



COLLEGIUM
Sciences & Techniques
Bourges - Chartres - Orléans

LBLGC
Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures



INRA
SCIENCE & IMPACT



Anatomie du xylème et vulnérabilité à la cavitation au sein d'une population locale de peuplier noir (*Populus nigra* L.)

Stage de Master 2 BOPE

Camille Lédée^{1,2}

Encadrants : Régis Fichot¹, Françoise Laurans², Catherine Bastien², Franck Brignolas¹,

¹ Université d'Orléans, Inra, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, F-45067 Orléans, France

² INRA, UR588 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF), centre de recherche Val de Loire, F-45075, Orléans, France

Résumé

L'identification et la caractérisation des mécanismes permettant de résister à des sécheresses drastiques constituent un enjeu important si l'on veut pouvoir anticiper les effets des changements climatiques sur le fonctionnement des arbres. Dans ce contexte, la vulnérabilité à la cavitation apparaît comme un caractère clé. Cette étude visait à évaluer pour une population locale de peuplier noir l'étendue de la variabilité génétique pour la vulnérabilité à la cavitation et les relations entre vulnérabilité à la cavitation et les propriétés structurales du xylème associées d'une part à l'efficacité de conduction et d'autre part au renforcement mécanique. L'amplitude de variation de P_{50} (un descripteur du degré de vulnérabilité à la cavitation) entre génotypes extrêmes était de 0,48 MPa, confirmant le faible niveau de variabilité génétique déjà observé à l'échelle intra-spécifique chez d'autres espèces forestières. Nos résultats supportent l'existence chez un même génotype d'un compromis entre résistance à la cavitation, efficacité de conduction et renforcement mécanique du xylème au travers de paramètres anatomiques. Une étude exploratoire a été également initiée afin de décrire la structure fine des ponctuations à l'échelle subcellulaire. Les premiers résultats fournissent des perspectives intéressantes dans le but de caractériser plus finement les liens structure-fonction.

Mots clés : compromis fonctionnels, embolie estivale, histologie, vaisseaux, variabilité intra-population



COLLEGIUM
Sciences & Techniques
Bourges - Chartres - Orléans

LBLGC
Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures



INRA
SCIENCE & IMPACT



Anatomie du xylème et vulnérabilité à la cavitation au sein d'une population locale de peuplier noir (*Populus nigra* L.)

Stage de Master 2 BOPE

Camille Lédée^{1,2}

Encadrants : Régis Fichot¹, Françoise Laurans², Catherine Bastien², Franck Brignolas¹,

¹ Université d'Orléans, Inra, EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, F-45067 Orléans, France

² INRA, UR588 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' (AGPF), centre de recherche Val de Loire, F-45075, Orléans, France

Résumé

L'identification et la caractérisation des mécanismes permettant de résister à des sécheresses drastiques constituent un enjeu important si l'on veut pouvoir anticiper les effets des changements climatiques sur le fonctionnement des arbres. Dans ce contexte, la vulnérabilité à la cavitation apparaît comme un caractère clé. Cette étude visait à évaluer pour une population locale de peuplier noir l'étendue de la variabilité génétique pour la vulnérabilité à la cavitation et les relations entre vulnérabilité à la cavitation et les propriétés structurales du xylème associées d'une part à l'efficacité de conduction et d'autre part au renforcement mécanique. L'amplitude de variation de P_{50} (un descripteur du degré de vulnérabilité à la cavitation) entre génotypes extrêmes était de 0,48 MPa, confirmant le faible niveau de variabilité génétique déjà observé à l'échelle intra-spécifique chez d'autres espèces forestières. Nos résultats supportent l'existence chez un même génotype d'un compromis entre résistance à la cavitation, efficacité de conduction et renforcement mécanique du xylème au travers de paramètres anatomiques. Une étude exploratoire a été également initiée afin de décrire la structure fine des ponctuations à l'échelle subcellulaire. Les premiers résultats fournissent des perspectives intéressantes dans le but de caractériser plus finement les liens structure-fonction.

Mots clés : compromis fonctionnels, embolie estivale, histologie, vaisseaux, variabilité intra-population

Abstract

Identifying and characterizing the mechanism involved in the resistance to severe droughts should be regarded as a major concern to anticipate tree responses to climate change. Xylem vulnerability to drought-induced cavitation is a key trait of plant-water relations during periods of extreme droughts. This study aimed at evaluating within one local population of black poplar the amplitude of genetic variation for xylem vulnerability to cavitation and the relationships between vulnerability to cavitation and xylem structural properties associated on the one hand water transport efficiency and on the other hand mechanical reinforcement. The amplitude of variation between extreme genotypic means for P_{50} (a proxy of vulnerability to cavitation) reached 0.48 MPa, which is consistent with the low level of genetic variation generally reported in other forest tree species. Our results support the existence, at genotypic level, of functional trade-offs between xylem resistance to cavitation, water transport efficiency and mechanical reinforcement through anatomic parameters. An exploratory study was conducted to describe pit ultrastructure at the subcellular level. The first results obtained provide new perspectives to gain insight into the relationships between the structure and function of the xylem.

Introduction

La disponibilité en eau conditionne directement la distribution des espèces et des communautés végétales ainsi que la productivité primaire des écosystèmes (Engelbrecht et al. 2007). Le nombre croissant de dépérissements forestiers observés à l'échelle du globe soulève actuellement des questions concernant les capacités d'acclimatation et d'adaptation des arbres et des espèces forestières face à des épisodes de sécheresse de plus en plus intenses et fréquents (Allen et al. 2010). L'identification et la caractérisation des mécanismes permettant de résister à des sécheresses drastiques constituent donc un enjeu important si l'on veut pouvoir anticiper les effets des changements climatiques sur le fonctionnement des arbres et la dynamique des écosystèmes forestiers.

Le maintien d'un bilan hydrique favorable passe par le maintien de la circulation de la sève brute au sein de l'arbre. En règle générale, la sève brute circule depuis les racines jusqu'aux feuilles sous tension, c'est-à-dire à des pressions négatives. Le mécanisme de circulation est décrit au travers de la théorie de la tension-cohésion (Dixon et Joly 1895). De

façon simple, la sève brute est littéralement « tirée » vers le haut sous l'effet de l'évaporation de l'eau dans les cavités sous-stomatiques des feuilles, ceci grâce aux tensions capillaires générées au niveau des ménisques air-eau dans les parois pectocellulosiques des cellules mésophylliennes ; la continuité des colonnes d'eau dans l'ensemble de la plante est quant à elle assurée par la forte cohésion des molécules d'eau. La quasi-totalité (99%) du trajet de la sève brute s'effectue au sein d'un système vasculaire spécialisé (le xylème), les 1% restant correspondant à des trajets extravasculaires (cortex racinaire et mésophylle foliaire). Chez les angiospermes, le xylème est un tissu complexe composé de trois principaux types cellulaires. Les vaisseaux conducteurs aux parois épaisses, lignifiées et ponctuées, assurent la circulation axiale de la sève brute ; il s'agit en fait de structures multicellulaires mortes constituées de l'empilement d'éléments de vaisseaux. Les fibres ligneuses sont des cellules mortes de plus faible diamètre responsables du soutien mécanique. Les cellules des rayons ligneux sont, quant à elles, constituées de cellules vivantes de parenchyme assurant le stockage et le transfert radial des nutriments.

Dans des conditions normales de fonctionnement, les propriétés structurales du xylème permettent d'assurer la continuité hydraulique des colonnes d'eau *via* les ponctuations. Lors d'épisodes de sécheresse intense, provoquant de fortes tensions, des bulles d'air peuvent être aspirées au travers des nanopores présents dans la paroi primaire des ponctuations : c'est le phénomène de cavitation. La probabilité que ce phénomène ait lieu est d'autant plus grande que la taille des nanopores est importante (Tyree et Sperry 1989). L'embolie gazeuse des vaisseaux causée par le phénomène de cavitation conduit alors à une diminution de la circulation de l'eau et à une réduction des échanges de gaz foliaires ; à terme, l'embolie des vaisseaux du xylème peut donc compromettre la croissance et la survie de l'arbre (McDowell et al. 2008). La vulnérabilité à la cavitation est décrite au travers de courbes représentant l'évolution du taux d'embolie en fonction de la tension xylémienne (exprimée en MPa) (Tyree et Sperry 1989). La tension xylémienne causant 50% d'embolie (P_{50}) peut alors être estimée. La P_{50} est de loin le paramètre le plus utilisé dans la littérature et permet de comparer la vulnérabilité à la cavitation entre individus ou entre espèces (Maherali et al. 2004) : plus la valeur de P_{50} est élevée, plus la vulnérabilité est forte.

Les nombreuses études menées au cours des 25 dernières années sur l'embolie ont permis de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles des dysfonctionnements hydrauliques du xylème ainsi que les implications écologiques associées. A l'échelle inter-spécifique, les valeurs de P_{50} varient énormément (de -0.5 à -15 MPa) (Maherali et al. 2004) et ont pu être reliées aux préférences écologiques des espèces considérées ; les espèces originaires de milieux

xériques étant généralement moins vulnérables à la cavitation (Pratt et al. 2007). A l'échelle de l'individu, le degré de vulnérabilité à la cavitation conditionne directement le niveau de survie à la sécheresse (Urli et al. 2013 ; Barigah et al. 2013). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la vulnérabilité à la cavitation est un caractère clé du fonctionnement hydrique des individus en condition de sécheresse et qu'il pourrait par conséquent s'agir d'un caractère adaptatif à l'échelle des populations.

Une méta-analyse récente a démontré que quel que soit le biome considéré à l'échelle du globe, toutes les espèces fonctionnent proche de leur limite de fonctionnement hydraulique (Choat et al. 2012). La mise en place d'un xylème moins vulnérable aurait donc un coût ; si ce n'était pas le cas, toutes les espèces présenteraient une faible vulnérabilité quel que soit l'environnement considéré. Deux compromis fonctionnels ont été proposés afin d'expliquer le coût associé à une plus faible vulnérabilité à la cavitation. La mise en place d'un xylème moins vulnérable peut ainsi se faire au détriment de l'efficacité de conduction du xylème (Martínez-Vivalta et al. 2002 ; Hacke, Jacobsen et Pratt 2009). Des études ont mis en évidence que les espèces moins vulnérables possédaient une plus faible conductivité spécifique du xylème et des vaisseaux au diamètre réduit (Maherali et al. 2006 ; Hacke, Jacobsen et Pratt 2009). L'eau étant transportée moins efficacement vers les feuilles, les échanges de gaz peuvent être réduits, entraînant une diminution de la croissance. Par ailleurs, les individus plus résistants à l'embolie peuvent théoriquement fonctionner à des tensions xylémiennes plus négatives ; or fonctionner à des tensions xylémiennes plus négatives implique des risques de collapsus (effondrement des parois par implosion) plus grands et nécessite un renforcement pariétal. Les individus plus résistants devraient donc présenter des parois plus épaisses, une résistance au collapsus plus grande ainsi qu'une densité du xylème plus élevée (Hacke et al. 2001), nécessitant un investissement carboné plus important.

En comparaison des études menées à l'échelle inter-spécifique, les études conduites à l'échelle intra-spécifique demeurent beaucoup plus limitées. De récents travaux sur des peupliers hybrides *P.deltoides* x *P.nigra* (Fichot et al. 2010) ont fourni des premières estimations de variabilité génétique individuelle pour la vulnérabilité à la cavitation avec des valeurs moyennes de P_{50} allant de -1,60 à -2,40 MPa entre génotypes extrêmes. L'amplitude de variation pour P_{50} au sein de différentes espèces forestières est généralement inférieure ou égal à 1 MPa (Schreiber 2011, Sterck, 2012, Wortemann 2011), indiquant donc qu'une faible variabilité est exprimée pour la vulnérabilité à la cavitation au niveau intra-spécifique.

Au cours des dernières années, les études portant sur le genre peuplier (*Populus spp.*) et la vulnérabilité à la cavitation ont vu leur nombre augmenter (Barigah et al. 2013 ; Cochard et al.

2007 ; Fichot et al. 2010 ; Schreiber et al. 2011). L'étude de la vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier peut être envisagée avec des finalités distinctes selon que l'on s'intéresse au « compartiment cultivé » ou au « compartiment sauvage ». Le compartiment cultivé fait référence aux plantations populières composées de quelques génotypes performants issus pour la plupart d'hybridation inter-spécifique et sélectionnés pour leur croissance supérieure, la qualité de leur bois ainsi que pour la résistance à divers ravageurs. Dans ce contexte, les travaux visent avant tout à évaluer dans quelle mesure il est possible de sélectionner des génotypes moins vulnérables à la sécheresse sans pour autant contre-sélectionner leur performance en termes de croissance et de qualité du bois (Brignolas et al. 2012). Le compartiment sauvage fait quant à lui référence aux populations naturelles d'espèces autochtones. Dans ce contexte, les travaux visent davantage à évaluer l'importance de la vulnérabilité à la cavitation dans le potentiel adaptatif de l'espèce.

Jusqu'à présent, la majorité des études ont porté sur les hybrides inter-spécifiques (Cochard et al. 2007 ; Fichot et al. 2010 ; Fichot et al. 2011 ; Schreiber et al. 2011). Les travaux entrepris au sein de l'équipe « Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales » (ARCHE) du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC) de l'Université d'Orléans ont notamment montré des variations non négligeables en termes de P_{50} (environ 0.8 MPa) parmi huit cultivars interspécifiques (Fichot et al. 2010 ; Fichot et al. 2011). Contrairement aux observations faites à l'échelle inter-spécifique, aucun antagonisme n'a pu être observé dans ce panel, entre vulnérabilité à la cavitation, efficacité de conduction, renforcement mécanique du xylème et performance de croissance (Fichot et al. 2010 ; Fichot et al. 2011). A titre de comparaison, les travaux sur populations naturelles se font rares dans la littérature et n'ont concerné jusqu'à présent que des espèces Nord-Américaines comme *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Sparks et Black 1999) ou *P. tremuloides* Michx. (Schreiber et al. 2011) avec dans tous les cas un nombre très restreint de génotypes (six au maximum) ; aucune étude n'a encore été réalisée sur les espèces européennes de peuplier.

Mon stage s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe ARCHE du LBLGC de l'Université d'Orléans (EA 1207, Unité Sous Contrat INRA 1328) et l'unité 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières' de l'INRA d'Orléans (UR 588 AGPF). La thématique de recherche de l'équipe ARCHE concerne la réponse des arbres aux variations de disponibilité en eau ; les études sont développées sur un modèle d'étude unique, le peuplier, au travers d'approches complémentaires allant de l'écophysiologie à la physiologie moléculaire. L'unité AGPF s'intéresse à la caractérisation de la diversité génétique d'essences forestières, dont le

peuplier, et à sa valorisation en sélection ; l'unité étudie également la physiologie de la formation du bois à l'aide d'approches histologiques et de génétique fonctionnelle. Mon stage s'inscrit dans la continuité des travaux initiés au sein de l'équipe ARCHE sur la vulnérabilité à la cavitation chez les hybrides inter-spécifiques et vise à étendre les connaissances au compartiment sauvage. L'objectif est d'évaluer les relations entre les caractéristiques structurales du xylème et la vulnérabilité à la cavitation chez le peuplier noir (*P. nigra*), une espèce emblématique de la forêt riparienne (Villar et Forestier 2009). De façon plus spécifique, nous nous sommes attachés à (i) évaluer l'étendue de la variabilité individuelle pour la vulnérabilité à la cavitation, et (ii) juger des compromis éventuels entre résistance à la cavitation, efficacité de conduction et renforcement mécanique des tissus conducteurs. Un travail exploratoire plus fin sur le lien entre vulnérabilité à la cavitation et ultrastructure des ponctuations a également été entrepris. L'ensemble des mesures concernent une population naturelle de peuplier noir représentée par 35 géotypes provenant de la Réserve Naturelle locale de Saint Pryvé-Saint-Mesmin et installés en dispositif expérimental à l'INRA d'Orléans dans le cadre de la thèse de Justine Guet (co-directeurs : C. Bastien et F. Brignolas).

Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal et dispositif expérimental

Cette étude a été réalisée à partir d'une population naturelle de peuplier noir située dans la Réserve Naturelle de Saint Pryvé-Saint Mesmin (47°51'N, 1°48'E, 90m), choisie pour présenter d'éventuelles adaptations locales pour plusieurs caractères physiologiques : phénologie (Rohde et al. 2011), efficacité d'utilisation de l'eau et croissance (Chamaillard et al. 2011). Échantillonnée en 2000, cette population est représentée par 35 géotypes distincts, correspondant à des individus adultes et distribués sur un linéaire de 1,8 km sur la rive Sud de la Loire. Les 35 géotypes sont maintenus dans une collection de pied-mères installée à la pépinière ONF de Guémené-Penfao (35) et ont permis plusieurs études de diversité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires ou en plantations expérimentales. Des boutures ont été prélevées sur ces 35 géotypes pour la mise en place du dispositif.

Un dispositif expérimental destiné à quantifier la variabilité génétique présente dans la population naturelle de St Pryvé-St Mesmin pour différents caractères écophysiologiques a été installé au printemps 2012 en pépinière à l'INRA d'Ardon (47°49'N, 1°54'E, 110 m). Il est constitué de cinq blocs complets randomisés, chaque bloc contenant trois copies de chaque

génotype installées consécutivement à partir de boutures lignifiées. L'écartement à la plantation était de 2m entre lignes et 1m sur la ligne. Deux lignes de bordure composées d'un mélange de génotypes de la population Saint-Pryvé Saint-Mesmin entouraient le dispositif. Au cours des deux années de croissance (2012 et 2013), la parcelle a été maintenue en condition hydrique non limitante par un système d'arrosage par aspersion. De plus, durant la saison de végétation, la qualité phytosanitaire du dispositif a été assurée par des traitements insecticides et fongicides appliqués selon les besoins.

2. Collecte et traitement des données

2.1. Vulnérabilité à la cavitation

La vulnérabilité à la cavitation a été évaluée pour l'ensemble des génotypes du dispositif expérimental avant le début de mon stage. Au cours du mois d'octobre 2013, la pousse terminale a été prélevée sur un individu de chaque génotype par bloc ($n = 5$ pour chaque génotype) et conservée au froid à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à analyse. La vulnérabilité à la cavitation a été déterminée selon la technique du Cavitron (Cochard et al. 2005) (cf. ANNEXE 1 pour le principe de la méthode) en collaboration avec les centres INRA de Clermont-Ferrand et Bordeaux. Des courbes de vulnérabilité à la cavitation représentant le taux d'embolie du xylème en fonction de la tension au sein du xylème (MPa) ont ainsi été construites pour chaque échantillon. La fonction sigmoïde suivante a ensuite été ajustée aux données afin d'estimer les valeurs de P_{50} (MPa) correspondant à la tension xylémienne provoquant 50% d'embolie (Pammenter et Vander Willigen 1998) :

$$y = \frac{100}{(1 + \exp(\frac{s}{25} \times (x - P_{50})))}$$

et où y correspond au taux d'embolie (%), x correspond à la tension xylémienne (MPa) et s correspond à la pente de la courbe (% MPa^{-1}).

2.2. Réalisation des coupes histologiques, observation et caractérisation des paramètres anatomiques du xylème

La réalisation des coupes histologiques de bois et leur analyse est un travail chronophage ; l'étude structurale a donc été restreinte à un sous-ensemble de dix génotypes répartis en deux lots contrastés sur la base des données de vulnérabilité à la cavitation : un premier lot de 5 génotypes présentant une vulnérabilité relativement élevée, et un deuxième lot de 5 génotypes présentant une vulnérabilité relativement faible (voir § 1 dans la partie résultat pour une description détaillée sur la stratégie). Les mesures anatomiques ont été effectuées sur les mêmes segments de tiges que ceux utilisés pour les mesures de vulnérabilité à la cavitation. Pour chaque échantillon, des coupes transversales de 30µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome rotatif (RM 1225, Leica Microsystems, Vienne, Autriche), colorées à la safranine O (1% dans l'éthanol 50%) pendant 45 secondes, rincées dans d'éthanol absolu et montées entre lame et lamelle dans du baume du Canada. Les sections obtenues ont été observées sous un microscope optique (Leica DMR) couplé à une caméra numérique (Leica DFC 320) permettant l'acquisition d'image. Toutes les images ont été ensuite traitées à l'aide du logiciel d'analyse d'image « ImageJ » (Abràmoff et al. 2004) afin de mesurer les caractères anatomiques d'intérêt (Table 1).

Table 1. Liste des principales abréviations de l'étude

Abréviation	Définition	Unité
En lien avec la vulnérabilité à la cavitation		
P_{50}	Tension xylémienne provoquant 50% d'embolie	MPa
En lien avec l'efficacité de conduction du xylème		
S	Surface d'un vaisseau	μm^2
V_D	Densité de vaisseaux	mm^{-2}
V_G	Index d'appariement de vaisseaux	
d	Diamètre d'un vaisseau	μm
d_m	Diamètre moyen des vaisseaux	μm
F	Fraction de lumen	%
d_h	Diamètre hydraulique des vaisseaux du xylème	μm
$K_{S(t)}$	Conductivité hydraulique spécifique du xylème	$\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}$
En lien avec le renforcement mécanique du xylème		
t	Epaisseur de la double paroi pour les couples de vaisseaux appariés	μm
$(t/b)^2$	Index de résistance au collapsus pariétal des vaisseaux du xylème proche du diamètre hydraulique moyen	
ρ_x	Densité du xylème	g.cm^{-3}

La mesure des caractères anatomiques en lien avec la vulnérabilité à la cavitation a été réalisée à partir d'images prises à l'objectif 10× sur trois zones du xylème réparties sur l'ensemble de la coupe. Le diamètre des vaisseaux (d , en μm) a été mesuré comme étant le diamètre d'un cercle de surface équivalente. Ainsi le diamètre moyen (d_m , μm), représentant la moyenne des valeurs de d sur l'ensemble des vaisseaux mesurés au sein des trois zones, a pu être calculé. La densité de vaisseaux (V_D , mm^2) a été calculée à l'aide du rapport entre le nombre de vaisseaux et la surface de l'image. Le diamètre moyen et la densité de vaisseaux représentent les caractères les plus simples. La fraction de lumen des vaisseaux (F , %) a été obtenue par la formule : $F = (\sum S/A_{\text{image}})*100$, où A_{image} représente l'aire de l'image. Ce paramètre résulte de la combinaison de d_m et V_D . Le diamètre hydraulique (d_h , μm), permettant de tenir compte de la contribution disproportionnée des gros vaisseaux sur le flux total, a été calculé suivant la formule suivante : $d_h = (\sum d^5)/(\sum d^4)$ (Sperry et al 1994). La conductivité hydraulique spécifique du xylème ($K_{S-(t)}$, $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{MPa}^{-1}$) peut être approchée au travers de la loi de Hagen-Poiseuille appliquée à des capillaires parfaits selon l'équation suivante :

$K_{S-(t)} = (\pi\rho/128\eta*A_{\text{image}})*\sum d^4$, où ρ est la densité de l'eau (998.2 kg m^{-3} à 20°C) et η est la viscosité dynamique de l'eau ($1.002.10^{-9} \text{ MPa s}$ à 20°C). La conductivité hydraulique spécifique du xylème correspond au caractère le plus intégrateur ; elle permet de prendre en compte la contribution plus importante au flux de la taille des vaisseaux (d_m) par rapport à leur nombre (V_D). Un index d'appariement de vaisseaux (V_G) représentant la proportion de vaisseaux appariés par rapport aux vaisseaux solitaires (Scholz et al. 2013) a été calculé selon la formule suivante : $V_G = \text{Nombre total de vaisseaux} / (\text{Nombre d'appariement de vaisseaux appariés} + \text{nombre de vaisseaux solitaires})$.

Une seconde série d'images prises à plus fort grossissement (objectif 20×) a été utilisée afin de mesurer l'épaisseur des parois des vaisseaux appariés (t , μm) et d'estimer leur résistance au collapsus (Hacke et al. 2001). Les mesures ont été effectuées sur des couples de vaisseaux représentatifs dont le diamètre hydraulique (b , μm) tombait systématiquement dans un intervalle de $\pm 8 \mu\text{m}$ par rapport au diamètre hydraulique moyen obtenu pour chaque individu (Fichot et al, 2010). L'index de résistance au collapsus $(t/b)^2$ a ensuite été calculé (Hacke et al. 2001) : ainsi, plus l'épaisseur relative de la paroi est grande, plus la résistance à l'implosion est forte.

La densité du xylème (ρ_x , g.cm^{-3}) a été évaluée à partir des mêmes échantillons de tige selon le principe d'Archimède (Hacke et al. 2000). Des fragments de tiges de 4cm ont été réhydratés pendant 5 jours. Après avoir été écorcés, les échantillons ont été coupés longitudinalement et la moelle a été éliminée. Le volume de l'échantillon a été mesuré en le

plongeant dans l'eau et en mesurant à l'aide d'une microbalance électronique le volume d'eau déplacé correspondant. Les échantillons ont été mis à sécher à l'étuve pendant 48h puis pesés afin de déterminer leur masse sèche. La densité du xylème a ensuite été calculée comme le rapport entre la masse sèche et le volume de l'échantillon.

2.3. Ultrastructure des ponctuations vaisseaux-vaisseaux

La structure des ponctuations vaisseau-vaisseau (taille, nombre, porosité) joue un rôle fondamental dans le déterminisme de la vulnérabilité à la cavitation. De telles observations restent cependant rares. Un travail exploratoire a donc été réalisé sur deux génotypes contrastés dont la sélection a été faite sur les critères de différences de P₅₀. Les observations au microscope électronique à balayage ont été effectuées sur un seul des cinq individus pour ces deux génotypes.

2.3.1. Microscopie optique en lumière transmise

Des allumettes de 5-7mm de longueur sur 2mm d'épaisseur ont été prélevées dans les segments de tiges avant d'être immergées dans une solution de macération de peroxyde d'hydrogène : eau distillée : acide acétique glacial (1 : 4 : 5, v/v/v) et incubées dans une étuve à 60°C pendant 48h (Chatelet et al. 2008). Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, le macérât contenant les éléments de bois dissociés a été centrifugé (environ 1min). Le culot obtenu a été re-suspendu quatre fois dans l'eau distillée. Une partie de la solution a été prélevée afin d'y ajouter une goutte de bleu de toluidine pour permettre une observation des éléments de vaisseaux en microscopie photonique $\times 200$.

2.3.2. Microscopie confocale

Cette technique de microscopie permet une observation en 3D des structures observées. Deux types de préparations ont été effectués afin de permettre des observations des éléments du xylème, dont les surfaces ponctuées, à l'aide d'un microscope confocal (LSM700, Zeiss). La première préparation est issue des macérations d'échantillons de bois décrites plus haut colorées au Calcofluor (0,1% m : v). La seconde préparation a été réalisée à l'aide de coupes longitudinales de 20 μ m effectuée au microtome rotatif, colorées à l'iodure de propidium.

2.3.3. Microscopie électronique à balayage

Pour les deux individus sélectionnés, deux blocs de bois de quelques millimètres ont été surfacés à l'aide du microtome et ont été séchés à température ambiante. Quelques jours après,

ces blocs ont été métallisés par de l'or/palladium afin de permettre l'observation des ponctuations en microscopie électronique à balayage (Hitachi S-4500 FEG, MEB Système CRYO POLARON).

3. *Analyses statistiques*

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel statistique R (R Development Core Team 2010). Un premier contrôle de qualité des données rassemblées dans le cadre de cette étude a été effectué au travers de calculs de statistiques élémentaires et d'un examen graphique préalable.

Les variables mesurées étaient des variables quantitatives. Les variables étant indépendantes, non appariées et le nombre d'individus par groupe étant inférieur à 50, la comparaison entre groupes contrastés a été effectuée à l'aide du test de comparaison de moyenne de Mann-Whitney-Wilcoxon. Ce test a été appliqué sur les données individuelles afin d'avoir une puissance de test plus importante. L'étude des relations entre variables a été abordée sous forme de représentation graphique cartésienne à partir des valeurs individuelles et appuyée par un test de corrélation de Pearson. L'ensemble des tests ont été considérés significatifs lorsque la *p-value* était inférieure à 5%.

Résultats

1. *Variabilité génétique pour la vulnérabilité à la cavitation et identification des génotypes pour l'étude anatomique*

Les valeurs individuelles de P_{50} obtenues pour l'ensemble des 35 génotypes sont représentées sur la Figure 1. L'étendue de variation des moyennes génotypiques hors génotype SPM-04 était de 0,48 MPa. Le génotype SPM-04, à faible survie et faible croissance dans le dispositif, n'était représenté que par deux individus aux valeurs très différentes (Figure 1) ; sa vulnérabilité à la cavitation n'a pu être estimée avec une précision suffisante et ce génotype n'a donc pas été retenu dans les analyses suivantes. L'étendue de la variabilité au niveau individuel au sein des 35 génotypes est quant à elle de 1,07 MPa. Les génotypes intermédiaires en termes de P_{50} présentaient généralement une variabilité inter-individuelle plus importante que ceux situés aux extrémités (Figure 1).

L'étude anatomique a été conduite sur deux groupes de cinq génotypes contrastés pour leur vulnérabilité à la cavitation : un groupe constitué de cinq génotypes relativement vulnérables (groupe « + Vulnérable ») et un groupe constitué de cinq génotypes relativement moins vulnérables (groupe « - Vulnérable »). Ces génotypes répondent aux critères de variabilité inter-individuelle faible et homogène, sont comparables pour le critère P_{50} au sein de chacun des groupes et sont représentés par un nombre d'individus au moins égal à 4 :

- (i) Groupe « + Vulnérable » : SPM-49, SPM-08, SPM-45, SPM-54 et SPM-07 (valeur moyenne de P_{50} sur les cinq génotypes de -1,76 MPa)
- (ii) Groupe « - Vulnérable » : SPM-42, SPM-47, SPM-41, SPM-13 et SPM-28 (valeur moyenne de P_{50} sur les cinq génotypes de -2,20 MPa)

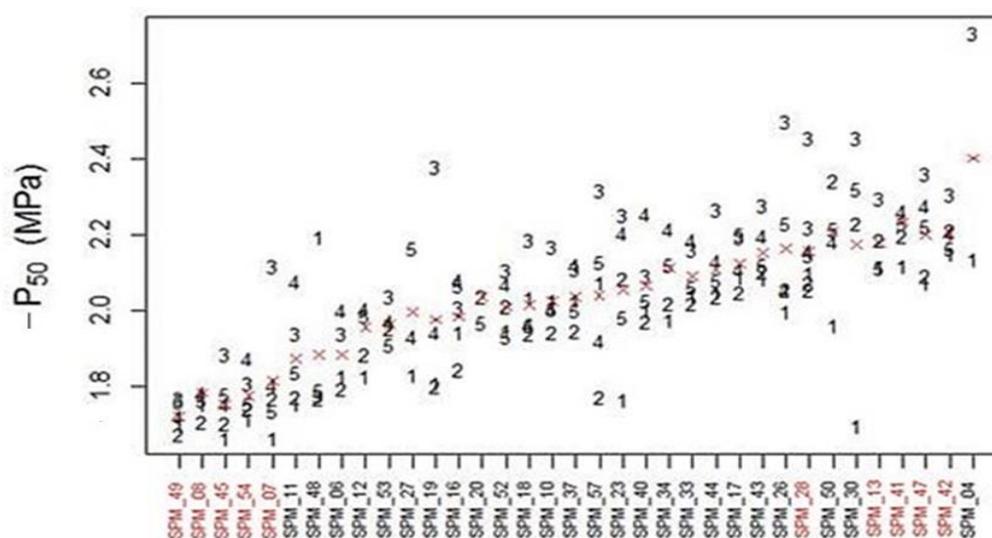


Figure 1 : Valeurs individuelles de P_{50} (en MPa) pour l'ensemble des 35 génotypes de la population de St Pryvé St Mesmin. Les génotypes sont ordonnés du plus vulnérable à la cavitation (à gauche) au moins vulnérable (à droite) sur la base des moyennes génotypiques. Les génotypes en rouge sont ceux sélectionnés pour le sous échantillonnage. Les chiffres 1 à 5 représentent un individu de chacun des cinq blocs du dispositif expérimental. Les croix rouges correspondent aux moyennes génotypiques de P_{50} .

Les courbes de vulnérabilité moyennes pour les deux groupes sont représentées sur la Figure 2. On peut noter une hétérogénéité intra-groupe légèrement plus importante au sein du groupe « - Vulnérable » (cf. l'enveloppe de la courbe moyenne, Figure 2), en accord avec la variabilité des valeurs individuelles de P_{50} observées sur la Figure 1.

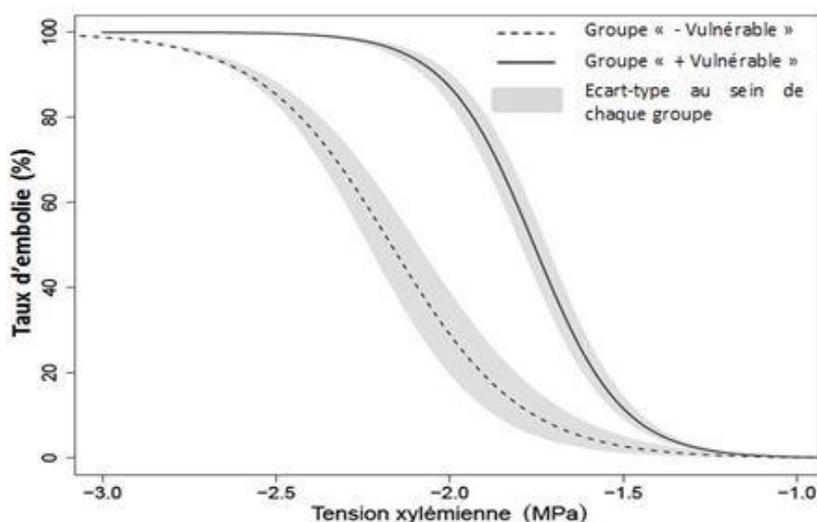


Figure 2 : Courbes de vulnérabilité à la cavitation moyennes pour les groupes « - Vulnérable » et « + Vulnérable ». La courbe en trait plein correspond à la courbe moyenne du groupe de génotypes les plus vulnérables tandis que la courbe en pointillée correspond à la courbe moyenne du groupe de génotypes les moins vulnérables. L'enveloppe grise autour de chaque courbe correspond à l'écart-type au sein de chaque groupe.

2. Caractérisation anatomique et comparaison des groupes « + Vulnérable » vs. « - Vulnérable »

2.1. Caractères en lien avec l'efficacité de conduction

Les moyennes génotypiques et les moyennes par groupe pour les caractères anatomiques en lien avec l'efficacité de conduction sont présentées Figure 3. Les deux groupes de génotypes différaient significativement pour l'ensemble des variables présentées à l'exception de la densité de vaisseaux (Figure 3). En moyenne, les génotypes du groupe « + Vulnérable » présentaient un diamètre de vaisseaux plus important que les génotypes du groupe « - Vulnérable » ($36,88 \pm 0,32 \mu\text{m}$ vs. $35,03 \pm 0,86 \mu\text{m}$, respectivement) ; de même qu'une fraction de lumen de vaisseaux plus importante ($19,68 \pm 0,45 \%$ vs. $18,07 \pm 0,43 \%$) et une conductivité hydraulique spécifique du xylème plus grande ($11,70 \pm 0,52 \text{ kg s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ vs. $9,48 \pm 0,27 \text{ kg s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$) (Figure 3). La représentation de la distribution des moyennes génotypiques par groupe a permis de révéler une plus grande variabilité entre génotypes au sein du groupe « - vulnérable » pour la taille et la densité de vaisseaux (voir encarts Figure 3) ; le phénomène inverse a été observé pour la conductivité hydraulique, alors qu'aucune différence n'a pu être notée pour la fraction de vaisseaux (Figure 3).

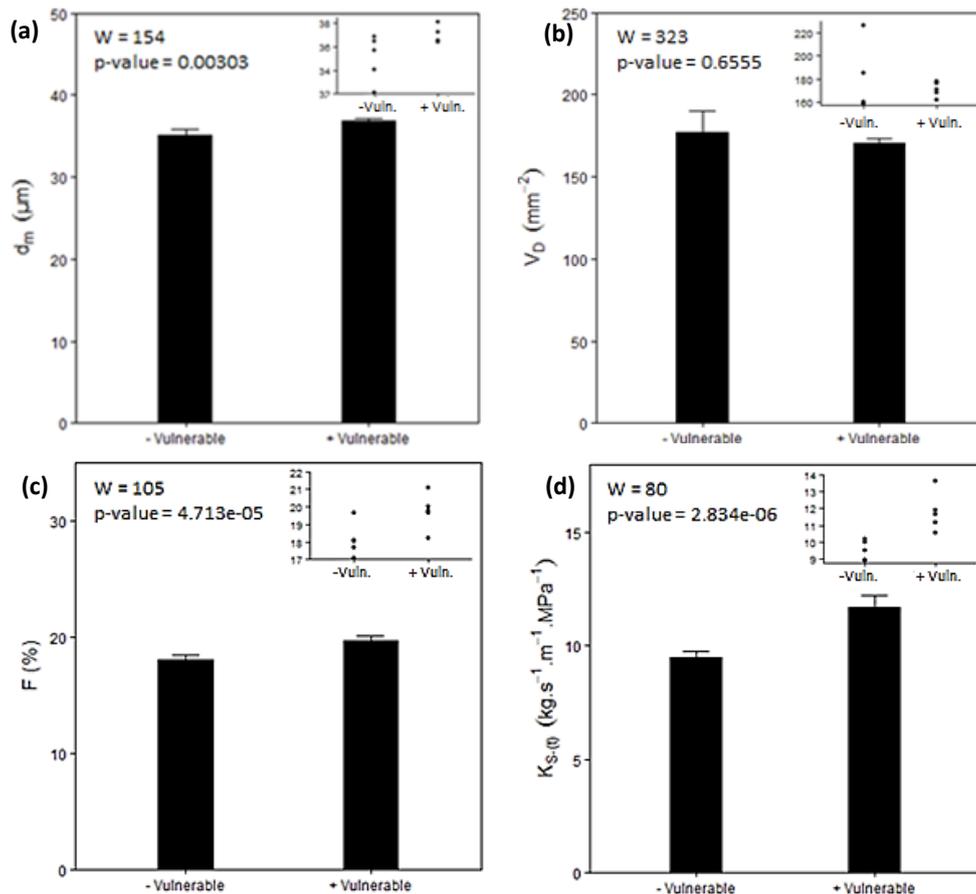


Figure 3 : Performances moyennes des groupes de géotypes « -Vulnérable » et « +Vulnérable » pour quatre caractères anatomiques en lien avec l'efficacité de conceptions : le diamètre moyen des vaisseaux (d_m) (a), la densité de vaisseaux (V_D) (b), la fraction de lumen de vaisseaux (F) (c) et la conductivité hydraulique spécifique théorique du xylème ($K_{S,(t)}$) (d). La distribution des moyennes géotypiques au sein de chaque groupe est également présentée dans les encarts en haut à droite de chaque graphique. W correspond à la valeur du test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les barres au-dessus des histogrammes correspondent aux erreurs standards.

2.2. Caractères en lien avec le renforcement mécanique

Les moyennes géotypiques et les moyennes par groupe pour les caractères anatomiques en lien avec le renforcement mécanique du xylème sont présentées Figure 4. Les deux groupes de géotypes différaient significativement pour l'épaisseur de la paroi des vaisseaux appariés (t) et pour la résistance au collapsus pariétal ($(t/b)^2$), les géotypes du groupe « + Vulnérable » présentant en moyenne des valeurs plus faibles de t et de $(t/b)^2$ que les individus du groupe « - Vulnérable » ($5,28 \pm 0,21 \mu\text{m}$ vs. $6,60 \pm 0,04 \mu\text{m}$ pour t et $0,013 \pm 0,001$ vs. $0,023 \pm 0,001$ pour $(t/b)^2$). La variabilité entre géotypes pour le caractère $(t/b)^2$ était sensiblement identique pour les deux groupes alors que pour le caractère t , la variabilité était plus importante au sein du groupe « + Vulnérable » (voir encarts Figure 4). Aucune différence significative entre groupes

n'a pu être notée pour la densité du bois du fait de l'importante variabilité observée entre génotypes au sein du groupe « -Vulnérable » (Figure 4).

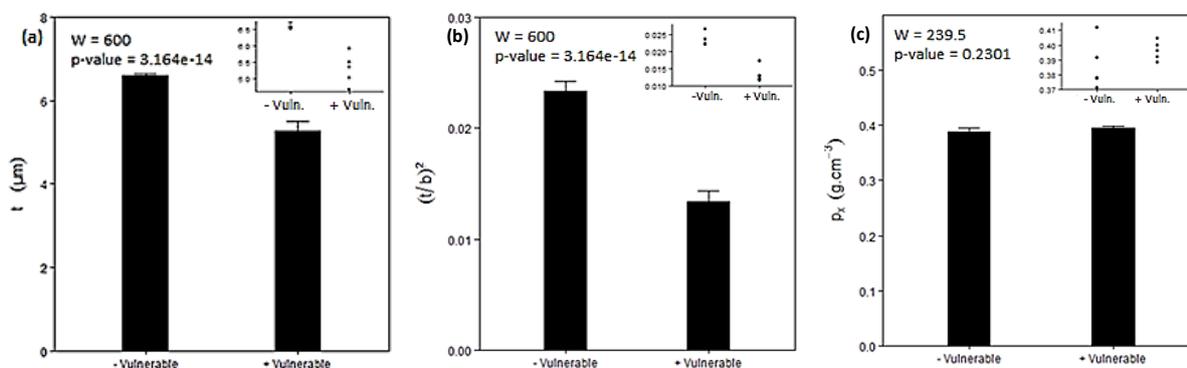


Figure 4 : Performances moyennes des groupes de génotypes « -Vulnérable » et « +Vulnérable » pour trois caractères anatomiques en lien avec le renforcement mécanique du xylème : l'épaisseur de la paroi des vaisseaux appariés (t) (a), l'index de résistance au collapsus pariétal des vaisseaux (t/b) (b), et la densité du xylème (ρ_x) (c). La distribution des moyennes génotypiques au sein de chaque groupe est également présentée dans les encarts en haut à droite de chaque graphique. W correspond à la valeur du test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les barres au-dessus des histogrammes correspondent aux erreurs-standards.

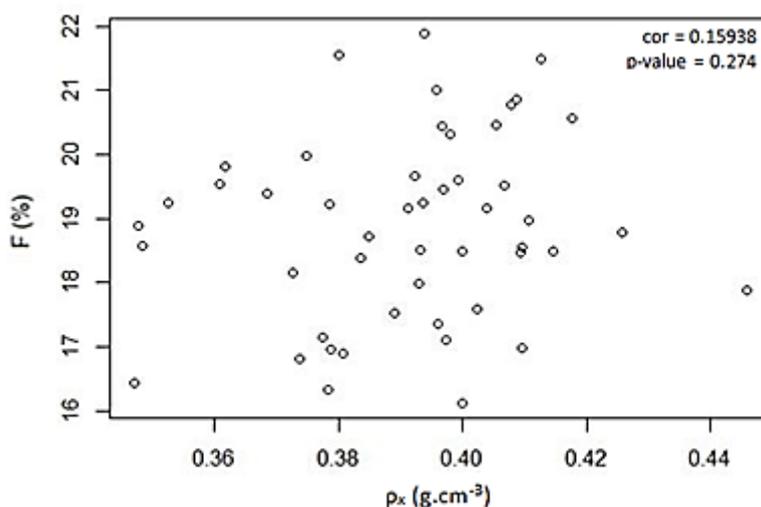


Figure 5 : Relation entre la fraction de lumen des vaisseaux (F) et la densité de bois (ρ_x). Les points correspondent aux valeurs individuelles de chaque génotype des groupes « - Vulnérable » et « + Vulnérable ». Les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson (cor) ainsi que la p -value sont indiquées.

En dehors des relations entre paramètres mesurés obtenues par construction mathématique, la relation entre la fraction de lumen des vaisseaux et la densité de xylème (Figure 5) a été étudiée. En effet, la densité du xylème, comprenant les vaisseaux, les fibres et les rayons, dépend de la fraction des parois mais également du lumen. Néanmoins, le paramètre F de notre

étude correspond à la fraction de lumen des vaisseaux uniquement ; les fibres n'étant pas intégrées. Un épaissement pariétal des vaisseaux n'implique pas forcément une augmentation de densité du xylème si les fibres compensent et assurent la fonction de soutien mécanique et le maintien de l'intégrité fonctionnelle des vaisseaux contre l'implosion, expliquant ainsi qu'aucune relation significative n'ait pu être mise en évidence.

2.3. Index d'appariement des vaisseaux

Le degré d'appariement des vaisseaux est très variable entre espèces (Carlquist 1984) et a été ici quantifié à l'aide de l'index d'appariement V_G : plus la valeur de V_G est supérieure à 1, plus le nombre de vaisseaux appariés est important. D'un point de vue fonctionnel, compte tenu du fait que le développement de l'embolie nécessite le passage d'une bulle d'air d'un vaisseau à un autre, on peut supposer que les individus présentant plus de vaisseaux appariés sont plus vulnérables à la cavitation.

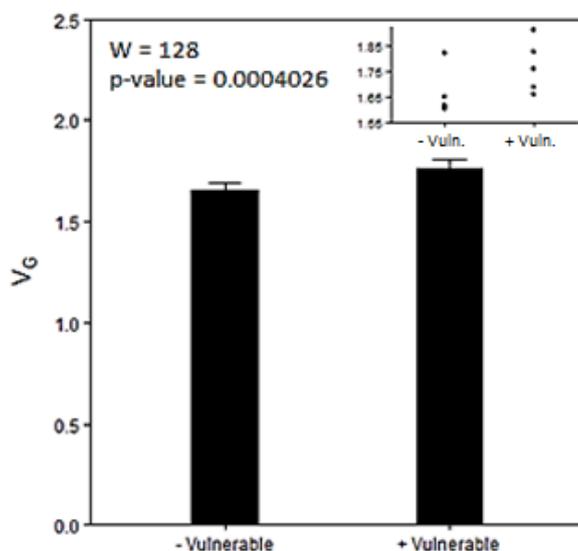


Figure 6 : Performances moyennes des groupes de géotypes « -Vulnérable » et « +Vulnérable » pour l'index d'appariement des vaisseaux (V_G). La distribution des moyennes géotypiques au sein de chaque groupe est également présentée dans les encarts en haut à droite de chaque graphique. W correspond à la valeur du test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Les barres au-dessus des histogrammes correspondent aux erreurs-standards.

Les moyennes géotypiques et les moyennes par groupes pour l'index V_G sont présentées Figure 6. En moyenne, le groupe « + Vulnérable » présentait des valeurs de V_G significativement plus grandes que le groupe « - Vulnérable ». La variabilité entre géotypes était sensiblement identique pour les deux groupes (voir encart Figure 6). On peut toutefois noter la présence d'un géotype bien distinct des autres au sein du groupe « - Vulnérable »

avec une valeur de V_G égale à 1.82 (alors que les valeurs varient seulement entre 1.60 à 1.65 pour les quatre autres génotypes), ce qui a probablement contribué à tirer légèrement vers le haut la valeur moyenne de V_G pour ce groupe (voir encart Figure 6) ; les moyennes génotypiques étaient distribuées de façon beaucoup plus homogène au sein du groupe « + Vulnérable » (voir encart Figure 6).

3. Observation et caractérisation des surfaces ponctuées et de l'ultrastructure des ponctuations des vaisseaux

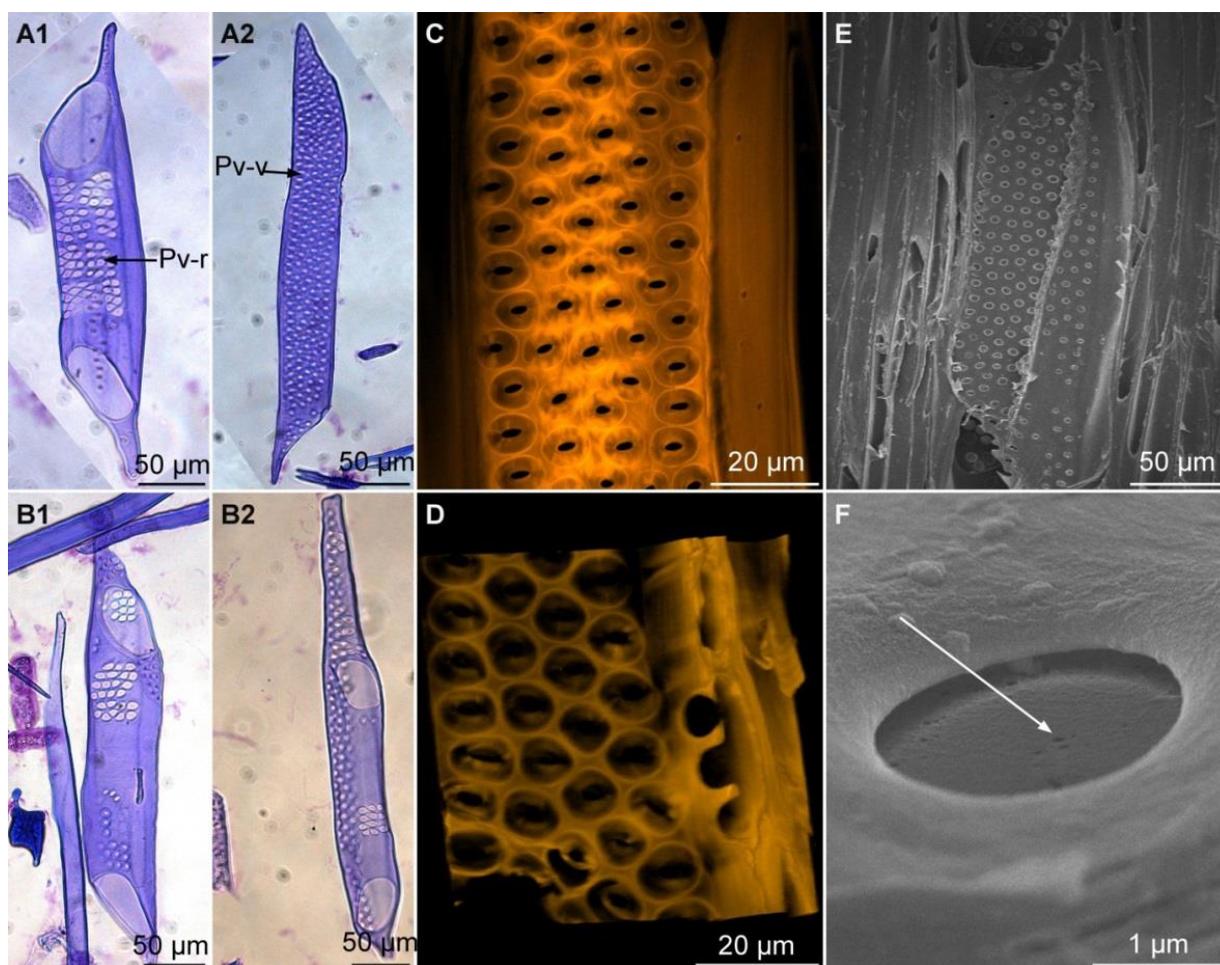


Figure 7 : Comparaison de trois techniques microscopiques afin d'explorer plus finement les éléments conducteurs des vaisseaux du xylème : (A1) et (A2) éléments de vaisseaux du génotype SPM-07 en microscopie optique ; (B1) et (B2) éléments de vaisseaux du génotype SPM-47 en microscopie optique ; (C) et (D) ponctuations du génotype SPM-07 observées en microscopie confocale ; (E) vaisseaux appariés, et (F) détail d'une ponctuation du génotype SPM-07 observé au microscope électronique à balayage. La flèche blanche indique la présence d'un pore au sein de la paroi primaire. Pv-v : ponctuation vaisseau-vaisseau ; Pv-r : ponctuation vaisseau-rayon.

3.1. Microscopie optique en lumière transmise

Le protocole de macération mis au point a permis de dissocier efficacement les différents types cellulaires constitutifs du xylème : fibres, cellules de rayons et éléments de vaisseaux. Les observations microscopiques des préparations obtenues ont révélé une variabilité importante de forme et de taille des éléments de vaisseaux aussi bien entre génotype qu'au sein d'un même génotype (Figure 7). Les éléments de vaisseaux issus d'une même allumette de bois présentaient des longueurs (de 200 μm à 440 μm) et des diamètres relativement variables (de 20 μm à 55 μm) (Figure 7 : A1, A2, B1, B2). De même, les surfaces ponctuées pouvaient être plus ou moins importantes et plus ou moins bien distribuées à la surface de l'élément conducteur (Figure 7 A et B). Certains éléments présentaient très peu voire aucune ponctuation et correspondent très certainement à des vaisseaux isolés au milieu de massif de fibres (Figure 7B1). A cette échelle d'observation, il a été possible de distinguer les ponctuations entre éléments de vaisseaux et cellules de rayons ; présentant une taille et une forme assez différentes des ponctuations vaisseau-vaisseau et qui *a priori* ne joueraient aucun rôle dans le phénomène d'embolie.

3.2. Microscopie confocale

Les observations réalisées en microscopie confocale après coloration au Calcofluor ou à l'iodure de propidium ont confirmé la variabilité de formes et de tailles entre éléments de vaisseaux ainsi que pour les surfaces ponctuées. En outre, elles ont permis de réaliser des reconstructions en 3D des surfaces ponctuées (Figure 7D) et par conséquent de visualiser les deux faces d'une même ponctuation. Néanmoins, la partie centrale de la ponctuation constituée uniquement de la paroi primaire n'a pas pu être visualisée avec cette technique d'observation (Figure 7C). Cette zone enchâssée dans la ponctuation est en partie masquée et est de ce fait peu ou pas accessible par le colorant utilisé.

3.3. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage a permis d'observer à une échelle plus fine les ponctuations vaisseau-vaisseau (Figure 7E et 7F). Les pores (Figure 7F) présents au centre de la ponctuation, où ne subsiste que la paroi primaire, ont été étudiés sur les deux échantillons. La zone centrale de la ponctuation est fragile et particulièrement difficile à conserver sous le faisceau d'électron. Le nombre de ponctuations qui ont pu être correctement observées était donc faible. Toutefois les observations réalisées laissent supposer une différence de taille et de répartition des pores dans cette zone pour les deux génotypes étudiés.

Discussion

1. Etendue de la variabilité intra-population pour la vulnérabilité à la cavitation

Au cours des deux dernières décennies, un grand nombre d'espèces végétales a pu être caractérisé pour leur vulnérabilité à la cavitation, les valeurs de P_{50} pouvant varier de -0,5 à presque -15 MPa (Maherali et al. 2004). La valeur moyenne de P_{50} obtenue dans notre étude sur les 35 génotypes (-2,03 MPa) permet de placer le peuplier noir parmi les espèces des régions tempérées les plus vulnérables à la cavitation. Ce résultat est en accord avec le fait que, comme la plupart des autres espèces de peupliers, le peuplier noir est inféodé aux milieux humides.

En comparaison des études menées à l'échelle inter-spécifique, le nombre d'études conduites à l'échelle intra-spécifique demeure beaucoup plus limité. Nos données ne permettent pas de documenter la variabilité existante entre populations mais le grand nombre de génotypes caractérisés permet une quantification assez précise de la variabilité pouvant exister en arbres d'une même population. La gamme de variation entre les deux génotypes les plus extrêmes de notre population d'étude était de 0,48 MPa ($-1,72 \leq P_{50} \leq -2,20$ MPa). Ces valeurs sont comparables aux données publiées par Schreiber et al. (2011) sur le peuplier faux tremble (*P. tremuloides* Michx.) ainsi que relatives au *P. trichocarpa* Torr. & Gray (Sparks et Black 1999). Elles tendent à confirmer la faible variabilité intra-spécifique existante pour ce caractère chez les arbres. D'autres travaux (Sterck et al. 2012 ; Wortemann et al. 2011) ont également mis en évidence que la moyenne de P_{50} au sein de plusieurs populations ne variait d'au maximum 1MPa. A titre de comparaison, une étude conduite sur seulement huit cultivars hybrides *P. deltoides* × *P. nigra* a montré des variations entre génotypes extrêmes pour P_{50} de l'ordre de 0,80 MPa (Fichot et al. 2010) ; ces variations plus importantes pourraient être liées au phénomène d'hybridation inter-spécifique.

2. Vulnérabilité à la cavitation et efficacité de conduction

La mise en place d'un xylème plus sûr est supposée avoir un coût (Martínez-Vivalta et al. 2002 ; Maherali et al. 2006). Une des premières hypothèses à avoir été formulée suppose qu'un xylème moins vulnérable à la cavitation est également moins efficace en termes de conduction de la sève brute car constitué de vaisseaux de plus petite taille (Zimmermann 1983) ; un appareil vasculaire moins efficace est alors généralement associé à des échanges de gaz moins importants et une croissance plus faible. Nos résultats supportent l'existence d'un compromis

sûreté *vs.* efficacité au sein de notre population d'étude puisque les individus du groupe « + Vulnérable » présentaient des vaisseaux plus grands, une fraction de lumen de vaisseaux plus importante ainsi qu'une plus forte conductivité hydraulique théorique que ceux du groupe « - Vulnérable ». Ces résultats contrastent avec ceux obtenus sur huit génotypes hybrides *P. deltoïdes* × *P. nigra* pour lesquels aucune relation significative n'avait pu être observée.

Il convient de noter que le compromis sûreté *vs.* efficacité, lorsqu'il est mis en évidence, n'est qu'indirect. En effet, le mécanisme de l'embolie estivale tel qu'il est décrit (l'hypothèse du « germe d'air », Tyree et Sperry 1989) prédit que le niveau de vulnérabilité à la cavitation dépend uniquement de la taille des pores au sein de la paroi primaire des ponctuations vaisseau-vaisseau, et non pas de la taille du vaisseau en lui-même. On suppose donc aujourd'hui que le compromis résulte du fait que les individus présentant des vaisseaux de plus grande taille possèdent une plus grande surface ponctuée ; une plus grande surface ponctuée est associée, en retour, à une probabilité (un risque) plus élevée de présenter au moins un pore de taille anormalement grande, donc à une vulnérabilité accrue (Wheeler et al. 2005 ; Christmann et al. 2009).

3. *Vulnérabilité à la cavitation et renforcement mécanique du xylème*

Une deuxième hypothèse permettant d'expliquer le coût de la vulnérabilité à la cavitation a également été proposée plus récemment par Hacke et al. (2001) et concerne le renforcement mécanique du xylème vis-à-vis des risques de collapsus. Selon cette hypothèse, les individus plus résistants à l'embolie peuvent théoriquement fonctionner à des tensions xylémiennes plus négatives ; or fonctionner à des tensions xylémiennes plus négatives implique des risques de collapsus (effondrement des parois par implosion) plus grands et nécessite un renforcement pariétal. Les individus moins vulnérables devraient donc présenter des parois plus épaisses, une résistance au collapsus plus grande ainsi qu'une densité du xylème plus élevée (Hacke et al. 2001). Nos résultats ont montré que le groupe « - Vulnérable » possédait en moyenne une épaisseur des parois entre deux vaisseaux appariés et un index de résistance au collapsus significativement plus importants que le groupe « + Vulnérable ». Néanmoins, aucune différence significative entre ces groupes n'a été mise en évidence pour la densité du xylème. L'ensemble de ces résultats corroborent partiellement l'hypothèse émise puisque les propriétés structurales du xylème, épaisseur de paroi et résistance au collapsus, s'avèrent être des indicateurs dans le compromis sûreté *vs.* renforcement mécanique du xylème (Martinez-Vivalta et al. 2002 ; Hacke, Jacobsen et Pratt 2009). Cependant, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre sûreté et densité du bois ; cette dernière étant dépendante de la fraction de

vaisseaux mais également des fibres, la matrice de fibres devant assurer un rôle fonctionnel dans l'intégrité des vaisseaux face aux risques de collapsus. Les travaux réalisés sur les hybrides *P. deltoïdes* × *P. nigra* (Fichot et al. 2010) mettent en évidence l'existence d'un compromis entre résistance à la cavitation et l'épaisseur de parois entre couples de vaisseaux appariés ; en revanche, aucune relation n'a été mise en évidence entre résistance à la cavitation, index de résistance au collapsus pariétal et densité du xylème.

Une seconde explication peut être avancée afin d'expliquer pourquoi une plus faible vulnérabilité à la cavitation semble associée à une épaisseur de paroi des vaisseaux appariés plus grande. D'autres travaux parus dans littérature ont également publié des résultats similaires, par exemple sur diverses espèces de *Prunus* (Cochard et al. 2008) ou sur des génotypes de peupliers hybrides (Fichot et al. 2010). Si l'épaisseur de paroi des vaisseaux appariés apparaît comme un indicateur fiable du niveau de vulnérabilité à la cavitation, cette relation reste vraisemblablement indirecte. Jensen, Choat et Pletsers (2009) ont en effet démontré qu'une paroi plus épaisse était associée à des pores au sein des ponctuations de plus petite taille, ce qui a pour conséquence de réduire les risques de cavitation.

Les compromis fonctionnels présentés ci-dessus (sûreté vs. efficacité et sûreté vs. renforcement mécanique) ont souvent été appuyés par des comparaisons inter-spécifiques (Hacke et al. 2001 ; Martinez-Vivalta et al. 2002 ; Hacke et al. 2006). Comparer des espèces à l'écologie contrastée et aux histoires évolutives différentes présente néanmoins des limites. La validité de ces compromis à l'échelle intra-spécifique reste encore très peu documentée (Martinez-Vivalta et al. 2009). Certaines études, notamment sur peupliers hybrides, ont suggéré que les relations couramment observées à l'échelle inter-spécifique ne s'appliquaient pas forcément à des échelles d'études plus restreintes notamment à cause de gammes de variations beaucoup plus limitées pour les variables d'intérêt (Fichot et al. 2010). Nos résultats ne vont pas dans ce sens et démontrent que même à des échelles individuelles ces compromis peuvent rester valides.

4. *Vulnérabilité à la cavitation et degré d'appariement des vaisseaux*

Le degré d'appariement des vaisseaux est très variable entre espèces (Carlquist 1984). Chez les angiospermes, l'embolie estivale est caractérisée par le passage d'une bulle d'air au niveau des ponctuations entre deux vaisseaux. On peut supposer que les individus présentant un plus fort degré d'appariement des vaisseaux sont plus vulnérables à la cavitation. Le résultat de notre étude sur ce paramètre corrobore l'hypothèse proposée mais également les résultats de l'étude

menée par Lens et al. (2007) démontrant que l'élévation du nombre moyen de vaisseaux en contact tend à augmenter la vulnérabilité à la cavitation.

5. Vers une caractérisation fine de l'ultrastructure des ponctuations vaisseau-vaisseau

Compte tenu du rôle fondamental des ponctuations dans le déterminisme de la vulnérabilité à la cavitation, une étude exploratoire a été initiée afin de décrire les éléments de vaisseaux isolés et d'accéder à la structure fine des ponctuations à l'échelle subcellulaire. Différentes techniques microscopiques ont été expérimentées et les premiers résultats ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail sont ici présentées.

La microscopie optique en lumière transmise est un outil suffisant pour appréhender la variabilité en termes de forme et de taille entre les différents éléments de vaisseaux présents dans un même échantillon de xylème. Une coloration simple au bleu de toluidine permet assez facilement de mesurer les surfaces ponctuées sur un élément de vaisseau. Dans le cadre de ce travail aucune analyse statistique n'a été engagée mais, il apparaît envisageable, après optimisation de la technique de préparation, de réaliser des mesures semi-automatiques des surfaces ponctuées par analyse d'image. L'atout principal de la microscopie confocale est de permettre la reconstruction d'image en 3D des zones ponctuées de ces mêmes éléments de vaisseau et d'appréhender la forme de la cellule dans son environnement tissulaire. Toutefois, la mesure des surfaces ponctuées et des tailles des ponctuations nécessite la maîtrise des techniques d'analyses d'images tomographiques beaucoup plus complexes. Seules les techniques de microscopie électronique permettent d'accéder à l'ultrastructure des ponctuations et à la taille des pores. Les premiers essais réalisés en microscopie électronique à balayage au cours de cette étude sont très encourageants et permettent d'envisager la mise en évidence de différences significatives de tailles de pores comme cela a été montré dans d'autres études (Sano 2005 ; Jansen et al. 2009).

Conclusions et perspectives

Cette étude visait à préciser les relations entre les caractéristiques anatomiques du xylème et la vulnérabilité à la cavitation au sein d'une population naturelle de peuplier noir. De telles données sur un grand nombre d'individus restent encore relativement rares à l'échelle intra-spécifique, et notamment à l'échelle intra-population comme c'est le cas dans notre étude ; ce constat est d'autant plus vrai chez les espèces ripariennes comme les peupliers. Les données

exploratoires concernant l'ultrastructure des ponctuations à des niveaux d'observation cellulaire et subcellulaire fournissent des perspectives intéressantes dans le but de caractériser plus finement les liens entre structure-fonction du xylème.

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Catherine BASTIEN, Franck BRIGNOLAS, Régis FICHOT et Françoise LAURANS pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer ce stage. Je suis réellement reconnaissante envers chacun d'entre vous pour m'avoir permis de renforcer mes connaissances mais surtout d'avoir pu en acquérir de nouvelles ainsi que d'autres compétences au travers de ces travaux. Je remercie également Justine GUET d'avoir pu contribuer à une partie de ses travaux de thèse. Tes conseils et ton aide tout au long de mon stage m'ont également permis d'évoluer. Un grand merci aussi à Véronique LAINE-PRADE sans qui les heures au laboratoire n'auraient pas été aussi appréciables.

Références

- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophototonic International* 7:36-42.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol Manag* 259:660-684.
- Barigah TS, Charrier O, Douris M, Bonhomme M, Herbette S, Ameglio 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. *Ann Bot* 112:1431-1437.
- Brignolas F, Paillassa E, Fichot R (2012) Vers de nouveaux critères de sélection pour la populiculture dans un contexte de climat changeant. *Forêt-entreprise* 20:59-64.
- Carlquist S (1984) Vessel grouping in dicotyledon wood : significance and relationship to imperforate tracheary elements. *Aliso* 10:505-525
- Chamaillard S, Fichot R, Vincent-Barbaroux C, Bastien C, Depierreux C, Dreyer E, Villar M and Brignolas F (2011) Variations in bulk leaf carbon isotope discrimination, growth and related leaf traits among three *Populus nigra* L. populations. *Tree Physiol* 31:1076-1087.

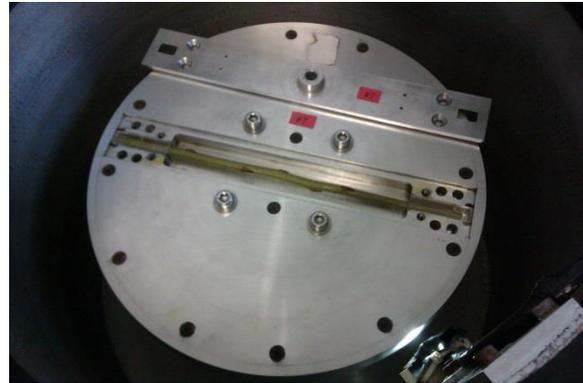
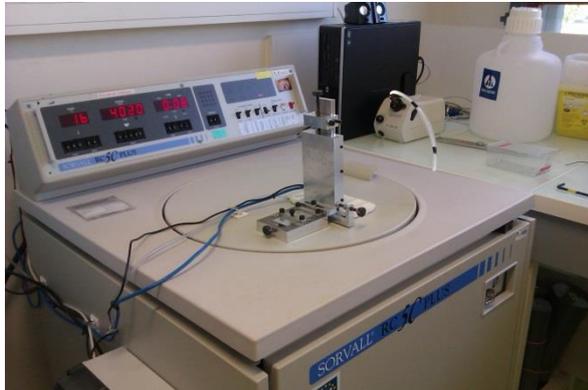
- Chatelet DS, Rost TL, Shackel KA, Matthews MA (2008) The peripheral xylem of grapevine (*Vitis vinifera*). 1. Structural integrity in post-veraison berries. *J Exp Bot* 8:1987–1996
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491:752-756.
- Christman MA, Sperry JS, Adle FR (2009) Testing the ‘rare pit’ hypothesis for xylem cavitation resistance in three species of *Acer*. *New Phytol* 182:664–674
- 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. *Physiol Plant* 124:410-418.
- Cochard H, Casella E, Mencuccini M (2007) Xylem vulnerability to cavitation varies among poplar and willow clones and correlates with yield. *Tree Physiol* 27:1761-1767.
- Cochard H, Barigah TS, Kleinhentz M, Eshel A (2008) Is xylem cavitation resistance a relevant criterion for screening drought resistance among *Prunus* species? *J Plant Physiol* 165:976-982.
- Dixon HH, Joly J (1895) On the ascent of sap. *Philos T Roy Soc*. XII:563-576.
- Engelbrecht BMJ, Comita LS, Condit R, Kursar TA, Tyree MT, Turner BL, Hubbell SP (2007) Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. *Nature* 447:80-83.
- Fichot R, Barigah TS, Chamaillard S, Le Thiec D, Laurans F, Cochard H, Brignolas F (2010) Common tradeoffs between xylem resistance to cavitation and other physiological traits do not hold among unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *Plant Cell Environ* 33:1553-1568.
- Fichot R, Chamaillard S, Depardieu C, Le Thiec D, Cochard H, Barigah TS, Brignolas F (2011) Hydraulic efficiency and coordination with xylem resistance to cavitation, leaf function, and growth performance among eight unrelated *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrids. *J Exp Bot* 62:2093-2106.
- Hacke UG, Sperry JS, Pittermann J (2000) Drought experience and cavitation resistance in six shrubs from the great basin, Utah. *Basic Appl Ecol* 1:31-41.
- Hacke UG, Sperry JS (2001) Functional and ecological xylem anatomy. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 4:97-115.
- Hacke UG, Sperry JS, Wheeler JK, Castro L (2006) Scaling of Angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiol* 26:689-701.
- Hacke UG, Jacobsen AL, Pratt RB (2009) Xylem function of arid-land shrubs from California, USA: an ecological and evolutionary analysis. *Plant Cell Environ* 32:1324-1333.

- Jacobsen AL, Ewers FW, Pratt RB, Paddock WA, Davis SD (2005) Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiol* 139:546-556.
- Jansen S, Choat B, Pletsers A (2009) Morphological variation of intervessel pit membranes and implications to xylem function in Angiosperms. *Am J Bot* 96:409-419.
- Lamy JB, Delzon S, Bouche PS, Alia R, Vendramin GG, Cochard H, Plomion C (2013) Limited genetic variability and phenotypic plasticity detected for cavitation resistance in a Mediterranean pine. *New Phytol* 3:874-886
- Lens F, Sperry JS, Christman MA, Choat B, Rabaey D, Jansen S (2007) Testing hypotheses that link wood anatomy to cavitation resistance and hydraulic conductivity in the genus *Acer*. *New Phytol* 190:709-723.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* 85:2184-2199.
- Maherali H, Moura CF, Caldeira MC, Willson CJ, Jackson RB (2006) Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant Cell Environ* 29:571-583.
- Martínez-Vilalta J, Prat E, Oliveras I, Piñol J (2002) Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Oecologia* 133:19-29.
- Martínez-Vilalta J, Cochard H, Mencuccini M, Sterck F, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E, Nolè A, Poyatos R, Ripullone F, Sas-Klaassen U, Zweifel R (2009) Hydraulic adjustments of Scots pine across Europe. *New Phytol* 184:353-364.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol* 178:719-739.
- Pammenter NW, Vander Willigen C (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiol* 18:589-593.
- Pratt RB, Jacobsen AL, Ewers FW, Davis SD (2007) Relationships among xylem transport, biomechanics and storage in stems and roots of nine *Rhamnaceae* species of the California chaparral. *New Phytol* 174:787-798.
- R Development Core Team (2010) R : A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria : R Foundationfor statistical Computing. Retrived from <http://www.R-project.org>
- Rohde A, Bastien C, Boerjan W (2011) Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiol* 31:472 -482.

- Sano Y (2005) Inter- and intraspecific structural variations among intervacular pit membranes, as revealed by field-emission scanning electron microscopy. *Am J Bot* 92(7):1077–1084.
- Scholz A, Klepsch M, Karimi Z, Jansen S (2013) How to quantify conduits in wood ? *Front. Plant Sci.* 4:56.
- Schreiber SG, Hacke UG, Hamann A, Thomas BR (2011) Genetic variation of hydraulic and wood anatomical traits in hybrid poplar and trembling aspen. *New Phytol* 190:150-160.
- Sparks JP, Black RA (1999) Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation. *Tree Physiol* 19:453-459.
- Sterck FJ, Martínez-Vilalta J, Mencuccini M, Cochard H, Gerrits P, Zweifel R, Herrero A, Korhonen JFJ, Llorens P, Nikinmaa E, Nolè A, Poyatos R, Ripullone F, Sass-Klaassen U (2012) Understanding trait interactions and their impacts on growth in Scots pine branches across Europe. *Funct Ecol* 26:541–549
- Tyree MT, Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:19-38.
- Urli M, Porte AJ, Cochard H, Guengant Y, Burlett R, Delzon S (2013) Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. *Tree Physiol* 33:672-683.
- Villar M, Forestier O (2009) Le Peuplier noir en France : pourquoi conserver ses ressources génétiques et comment les valoriser ? *Revue Forestière Française* 5:457-466.
- Wheeler JK, Sperry JS, Hacke UG & Hoang N (2005) Inter-vessel pitting and cavitation in *Rosaceae* and other vesselled plants: a basis for a safety versus efficiency trade-off in xylem transport. *Plant Cell Environ* 28, 800-812.
- Wikberg J, Ögren E (2004) Interrelationships between water use and growth traits in biomass-producing willows. *Trees* 18:70–76.
- 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 Physiol* 31:1175-1182.
- Zimmermann MH. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Annexe

Annexe 1 : Principe du cavitron



Photographies du cavitron de Bordeaux

Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation de la force centrifuge pour générer des pressions négatives (tensions) dans un segment de xylème tout en mesurant l'impact sur sa conductivité hydraulique (K). Un échantillon de tige calibré, d'une longueur de 28 cm et d'un diamètre compris entre 4 et 8 mm, a été prélevé sur l'ensemble des pousses et centré sur un rotor (Precis 2000, Bordeaux, France) monté sur une centrifugeuse (Sorvall RC5C Plus, Thermo Fisher Scientific, Munich, Allemagne). La conductivité maximale de chaque échantillon (K_{\max}) a été déterminée pour une pression xylémienne référence en mesurant le flux d'une solution ionique de référence (10 mM KCl and 1 mM CaCl_2). La pression a ensuite été diminuée par palier successif et la conductivité (K_i) de l'échantillon a été déterminée pour chaque pression. Le pourcentage de perte de conductivité hydraulique de l'échantillon a été calculé pour chaque pression mesurée selon l'équation suivante : $\text{PLC} = 100 \times (1 - K_i/K_{\max})$. Les mesures ont été répétées jusqu'à ce que le pourcentage de perte de conductivité hydraulique atteigne 90%. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel CAVI_SOFT (version 3.3.0, Université de Bordeaux). La relation entre la pression du xylème et le pourcentage de perte de conductivité hydraulique ont permis d'établir une courbe de vulnérabilité à la cavitation pour chaque échantillon. Une fonction sigmoïde a été ajustée aux données obtenues pour chaque individu selon l'équation suivante (Pammenter et Van der Willigen, 1998): $\text{PLC} = 100 / (1 + \exp(s / 25 \times (P - P_{50})))$ où P_{50} représente la tension xylémienne (en MPa) provoquant 50% d'embolie.

Annexe 2 : Analyse d'image sous Image J

Au total, 490 images ont été analysées au cours de cette étude.

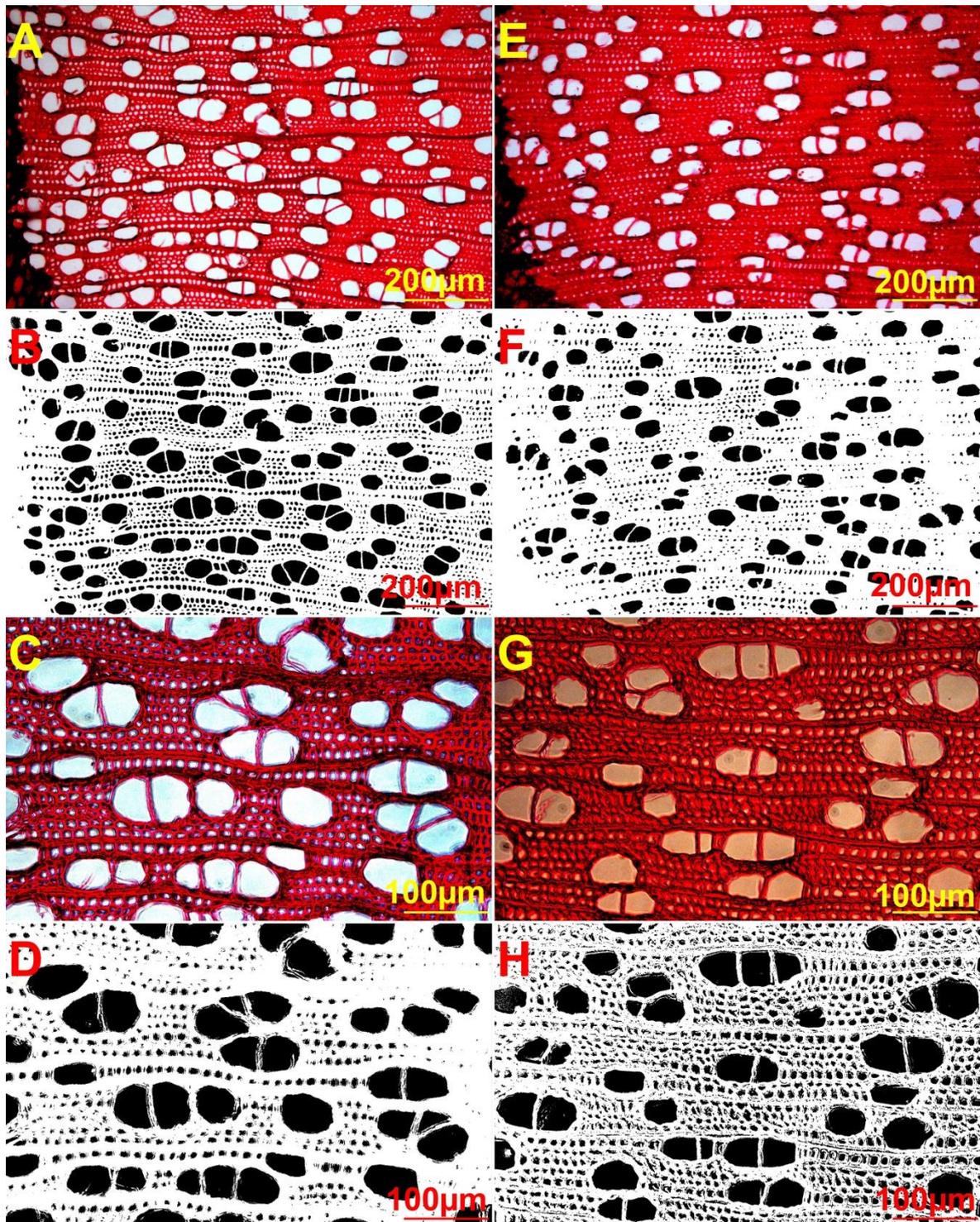


Planche photos de deux génotypes contrastés, SPM-45 (à gauche) et SPM-42 (à droite) : (A) et (E) images à l'objectif 10x ; (B) et (F) images à l'objectif 10x, binarisées pour l'analyse du nombre et de la surface respective des vaisseaux ; (C) et (G), images à l'objectif 20x ; (D) et (H), images à l'objectif 20x, binarisées pour l'analyse de l'épaisseur des 2 parois pour les vaisseaux appariés présentant un diamètre proche du diamètre hydraulique.