venturas MD, Hacke UG. 2019.** Large volume vessels are vulnerable to water-stress-induced embolism in stems of poplar. *IAWA Journal* **40**: 4-S4.
- Jansen S, Baas P, Gasson P, Lens F, Smets E. 2004.** Variation in xylem structure from tropics to tundra: Evidence from vestured pits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 8833–8837.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A. 2009.** Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in angiosperms. *American Journal of Botany* **96**: 409–419.

- Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Güçlü J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schäffner AR, Bouchez D, Maurel C. 2003.** Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *The Plant Cell* **15**: 509–522.
- Jeffreys HMA. 1918.** Some problems of evaporation. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **35**: 270–280.
- Ji J, Strable J, Shimizu R, Koenig D, Sinha N, Scanlon MJ. 2010.** WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiology* **152**: 1346–1356.
- Jia X, Zhang L, Ma R, Wang Z, Zhang Q, Yao Y. 2006.** Ultrasonic acoustic emissions from leaf xylem of potted wheat subject to a soil drought and rewatering cycle. *Agricultural Sciences in China* **5**: 346–355.
- Jinagool W, Lamacque L, Delmas M, Delzon S, Cochard H, Herbette S. 2018.** Is there variability for xylem vulnerability to cavitation in walnut tree cultivars and species (*Juglans* spp.)? *HortScience* **53**: 132–137.
- Jinagool W, Rattanawong R, Sangsing K, Barigah TS, Gay F, Cochard H, Kasemsap P, Herbette S. 2015.** Clonal variability for vulnerability to cavitation and other drought-related traits in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Journal of Plant Hydraulics* **2**: e001.
- Johnson KM, Jordan GJ, Brodribb TJ. 2018.** Wheat leaves embolized by water stress do not recover function upon rewatering. *Plant, Cell & Environment* **41**: 2704–2714.
- Jones HG. 2013.** Plant water relations. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*, Cambridge university press, 68–98.
- Jones HG, Sutherland RA. 1991.** Stomatal control of xylem embolism. *Plant, Cell & Environment* **14**: 607–612.
- Jordan CF, Kline JR. 1977.** Transpiration of trees in a tropical rainforest. *Journal of Applied Ecology* **14**: 853–860.
- Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K. 2011.** Temporal and spatial diversities of the immunolabeling of mannan and xylan polysaccharides in differentiating earlywood ray cells and pits of *Cryptomeria japonica*. *Planta* **233**: 109–122.
- Kim JS, Daniel G. 2013.** Developmental localization of homogalacturonan and xyloglucan epitopes in pit membranes varies between pit types in two poplar species. *IAWA Journal* **34**: 245–262.
- Kitin P, Voelker SL, Meinzer FC, Beeckman H, Strauss SH, Lachenbruch B. 2010.** Tyloses and phenolic deposits in xylem vessels impede water transport in low-lignin transgenic poplars: A study by cryo-fluorescence microscopy. *Plant Physiology* **154**: 887–898.
- Klein T, Zeppel MJB, Anderegg WRL, Bloemen J, De Kauwe MG, Hudson P, Ruehr NK, Powell TL, von Arx G, Nardini A. 2018.** Xylem embolism refilling and resilience against drought-induced mortality in woody plants: processes and trade-offs. *Ecological Research* **33**: 839–855.
- Klepper B. 1968.** Diurnal pattern of water potential in woody plants. *Plant Physiology* **43**: 1931–1934.
- Klepsch MM, Schmitt M, Paul Knox J, Jansen S. 2016.** The chemical identity of intervessel pit membranes in *Acer* challenges hydrogel control of xylem hydraulic conductivity. *AoB PLANTS* **8**.
- Klepsch M, Zhang Y, Kotowska MM, Lamarque LJ, Nolf M, Schuldts B, Torres-Ruiz JM, Qin D-W, Choat B, Delzon S, Scoffoni C, Cao K-F, Jansen S. 2018.** Is xylem of angiosperm leaves less resistant to embolism than branches? Insights from microCT, hydraulics, and anatomy. *Journal of Experimental Botany* **69**: 5611–5623.
- Knipfer T, Cuneo IF, Brodersen CR, McElrone AJ. 2016.** In situ visualization of the dynamics in xylem embolism formation and removal in the absence of root pressure: A study on excised grapevine stems. *Plant Physiology* **171**: 1024–1036.
- Knipfer T, Reyes C, Earles JM, Berry ZC, Johnson DM, Brodersen CR, McElrone AJ. 2019.** Spatiotemporal coupling of vessel cavitation and discharge of stored xylem water in a tree sapling. *Plant Physiology* **179**: 1658–1668.
- Koch GW, Sillett SC, Jennings GM, Davis SD. 2004.** The limits to tree height. *Nature* **428**: 851–854.
- Koddenberg T, Wentzel M, Militz H. 2019.** Volumetric estimate of bordered pits in *Pinus sylvestris* based on X-ray tomography and light microscopy imaging. *Micron* **124**: 102704.
- Kohonen MM. 2006.** Engineered wettability in tree capillaries. *Langmuir* **22**: 3148–3153.
- Kohonen MM, Helland Å. 2009.** On the function of wall sculpturing in xylem conduits. *Journal of Bionic Engineering* **6**: 324–329.

- Kondo Y, Hirakawa Y, Kieber JJ, Fukuda H. 2011.** CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. *Plant and Cell Physiology* **52**: 37–48.
- Kramer PJ. 1937.** The relation between rate of transpiration and rate of absorption of water in plants. *American Journal of Botany* **24**: 10–15.
- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T. 2005.** Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development* **19**: 1855–1860.
- Kuparinen A, Savolainen O, Schurr FM. 2010.** Increased mortality can promote evolutionary adaptation of forest trees to climate change. *Forest Ecology and Management* **259**: 1003–1008.
- Kwak H-Y, Panton RL. 1985.** Tensile strength of simple liquids predicted by a model of molecular interactions. *Journal of Physics D: Applied Physics* **18**: 647–659.
- Lamarque LJ, Corso D, Torres-Ruiz JM, Badel É, Brodribb TJ, Burlett R, Charrier G, Choat B, Cochard H, Gambetta GA, Jansen S, King A, Lenoir N, Martin-StPaul N, Steppe K, Van den Bulcke J, Zhang Y, Delzon S. 2018.** An inconvenient truth about xylem resistance to embolism in the model species for refilling *Laurus nobilis* L. *Annals of Forest Science* **75**: 88.
- Lamy J-B, Bouffier L, Burlett R, Plomion C, Cochard H, Delzon S. 2011.** Uniform selection as a primary force reducing population genetic differentiation of cavitation resistance across a species range. *PLOS ONE* **6**: e23476.
- Lamy J-B, Delzon S, Bouche PS, Alia R, Vendramin GG, Cochard H, Plomion C. 2014.** Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytologist* **201**: 874–886.
- Lamy J-B, Plomion C, Kremer A, Delzon S. 2012.** QST < FST As a signature of canalization. *Molecular Ecology* **21**: 5646–5655.
- Larmor JFRS. 1918.** On transpiration through leaf-stomata. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **35**: 350–352.
- Larter M, Brodribb TJ, Pfautsch S, Burlett R, Cochard H, Delzon S. 2015.** Extreme aridity pushes trees to their physical limits. *Plant Physiology* **168**: 804–807.
- Larter M, Pfautsch S, Domec J-C, Trueba S, Nagalingum N, Delzon S. 2017.** Aridity drove the evolution of extreme embolism resistance and the radiation of conifer genus *Callitris*. *New Phytologist* **215**: 97–112.
- Laschimke R. 1989.** Investigation of the wetting behaviour of natural lignin - a contribution to the cohesion theory of water transport in plants. *Thermochimica Acta* **151**: 35–56.
- Leclerc JC. 1999.** *Ecophysiologie végétale*. Université de Saint-Etienne.
- Lee SJ, Hwang BG, Kim HK. 2013.** Hydraulic characteristics of water-refilling process in excised roots of *Arabidopsis*. *Planta* **238**: 307–315.
- Lemaire C, Quilichini Y, Brunel-Michac N, Santini J, Berti L, Souchal R, Cartailier J, Conchon P, Badel É, Herbette S. 2016.** Plasticity of the xylem vulnerability to cavitation in Poplar relies on xylem and vessel properties rather than on pit structure. Submitted to *Annals of Botany*.
- Lens F, Picon-Cochard C, Delmas CEL, Signarbieux C, Buttler A, Cochard H, Jansen S, Chauvin T, Doria LC, Arco M del, Delzon S. 2016.** Herbaceous angiosperms are not more vulnerable to drought-induced embolism than angiosperm trees. *Plant Physiology* **172**: 661–667.
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S. 2011.** Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytologist* **190**: 709–723.
- Lens F, Tixier A, Cochard H, Sperry JS, Jansen S, Herbette S. 2013.** Embolism resistance as a key mechanism to understand adaptive plant strategies. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 287–292.
- Li S, Lens F, Espino S, Karimi Z, Klepsch M, Schenk HJ, Schmitt M, Schuldt B, Jansen S. 2016.** Intervessel pit membrane thickness as a key determinant of embolism resistance in angiosperm xylem. *IWA Journal* **37**: 152–171.
- Li Y, Sperry JS, Shao M. 2009.** Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 341–346.

- Limousin J-M, Longepierre D, Huc R, Rambal S. 2010.** Change in hydraulic traits of Mediterranean *Quercus ilex* subjected to long-term throughfall exclusion. *Tree Physiology* **30**: 1026–1036.
- Limousin J-M, Rambal S, Ourcival J-M, Rodríguez-Calcerrada J, Pérez-Ramos IM, Rodríguez-Cortina R, Misson L, Joffre R. 2012.** Morphological and phenological shoot plasticity in a Mediterranean evergreen oak facing long-term increased drought. *Oecologia* **169**: 565–577.
- Lobo A, Torres-Ruiz JM, Burlett R, Lemaire C, Parise C, Francioni C, Truffaut L, Tomášková I, Hansen JK, Kjær ED, Kremer A, Delzon S. 2018.** Assessing inter- and intraspecific variability of xylem vulnerability to embolism in oaks. *Forest Ecology and Management* **424**: 53–61.
- Loepfe L, Martínez-Vilalta J, Piñol J, Mencuccini M. 2007.** The relevance of xylem network structure for plant hydraulic efficiency and safety. *Journal of Theoretical Biology* **247**: 788–803.
- López R, Cano FJ, Choat B, Cochard H, Gil L. 2016.** Plasticity in vulnerability to cavitation of *Pinus canariensis* occurs only at the driest end of an aridity gradient. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- López R, López de Heredia U, Collada C, Cano FJ, Emerson BC, Cochard H, Gil L. 2013.** Vulnerability to cavitation, hydraulic efficiency, growth and survival in an insular pine (*Pinus canariensis*). *Annals of Botany* **111**: 1167–1179.
- López R, Nolf M, Duursma RA, Badel É, Flavel RJ, Cochard H, Choat B. 2019.** Mitigating the open vessel artefact in centrifuge-based measurement of embolism resistance. *Tree Physiology* **39**: 143–155.
- Losso A, Bär A, Dämon B, Dullin C, Ganthaler A, Petruzzellis F, Savi T, Tromba G, Nardini A, Mayr S, Beikircher B. 2019.** Insights from in vivo micro-CT analysis: testing the hydraulic vulnerability segmentation in *Acer pseudoplatanus* and *Fagus sylvatica* seedlings. *New Phytologist* **221**: 1831–1842.
- Losso A, Beikircher B, Dämon B, Kikuta S, Schmid P, Mayr S. 2017.** Xylem sap surface tension may be crucial for hydraulic safety. *Plant Physiology* **175**: 1135–1143.
- Lucani CJ, Brodribb TJ, Jordan G, Mitchell PJ. 2019.** Intraspecific variation in drought susceptibility in *Eucalyptus globulus* is linked to differences in leaf vulnerability. *Functional Plant Biology* **46**: 286–293.
- Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav S-R, Helariutta Y, He X-Q, Fukuda H, Kang J, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, López-Millán A-F, Grusak MA, Kachroo P. 2013.** The plant vascular system: Evolution, development and functions. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**: 294–388.
- Ly D, Huet S, Gauffreteau A, Rincet R, Touzy G, Mini A, Jannink J-L, Cormier F, Paux E, Lafarge S, Le Gouis J, Charmet G. 2018.** Whole-genome prediction of reaction norms to environmental stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by genomic random regression. *Field Crops Research* **216**: 32–41.
- Lybeck BR. 1959.** Winter freezing in relation to the rise of sap in tall trees. *Plant Physiology* **34**: 482–486.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB. 2004.** Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184–2199.
- Maherali H, Williams BL, Paige KN, Delucia EH. 2002.** Hydraulic differentiation of *Ponderosa* pine populations along a climate gradient is not associated with ecotypic divergence. *Functional Ecology* **16**: 510–521.
- Mao G, Buschmann H, Doonan JH, Lloyd CW. 2006.** The role of MAP65-1 in microtubule bundling during *Zinnia* tracheary element formation. *Journal of Cell Science* **119**: 753–758.
- Martin G, Devictor V, Motard É, Machon N, Porcher E. 2019.** Short-term climate-induced change in French plant communities. *Biology Letters* **15**: 20190280.
- Martínez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, Sterck F, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E, Nolè A, Poyatos R, Ripullone F, Sass-Klaassen U, Zweifel R. 2009.** Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist* **184**: 353–364.
- Martínez-Vilalta J, Garcia-Forner N. 2017.** Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant, Cell & Environment* **40**: 962–976.
- Martínez-Vilalta J, Mencuccini M, Álvarez X, Camacho J, Loepfe L, Piñol J. 2012.** Spatial distribution and packing of xylem conduits. *American Journal of Botany* **99**: 1189–1196.
- Martínez-Vilalta J, Poyatos R, Aguadé D, Retana J, Mencuccini M. 2014.** A new look at water transport regulation in plants. *New Phytologist* **204**: 105–115.

- Martin-StPaul NK, Delzon S, Cochard H. 2017.** Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* **20**: 1437–1447.
- Martin-StPaul NK, Longepierre D, Huc R, Delzon S, Burlett R, Joffre R, Rambal S, Cochard H. 2014.** How reliable are methods to assess xylem vulnerability to cavitation? The issue of ‘open vessel’ artifact in oaks. *Tree Physiology* **34**: 894–905.
- Matzner SL, Ronning N, Hawkinson J, Cummiskey T, Buchanan J, Miller E, Carlisle G. 2019.** Does acclimation in cavitation resistance due to mechanical perturbation support the pit area or conduit reinforcement hypotheses in *Phaseolus vulgaris*? *Physiologia Plantarum*. In press.
- McAdam SAM, Cardoso AA. 2018.** The recurrent evolution of extremely resistant xylem. *Annals of Forest Science* **76**: 2.
- McCarthy RL, Zhong R, Ye Z-H. 2009.** MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1950–1964.
- McCully M, Canny M, Baker A, Miller C. 2014.** Some properties of the walls of metaxylem vessels of maize roots, including tests of the wettability of their luminal wall surfaces. *Annals of Botany* **113**: 977–989.
- McDowell NG, Grossiord C, Adams HD, Pinzón-Navarro S, Mackay DS, Breshears DD, Allen CD, Borrego I, Dickman LT, Collins A, Gaylord M, McBranch N, Pockman WT, Vilagrosa A, Aukema B, Goodsman D, Xu C. 2019.** Mechanisms of a coniferous woodland persistence under drought and heat. *Environmental Research Letters* **14**: 045014.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer EA. 2008.** Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719–739.
- McElrone AJ, Pockman WT, Martínez-Vilalta J, Jackson RB. 2004.** Variation in xylem structure and function in stems and roots of trees to 20 m depth. *New Phytologist* **163**: 507–517.
- Medeiros JS, Lens F, Maherali H, Jansen S. 2019.** Vessured pits and scalariform perforation plate morphology modify the relationships between angiosperm vessel diameter, climate and maximum plant height. *New Phytologist* **221**: 1802–1813.
- Meinzer FC, Grantz DA. 1990.** Stomatal and hydraulic conductance in growing sugarcane: stomatal adjustment to water transport capacity. *Plant, Cell & Environment* **13**: 383–388.
- Meinzer FC, Johnson DM, Lachenbruch B, McCulloh KA, Woodruff DR. 2009.** Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* **23**: 922–930.
- Meinzer FC, McCulloh KA, Lachenbruch B, Woodruff DR, Johnson DM. 2010.** The blind men and the elephant: the impact of context and scale in evaluating conflicts between plant hydraulic safety and efficiency. *Oecologia* **164**: 287–296.
- Metcalfe C, Chalk L. 1950.** Anatomy of the Dicotyledons. Vol. II Calrendon Press. Oxford. 1315-1320 & 1349-1350.
- Meylan BA, Butterfield BG. 1978.** Occurrence of helical thickenings in the vessels of New Zealand woods. *New Phytologist* **81**: 139–146.
- Miburn JA, Johnson RPC. 1966.** The conduction of sap. II. Detection of vibrations produced by sap cavitations in Ricinus stem. *Planta*. **69**: 43–52.
- Milburn JA. 1996.** Sap ascent in vascular plants: Challengers to the cohesion theory ignore the significance of immature xylem and the recycling of Münch water. *Annals of Botany* **78**: 399–407.
- Milburn JA, McLaughlin ME. 1974.** Studies of cavitation in isolated vascular bundles and whole leaves of *Plantago major* L. *New Phytologist* **73**: 861–871.
- Milthorpe FL. 1960.** Water relationships of plants in arid and semi-arid conditions. *Nature* **185**: 435–6.
- Moore GW, Edgar CB, Vogel JG, Washington-Allen RA, March RG, Zehnder R. 2016.** Tree mortality from an exceptional drought spanning mesic to semiarid ecoregions. *Ecological Applications* **26**: 602–611.
- Morris H, Plavcová L, Gorai M, Klepsch MM, Kotowska M, Schenk HJ, Jansen S. 2018.** Vessel-associated cells in angiosperm xylem: Highly specialized living cells at the symplast–apoplast boundary. *American Journal of Botany* **105**: 151–160.

- Mrad A, Domec J-C, Huang C-W, Lens F, Katul G. 2018.** A network model links wood anatomy to xylem tissue hydraulic behaviour and vulnerability to cavitation. *Plant, Cell & Environment* **41**: 2718–2730.
- Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S. 2011.** Refilling embolized xylem conduits: Is it a matter of phloem unloading? *Plant Science* **180**: 604–611.
- Newman EI, Monteith JL, Weatherley PE. 1976.** Water movement through root systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **273**: 463–478.
- Niez B. 2018.** Acclimatation de l'arbre aux flexions répétées et conséquences sur le comportement mécanique et les propriétés hydrauliques du bois vert. *Thèse*, Université Clermont Auvergne.
- Niez B, Dlouha J, Moulia B, Badel É. 2019.** Water-stressed or not, the mechanical acclimation is a priority requirement for trees. *Trees* **33**: 279–291.
- O'Brien TP. 1970.** Further observations on hydrolysis of the cell wall in the xylem. *Protoplasma* **69**: 1–14.
- O'Brien MJ, Burslem DFRP, Caduff A, Tay J, Hector A. 2015.** Contrasting nonstructural carbohydrate dynamics of tropical tree seedlings under water deficit and variability. *New Phytologist* **205**: 1083–1094.
- O'Brien MJ, Leuzinger S, Philipson CD, Tay J, Hector A. 2014.** Drought survival of tropical tree seedlings enhanced by non-structural carbohydrate levels. *Nature Climate Change* **4**: 710–714.
- Oda Y, Fukuda H. 2012a.** Secondary cell wall patterning during xylem differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 38–44.
- Oda Y, Fukuda H. 2012b.** Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* **337**: 1333–1336.
- Oda Y, Fukuda H. 2013.** Rho of plant GTPase signaling regulates the behavior of Arabidopsis Kinesin-13A to establish secondary cell wall patterns. *The Plant Cell* **25**: 4439–4450.
- Oda Y, Iida Y, Kondo Y, Fukuda H. 2010.** Wood cell-wall structure requires local 2D-microtubule disassembly by a novel plasma membrane-anchored protein. *Current Biology* **20**: 1197–1202.
- Oertli JJ. 1971.** Stability of water under tension in the xylem. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*.
- Ohashi-Ito K, Oda Y, Fukuda H. 2010.** Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *The Plant Cell* **22**: 3461–3473.
- Page GFM, Liu J, Grierson PF. 2011.** Three-dimensional xylem networks and phyllode properties of co-occurring *Acacia*. *Plant, Cell & Environment* **34**: 2149–2158.
- Pammenter NW, Van der Willigen C. 1998.** A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**: 589–593.
- Pan R, Tyree MT. 2019.** How does water flow from vessel to vessel? Further investigation of the tracheid bridge concept (M Mencuccini, Ed.). *Tree Physiology* **39**: 1019–1031.
- Passioura JB. 1980.** The meaning of matric potential. *Journal of Experimental Botany* **31**: 1161–1169.
- Pereira L, Bittencourt PRL, Oliveira RS, Junior MBM, Barros FV, Ribeiro RV, Mazzafera P. 2016.** Plant pneumatics: stem air flow is related to embolism – new perspectives on methods in plant hydraulics. *New Phytologist* **211**: 357–370.
- Pereira L, Flores-Borges DNA, Bittencourt PRL, Mayer JLS, Kiyota E, Araújo P, Jansen S, Freitas RO, Oliveira RS, Mazzafera P. 2018.** Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of the plant xylem. *Plant Physiology* **177**: 1629–1638.
- Pesquet E, Korolev AV, Calder G, Lloyd CW. 2010.** The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in Arabidopsis wood cells. *Current Biology* **20**: 744–749.
- Petit G, Pfautsch S, Anfodillo T, Adams MA. 2010.** The challenge of tree height in *Eucalyptus regnans*: when xylem tapering overcomes hydraulic resistance. *New Phytologist* **187**: 1146–1153.
- Petrzellis F, Pagliarani C, Savi T, Losso A, Cavalletto S, Tromba G, Dullin C, Bär A, Ganthaler A, Miotto A, Mayr S, Zwieniecki MA, Nardini A, Secchi F. 2018.** The pitfalls of in vivo imaging techniques: evidence for cellular damage caused by synchrotron X-ray computed micro-tomography. *New Phytologist* **220**: 104–110.

- Pittermann J, Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK, Sikkema EH. 2005.** Torus-margo pits help conifers compete with angiosperms. *Science* **310**: 1924–1924.
- Plavcová L, Hacke UG. 2012.** Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. *Journal of Experimental Botany* **63**: 6481–6491.
- Plavcová L, Hacke UG, Sperry JS. 2011.** Linking irradiance-induced changes in pit membrane ultrastructure with xylem vulnerability to cavitation. *Plant, Cell & Environment* **34**: 501–513.
- Plavcová L, Jansen S, Klepsch M, Hacke UG. 2013.** Nobody's perfect: can irregularities in pit structure influence vulnerability to cavitation? *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Pockman WT, Sperry JS, O'Leary JW. 1995.** Sustained and significant negative water pressure in xylem. *Nature* **378**: 715–716.
- Ponomarenko A, Holbrook M, Rockwell F, Steinhardt W, Rubinstein S. 2017.** Spread of Gas Embolism in Plants. In: *3rd Xylem International Meeting*, Bordeaux, FRA (2017-09-27 - 2017-09-29).
- Ponomarenko A, Vincent O, Pietriga A, Cochard H, Badel É, Marmottant P. 2014.** Ultrasonic emissions reveal individual cavitation bubbles in water-stressed wood. *Journal of The Royal Society Interface* **11**: 20140480.
- Postlethwait SN, Nelson OE. 1957.** A chronically wilted mutant of maize. *American Journal of Botany* **44**: 628–633.
- Pratt RB, Jacobsen AL. 2018.** Identifying which conduits are moving water in woody plants: a new HRCT-based method. *Tree Physiology* **38**: 1200–1212.
- Ratzmann G, Meinzer FC, Tietjen B. 2019.** Iso/Anisohdry: Still a Useful Concept. *Trends in Plant Science* **24**: 191–194.
- Rawlings JO, Cure WW. 1985.** The Weibull function as a dose-response model to describe ozone effects on crop yields. *Crop Science* **25**: 807–814.
- Rawlins SL. 1966.** Theory for thermocouple psychrometers used to measure water potential in soil and plant samples. *Agricultural Meteorology* **3**: 293–310.
- Richards LA, Ogata G. 1958.** Thermocouple for vapor pressure measurement in biological and soil systems at high humidity. *Science* **128**: 1089–1090.
- Rincent R, Charpentier J-P, Faivre-Rampant P, Paux E, Le Gouis J, Bastien C, Segura V. 2018.** Phenomic selection is a low-cost and high-throughput method based on indirect predictions: proof of concept on wheat and poplar. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **8**: 3961–3972.
- Rodríguez-Domínguez CM, Murphy MRC, Lucani C, Brodribb TJ. 2018.** Mapping xylem failure in disparate organs of whole plants reveals extreme resistance in olive roots. *New Phytologist* **218**: 1025–1035.
- Rojas-Jiménez K, Holbrook NM, Gutiérrez-Soto MV. 2007.** Dry-season leaf flushing of *Enterolobium cyclocarpum* (ear-pod tree): above- and belowground phenology and water relations. *Tree Physiology* **27**: 1561–1568.
- Rosner S. 2017.** Wood density as a proxy for vulnerability to cavitation: Size matters. *Journal of Plant Hydraulics* **4**: e001.
- Rosner S, Gierlinger N, Klepsch M, Karlsson B, Evans R, Lundqvist S-O, Světlík J, Børja I, Dalsgaard L, Andreassen K, Solberg S, Jansen S. 2018.** Hydraulic and mechanical dysfunction of Norway spruce sapwood due to extreme summer drought in Scandinavia. *Forest Ecology and Management* **409**: 527–540.
- Rosner S, Heinze B, Savi T, Dalla-Salda G. 2019.** Prediction of hydraulic conductivity loss from relative water loss: new insights into water storage of tree stems and branches. *Physiologia Plantarum* **165**: 843–854.
- Rosner S, Karlsson B, Konnerth J, Hansmann C. 2009.** Shrinkage processes in standard-size Norway spruce wood specimens with different vulnerability to cavitation. *Tree Physiology* **29**: 1419–1431.
- Sachs IB. 1963.** Torus of the bordered-pit membrane in conifers. *Nature* **198**: 906–907.
- Sack L. 2004.** Responses of temperate woody seedlings to shade and drought: do trade-offs limit potential niche differentiation? *Oikos* **107**: 110–127.
- Sack L, Cowan PD, Jaikumar N, Holbrook NM. 2003.** The 'hydrology' of leaves: co-ordination of structure and function in temperate woody species. *Plant, Cell & Environment* **26**: 1343–1356.

- Sáenz-Romero C, Lamy J-B, Loya-Rebollar E, Plaza-Aguilar A, Burlett R, Lobit P, Delzon S. 2013.** Genetic variation of drought-induced cavitation resistance among *Pinus hartwegii* populations from an altitudinal gradient. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 2905–2913.
- Sala A, Piper F, Hoch G. 2013.** Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytologist*: 274–281.
- Salleo S, Lo Gullo MA, De Paoli D, Zippo M. 1996.** Xylem recovery from cavitation-induced embolism in young plants of *Laurus nobilis*: a possible mechanism. *New Phytologist* **132**: 47–56.
- Salleo S, Lo Gullo MA, Siracusano L. 1984.** Distribution of vessel ends in stems of some diffuse- and ring-porous trees: the nodal regions as ‘safety zones’ of the water conducting system. *Annals of Botany* **54**: 543–552.
- Sano Y. 2004.** Intervascular pitting across the annual ring boundary in *Betula platyphylla* var. *japonica* and *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA Journal* **25**: 129–140.
- Sano Y, Fukuzawa K. 1994.** Structural variations and secondary changes in pit membranes in *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *IAWA Journal* **15**: 283–291.
- Savidge RA. 2014.** Cell biology of bordered-pit formation in balsam-fir trees. *Botany* **92**: 495–511.
- Savidge RA. 2016.** Chemistry of developing bordered-pit rims in balsam-fir trees. *Botany* **94**: 347–357.
- Scharwies JD, Dinneny JR. 2019.** Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research* **132**: 311–324.
- Schenk HJ, Espino S, Rich-Cavazos SM, Jansen S. 2018.** From the sap’s perspective: The nature of vessel surfaces in angiosperm xylem. *American Journal of Botany* **105**: 172–185.
- Schenk HJ, Espino S, Romo DM, Nima N, Do AYT, Michaud JM, Papahadjopoulos-Sternberg B, Yang J, Zuo YY, Steppe K, Jansen S. 2017.** Xylem surfactants introduce a new element to the cohesion-tension theory. *Plant Physiology* **173**: 1177–1196.
- Schenk HJ, Steppe K, Jansen S. 2015.** Nanobubbles: a new paradigm for air-seeding in xylem. *Trends in Plant Science* **20**: 199–205.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.
- Schlichting CD. 2008.** Hidden reaction norms, cryptic genetic variation, and evolvability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1133**: 187–203.
- Schmitz N, Koch G, Schmitt U, Beeckman H, Koedam N. 2008.** Intervessel pit structure and histochemistry of two mangrove species as revealed by cellular UV microspectrophotometry and electron microscopy: Intraspecific variation and functional significance. *Microscopy and Microanalysis* **14**: 387–397.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**: 671–675.
- Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT. 1965.** Sap pressure in vascular plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* **148**: 339–346.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S. 2013a.** How to quantify conduits in wood? *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Scholz A, Rabaey D, Stein A, Cochard H, Smets E, Jansen S. 2013b.** The evolution and function of vessel and pit characters with respect to cavitation resistance across 10 *Prunus* species. *Tree Physiology* **33**: 684–694.
- Schroeder CA, Wieland PA. 1956.** Diurnal fluctuation in size in various parts of the avocado tree and fruit. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **68**: 253–258.
- Schuldt B, Knutzen F, Delzon S, Jansen S, Müller-Haubold H, Burlett R, Clough Y, Leuschner C. 2016.** How adaptable is the hydraulic system of European beech in the face of climate change-related precipitation reduction? *New Phytologist* **210**: 443–458.
- Schulte PJ, Hacke UG, Schoonmaker AL. 2015.** Pit membrane structure is highly variable and accounts for a major resistance to water flow through tracheid pits in stems and roots of two boreal conifer species. *New Phytologist* **208**: 102–113.

- Schuster A-C, Burghardt M, Alfarhan A, Bueno A, Hedrich R, Leide J, Thomas J, Riederer M. 2016. Effectiveness of cuticular transpiration barriers in a desert plant at controlling water loss at high temperatures. *AoB Plants* **8**.
- Schuster A-C, Burghardt M, Riederer M. 2017. The ecophysiology of leaf cuticular transpiration: are cuticular water permeabilities adapted to ecological conditions? *Journal of Experimental Botany* **68**: 5271–5279.
- Scoffoni C, Albuquerque C, Brodersen CR, Townes SV, John GP, Bartlett MK, Buckley TN, McElrone AJ, Sack L. 2017. Outside-xylem vulnerability, not xylem embolism, controls leaf hydraulic decline during dehydration. *Plant Physiology* **173**: 1197–1210.
- Scoffoni C, Albuquerque C, Cochard H, Buckley TN, Fletcher LR, Caringella MA, Bartlett M, Brodersen CR, Jansen S, McElrone AJ, Sack L. 2018. The causes of leaf hydraulic vulnerability and its influence on gas exchange in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **178**: 1584–1601.
- Scott LI, Priestley JH. 1928. The root as an absorbing organ. A reconsideration of the entry of water and salts in the absorbing region. *The New Phytologist* **27**: 125–140.
- Sendner C, Horinek D, Bocquet L, Netz RR. 2009. Interfacial water at hydrophobic and hydrophilic surfaces: Slip, viscosity, and diffusion. *Langmuir* **25**: 10768–10781.
- Sevanto S, McDowell NG, Dickman LT, Pangle R, Pockman WT. 2014. How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses. *Plant, Cell & Environment* **37**: 153–161.
- Shinozaki K, Yoda K, Hozumi K, Kira T. 1964. A quantitative analysis of plant form-the pipe model theory: Basic analyses. *Japanese Journal of Ecology* **14**: 97–105.
- Shmulovich KI, Mercury L, Thiéry R, Ramboz C, El Mekki M. 2009. Experimental superheating of water and aqueous solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **73**: 2457–2470.
- Sinclair TR, Ludlow MM. 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Functional Plant Biology* **12**: 213–217.
- Skelton RP, Anderegg LDL, Lamarque LJ. 2019. Examining variation in hydraulic and resource acquisition traits along climatic gradients tests our understanding of plant form and function. *New Phytologist* **223**: 505–507.
- Skelton RP, West AG, Dawson TE. 2015. Predicting plant vulnerability to drought in biodiverse regions using functional traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 5744–5749.
- Slatyer RO, Taylor SA. 1960. Terminology in plant- and soil-water relations. *Nature* **187**: 922–924.
- Sorce C, Giovannelli A, Sebastiani L, Anfodillo T. 2013. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Reports* **32**: 885–898.
- Spanner DC. 1951. The Peltier effect and its use in the measurement of suction pressure. *Journal of Experimental Botany* **2**: 145–168.
- Sparks JP, Black RA. 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiology* **19**: 453–459.
- Sperry JS. 1986. Relationship of xylem embolism to xylem pressure potential, stomatal closure, and shoot morphology in the palm *Rhapis excelsa*. *Plant Physiology* **80**: 110–116.
- Sperry JS. 2011. Hydraulics of vascular water transport In: Wojtaszek P, ed. Signaling and Communication in Plants. *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 303–327.
- Sperry JS, Christman MA, Torres-Ruiz JM, Taneda H, Smith DD. 2012. Vulnerability curves by centrifugation: is there an open vessel artefact, and are ‘r’ shaped curves necessarily invalid? *Plant, Cell & Environment* **35**: 601–610.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell & Environment* **11**: 35–40.
- Sperry JS, Hacke UG. 2004. Analysis of circular bordered pit function. Angiosperm vessels with homogenous pit membranes. *American Journal of Botany* **91**: 369–385.
- Sperry JS, Hacke UG, Wheeler JK. 2005. Comparative analysis of end wall resistivity in xylem conduits. *Plant, Cell & Environment* **28**: 456–465.
- Sperry JS, Sullivan JEM. 1992. Xylem embolism in response to freeze-thaw cycles and water stress in ring-porous, diffuse-porous, and conifer species. *Plant Physiology* **100**: 605–613.

- Sperry JS, Tyree MT. 1988.** Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* **88**: 581–587.
- Sperry JS, Tyree MT. 1990.** Water-stress-induced xylem embolism in three species of conifers. *Plant, Cell & Environment* **13**: 427–436.
- Sperry JS, Wang Y, Wolfe BT, Mackay DS, Anderegg WRL, McDowell NG, Pockman WT. 2016.** Pragmatic hydraulic theory predicts stomatal responses to climatic water deficits. *New Phytologist* **212**: 577–589.
- Steppe K, Cnudde V, Girard C, Lemeur R, Cnudde J-P, Jacobs P. 2004.** Use of X-ray computed microtomography for non-invasive determination of wood anatomical characteristics. *Journal of Structural Biology* **148**: 11–21.
- Steppe K, De Pauw DJW, Lemeur R, Vanrolleghem PA. 2006.** A mathematical model linking tree sap flow dynamics to daily stem diameter fluctuations and radial stem growth. *Tree Physiology* **26**: 257–273.
- Steudle E. 1995.** Trees under tension. *Nature* **378**: 663–664.
- Steudle E. 2000.** Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1531–1542.
- Steudle E. 2001.** The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 847–875.
- Stiller V, Lafitte HR, Sperry JS. 2003.** Hydraulic properties of rice and the response of gas exchange to water stress. *Plant Physiology* **132**: 1698–1706.
- Stojnić S, Suchocka M, Benito-Garzón M, Torres-Ruiz JM, Cochard H, Bolte A, Coccozza C, Cyjetković B, de Luis M, Martínez-Vilalta J, Ræbild A, Tognetti R, Delzon S. 2018.** Variation in xylem vulnerability to embolism in European beech from geographically marginal populations. *Tree Physiology* **38**: 173–185.
- Suuff E. 1969.** Freezing of conifer xylem and the cohesion-tension theory. *Physiologia Plantarum* **22**: 424–431.
- Suer S, Agusti J, Sanchez P, Schwarz M, Greb T. 2011.** WOXA imparts auxin responsiveness to cambium cells in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**: 3247–3259.
- Taiz L, Zeiger E. 2010.** Plant and Cell Architecture ; Water and Plant Cells & Water Balance of Plants *Plant physiology* fifth edition. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates inc., publishers.
- Tardieu F, Simonneau T. 1998.** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**: 419–432.
- Taylor NG, Scheible W-R, Cutler S, Somerville CR, Turner SR. 1999.** The irregular xylem3 locus of Arabidopsis encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *The Plant Cell* **11**: 769–779.
- Temperley HNV. 1947.** The behaviour of water under hydrostatic tension: III. *Proceedings of the Physical Society* **59**: 199–208.
- Timell TE. 1967.** Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology* **1**: 45–70.
- Tixier A, Cochard H, Badel É, Dusotoit-Coucaud A, Jansen S, Herbette S. 2013.** Arabidopsis thaliana as a model species for xylem hydraulics: does size matter? *Journal of Experimental Botany* **64**: 2295–2305.
- Tixier A, Herbette S, Jansen S, Capron M, Tordjeman P, Cochard H, Badel É. 2014.** Modelling the mechanical behaviour of pit membranes in bordered pits with respect to cavitation resistance in angiosperms. *Annals of Botany* **114**: 325–334.
- Torres-Ruiz JM, Cochard H, Choat B, Jansen S, López R, Tomášková I, Padilla-Díaz CM, Badel É, Burlett R, King A, Lenoir N, Martin-StPaul NK, Delzon S. 2017.** Xylem resistance to embolism: presenting a simple diagnostic test for the open vessel artefact. *New Phytologist* **215**: 489–499.
- Torres-Ruiz JM, Cochard H, Delzon S. 2016a.** Why do trees take more risks in the Amazon? *Journal of Plant Hydraulics* **3**: e005.
- Torres-Ruiz JM, Cochard H, Mencuccini M, Delzon S, Badel É. 2016b.** Direct observation and modelling of embolism spread between xylem conduits: a case study in Scots pine. *Plant, Cell & Environment* **39**: 2774–2785.
- Turner NC. 1981.** Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* **58**: 339–366.

- Tyree MT. 1981.** The relationship between the bulk modulus of elasticity of a complex tissue and the mean modulus of its cells. *Annals of Botany* **47**: 547–559.
- Tyree MT, Cochard H, Cruiziat P, Sinclair B, Ameglio T. 1993.** Drought-induced leaf shedding in walnut: evidence for vulnerability segmentation. *Plant, Cell & Environment* **16**: 879–882.
- Tyree MT, Davis SD, Cochard H. 1994.** Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction? *IAWA Journal* **15**: 335–360.
- Tyree MT, Dixon MA. 1983.** Cavitation events in *Thuja occidentalis* L.? Ultrasonic acoustic emissions from the sapwood can be measured. *Plant Physiology* **72**: 1094–1099.
- Tyree MT, Ewers FW. 1991.** The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* **119**: 345–360.
- Tyree MT, Hammel HT. 1972.** The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Journal of Experimental Botany* **23**: 267–282.
- Tyree MT, Richter H. 1981.** Alternative methods of analysing water potential isotherms: some cautions and clarifications. The impact of non-ideality and of some experimental errors. *Journal of Experimental Botany* **32**: 643–653.
- Tyree MT, Sperry JS. 1988.** Do woody plants operate near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? Answers from a model. *Plant Physiology* **88**: 574–580.
- Tyree MT, Vargas G, Engelbrecht BMJ, Kursar TA. 2002.** Drought until death do us part: a case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree, *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2239–2247.
- Tyree MT, Yang S. 1992.** Hydraulic conductivity recovery versus water pressure in xylem of *Acer saccharum*. *Plant Physiology* **100**: 669–676.
- Tyree MT, Zimmermann MH. 2002.** Xylem dysfunction: when cohesion breaks down & Hydraulic architecture of woody shoots. In: Tyree MT, Zimmermann MH, eds. Springer Series in Wood Science. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 89–141 & 143–174.
- Uehara K, Hogetsu T. 1993.** Arrangement of cortical microtubules during formation of bordered pit in the tracheids of *Taxus*. *Protoplasma* **172**: 145–153.
- Urli M, Porté AJ, Cochard H, Guengant Y, Burlett R, Delzon S. 2013.** Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree Physiology* **33**: 672–683.
- Vaadia Y, Raney FC, Hagan RM. 1961.** Plant water deficits and physiological processes. *Annual Review of Plant Physiology* **12**: 265–292.
- Venturas MD, Pratt RB, Jacobsen AL, Castro V, Fickle JC, Hacke UG. 2019.** Direct comparison of four methods to construct xylem vulnerability curves: Differences among techniques are linked to vessel network characteristics. *Plant, Cell & Environment* **42**: 2422–2436.
- Venturas MD, Sperry JS, Hacke UG. 2017.** Plant xylem hydraulics: What we understand, current research, and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**: 356–389.
- Vitra A, Deléglise C, Meisser M, Risch AC, Signarbieux C, Lamacque L, Delzon S, Buttler A, Mariotte P. 2019.** Responses of plant leaf economic and hydraulic traits mediate the effects of early- and late-season drought on grassland productivity. *AoB PLANTS* **11**.
- Wang R, Zhang L, Zhang S, Cai J, Tyree MT. 2014.** Water relations of *Robinia pseudoacacia* L.: do vessels cavitate and refill diurnally or are R-shaped curves invalid in *Robinia*? *Plant, Cell & Environment* **37**: 2667–2678.
- Wason JW, Huggett BA, Brodersen CR. 2017.** MicroCT imaging as a tool to study vessel endings in situ. *American Journal of Botany* **104**: 1424–1430.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG, Hoang N. 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 & Environment* **28**: 800–812.
- Wheeler TD, Stroock AD. 2008.** The transpiration of water at negative pressures in a synthetic tree. *Nature* **455**: 208–212.

- Williams CB, Anfodillo T, Crivellaro A, Lazzarin M, Dawson TE, Koch GW. 2019.** Axial variation of xylem conduits in the Earth's tallest trees. *Trees*.
- Wolfe BT, Sperry JS, Kursar TA. 2016.** Does leaf shedding protect stems from cavitation during seasonal droughts? A test of the hydraulic fuse hypothesis. *New Phytologist* **212**: 1007–1018.
- Wortemann R, Herbette S, Barigah TS, Fumanal B, Alia R, Ducousso A, Gomory D, Roedel-Drevet P, Cochard H. 2011.** Genotypic variability and phenotypic plasticity of cavitation resistance in *Fagus sylvatica* L. across Europe. *Tree Physiology* **31**: 1175–1182.
- Wullschlegel SD, Meinzer FC, Vertessy RA. 1998.** A review of whole-plant water use studies in tree. *Tree Physiology* **18**: 499–512.
- Yamaguchi M, Goué N, Igarashi H, Ohtani M, Nakano Y, Mortimer JC, Nishikubo N, Kubo M, Katayama Y, Kakegawa K, Dupree P, Demura T. 2010.** VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiology* **153**: 906–914.
- Yamaguchi M, Kubo M, Fukuda H, Demura T. 2008.** VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *The Plant Journal* **55**: 652–664.
- Yang S, Tyree MT. 1992.** A theoretical model of hydraulic conductivity recovery from embolism with comparison to experimental data on *Acer saccharum*. *Plant, Cell & Environment* **15**: 633–643.
- Yang S, Tyree MT. 1993.** Hydraulic resistance in *Acer saccharum* shoots and its influence on leaf water potential and transpiration. *Tree Physiology* **12**: 231–242.
- Zhang Y, Lamarque LJ, Torres-Ruiz JM, Schuldt B, Karimi Z, Li S, Qin D-W, Bittencourt P, Burlett R, Cao K-F, Delzon S, Oliveira R, Pereira L, Jansen S. 2018.** Testing the plant pneumatic method to estimate xylem embolism resistance in stems of temperate trees. *Tree Physiology* **38**: 1016–1025.
- Zhao X. 2016.** Spatial variation of vessel grouping in the xylem of *Betula platyphylla* Roth. *Journal of Plant Research* **129**: 29–37.
- Zheng Q, Durben DJ, Wolf GH, Angell CA. 1991.** Liquids at large negative pressures: water at the homogeneous nucleation limit. *Science* **254**: 829–832.
- Zhong R, Richardson EA, Ye Z-H. 2007.** The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 2776–2792.
- Zhong R, Ye Z-H. 2004.** amphivasal vascular bundle 1, a gain-of-function mutation of the IFL1/REV gene, is associated with alterations in the polarity of leaves, stems and carpels. *Plant and Cell Physiology* **45**: 369–385.
- Zhong R, Ye Z-H. 2015.** Secondary cell walls: Biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology* **56**: 195–214.
- Zimmermann MH. 1978.** Hydraulic architecture of some diffuse-porous trees. *Canadian Journal of Botany* **56**: 2286–2295.
- Zimmermann MH, Tomlinson PB. 1966.** Analysis of complex vascular systems in plants: Optical shuttle method. *Science* **152**: 72–73.
- Zur B. 1966.** Osmotic control of the matric soil-water potential: I. Soil-water system. *Soil Science* **102**: 394.

Annexes

I. Recherche de plasticité de la vulnérabilité à la cavitation du blé : matériel et méthodes

La mise en évidence de la plasticité de la résistance à la cavitation chez le blé a été effectuée en s'appuyant sur le dispositif expérimental de la plateforme Pheno3C, la Plateforme de Phénotypage au Champ sous Contraintes Climatiques. Ce dispositif permet d'exposer des parcelles de multiples variétés de blé à une contrainte hydrique (Fig. 62) (Rincent *et al.*, 2018 ; Guérin *et al.*, 2019). Des parcelles de blé étaient divisées en deux traitements : la modalité « Abrisé », en contrainte hydrique car placée sous des abris amovibles d'exclusion des précipitations ; et la modalité « Témoin », des champs non-abrisés semés juste à côté. Pour chacune des deux modalités, le dispositif est divisé en quatre blocs, avec notamment quatre champs abrisés par des toits amovibles indépendants. Dans chaque bloc, chaque variété était répétée deux fois, sur des placettes de 1,9 x 1,2 m².

Pour cette étude, quatre variétés ont été sélectionnées pour leur tolérance ou vulnérabilité à la sécheresse. Celle-ci a été définie comme étant la différence de rendement de grain (en quintal par hectare) entre les modalités contrastées pour l'irrigation lors d'essais à Gréoux-Les-Bains en 2012 et 2014 puis à Clermont-Ferrand en 2016 (Ly *et al.*, 2018 ; Rincent *et al.*, 2018). Parmi les 4 variétés retenues, « *Trapez* » et « *Boregar* » étaient considérées comme tolérantes (rendement diminué de seulement 8,4 % par un stress hydrique) et « *Allez-y* » et « *Oregrain* » étaient considérées comme sensibles (rendement diminué de 20,4 % en moyenne par un stress hydrique).

Les quatre variétés de blé ont été semées le 4 novembre 2016 et le stress hydrique a été appliqué à partir du 24 mars 2017 par mise en place des toits amovibles. Au 20 mai 2017, une date correspondant à la floraison pour plusieurs variétés du dispositif, les parcelles témoins avaient reçu 130 mm de pluie de plus que les parcelles abrisées (Guérin *et al.*, 2019).

Afin d'évaluer la contrainte hydrique appliquée aux plants de blé des quatre variétés dans les deux conditions de croissance, les potentiels hydriques ont été mesurés. Le potentiel

hydrique a été mesuré sur la feuille drapeau (feuille la plus haut d'une tige) à l'aide d'une chambre à pression (PMS Instruments). Pendant le transport entre la placette et la chambre à pression, l'échantillon était préservé dans un sac en plastique opaque et scellé de façon étanche. Les mesures ont été effectuées à deux stades phénologiques correspondant à deux étapes importantes du développement du blé : la floraison de l'épi et 250 degré-jours après floraison (250 °Cd), ce qui correspond à la fin de remplissage des grains. Le stade phénologique était défini pour chacune des variétés et pour chacune des conditions de croissance, et donc les mesures faites à des dates différentes. La mesure de chambre à pression a été effectuée pour 5 à 6 individus par placette, pour chacune des placettes, quatre blocs et deux traitements.

La résistance à la cavitation a été mesurée au Cavitron. Six échantillons de tige ont été collectés pour chacune des deux placettes des quatre blocs lorsque les plants avaient atteint le stade phénologique 250 °Cd et stockés à 4 °C, enveloppés dans du papier humide et dans des sacs plastiques opaques et fermés hermétiquement. Comme il s'agissait d'une herbacée, la méthode a dû être adaptée selon les recommandations d'auteurs ayant travaillé sur herbacées (Lens *et al.*, 2016 ; Vitra *et al.*, 2019) : chaque courbe de vulnérabilité a été réalisée en plaçant deux à trois tiges dans le cavitron afin d'augmenter la conductance des échantillons. De plus, afin de ne pas être sujet à l'artefact dû aux vaisseaux ouverts (Cochard *et al.*, 2010), les segments devaient comporter des nœuds, des zones concentrant les terminaisons de vaisseaux (Salleo *et al.*, 1984). Les échantillons ont donc été coupés sous eau 1 cm avant le dernier nœud puis 27 cm plus loin, assurant la présence d'au moins deux nœuds.

Les embolies natives ont été mesurées à l'aide d'un « Xyl'em » (Cochard *et al.*, 2002). Pour chacune des deux placettes pour les quatre blocs, deux échantillons de tige ont été collectés lorsque les plants avaient atteint le stade phénologique 250 °Cd et stockés à 4 °C, enveloppés dans du papier humide et dans des sacs plastiques fermés de façon hermétique. Des segments de tige ont été recoupés sous eau à 3 cm de longueur, à une distance de 1 cm d'un nœud. Les échantillons ont été connectés à des flexibles en polytétrafluoroéthylène. Une première mesure de conductance a été réalisée à basse pression (2 à 7 kPa) à l'aide d'un débitmètre (Xyl'em, Bronkhorst, Montigny-lès-Cormeilles, France). Puis les échantillons étaient exposés à un flux de solution à haute pression (0,1 à 0,2 MPa) pendant 5 min afin de dissoudre l'embolie. Une seconde mesure de conductance a été réalisée, donnant la conductance maximale de l'échantillon. L'embolie native est calculée en utilisant la même formule que pour le premier chapitre.

II. Plasticity of xylem vulnerability to cavitation and its structural determinants in *Populus tremula* x *alba*

Lemaire C, Quilichini Y, Santini J, Brunel-Michac N, Cartailier J, Souchal R, Conchon P, Herbette S.
Poster présenté lors du congrès international « *Wood formation and tree adaptation to climate* », à Orléans (23/05/2018 – 25/05/2018).

Plasticity of xylem vulnerability to cavitation and its structural determinants in *Populus tremula x alba*

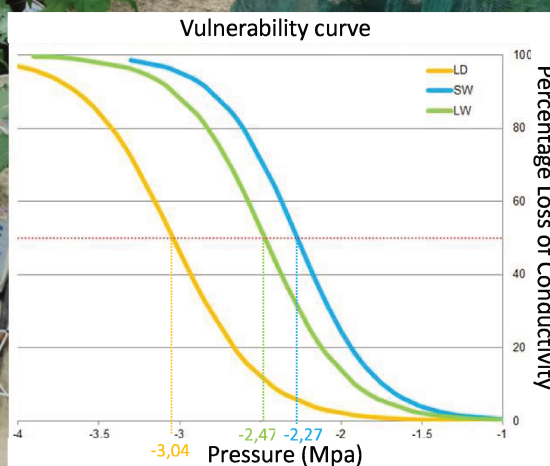
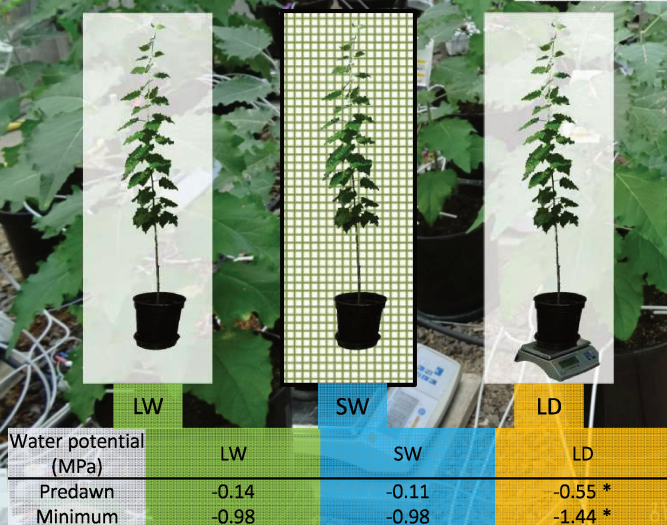
Cédric Lemaire¹, Yann Quilichini², Jérémie Santini², Nicole Brunel-Michac¹, Julien Cartailier¹, Romain Souchal¹, Pierre Conchon¹, Stéphane Herbette^{1*}
¹UCA, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France; ²UMR CNRS 6134 SPE, Université di Corsica, Corti, France; *correspondence author: e-mail: Stephane.HERBETTE@uca.fr

Scientific background:

Xylem vulnerability to cavitation is a major trait to assess plant drought resistance. An environmental plasticity for this trait could permit an acclimation to climate conditions. Knowledge on plasticity of vulnerability to cavitation remains weak, especially on genetic and structural basis. The objective of this setup is to investigate these latter.

Experimental setup:

Young poplar trees grown under contrasted conditions: **LW: Light + Watered**; **SW: Shaded + Watered**; **LD: Light + Droughted**. **Light**= full Sun Light. **Shade**= plants covered by shade-house intercept 30% of incident light. **Watered**= Watered at full field capacity (FC). **Drought**=a water regime at 25-30% FC was applied thanks to a device coupling a weight survey and a watering control by selenoid valve. We managed water stress in order to constrain the hydraulic properties the most but without stopping growth (radial growth survey).



The contrasted irrigation and light conditions induced **plasticity of cavitation resistance**.

Structural basis?

Several imaging and microscopy methods are used to investigate the structural determinants underlying this changes in cavitation resistance.

