

À L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

PAR

NICOLAS MARRON

**Écophysiologie des peupliers euraméricains
en réponse à la sécheresse**

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs :

- | | |
|----------------------|--------------------------------------|
| - Reinhart CEULEMANS | Professeur - Université d'Anvers |
| - Jean-Marc GUEHL | Directeur de Recherches – INRA Nancy |

Examineurs :

- | | |
|--------------------|--|
| - Franck BRIGNOLAS | Maître de Conférences HDR – Université d'Orléans |
| - Francis DELMOTTE | Professeur – Université d'Orléans |
| - Erwin DREYER | Directeur de Recherches – INRA Nancy |
| - Daniel LOCKER | Professeur – Université d'Orléans |





Cette thèse a bénéficié d'un financement accordé par le Conseil Régional de la Région Centre.
Qu'il en soit ici sincèrement remercié.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux nombreuses personnes qui ont non seulement contribué d'une manière ou d'une autre à l'élaboration de ce pavé, mais également fait partie de mon quotidien pendant les quatre dernières années.

La liste est longue. Pourtant, si elle devait être réduite à une seule personne ce serai à **Franck Brignolas**. Je le remercie infiniment pour avoir été là à toutes les étapes (des rempotages à l'admiration de la pub dans la revue), pour avoir été à la fois un patron, un collègue de paillasse et un ami, pour son optimisme à toute épreuve (pas de variation, c'est quand même un résultat !), pour le temps qu'il a passé à me relire souvent au dépend de beaucoup d'autres choses, pour avoir calmé mes interprétations hasardeuses, pour avoir eu plus confiance en moi que moi-même, et pour tant d'autres choses encore.

Merci **Franck**. Je suis souvent pas très causant mais je suis conscient de tout ce que je te dois. Je pense que nos discussions à l'aube devant un café, nos séjours à Champenoux (ou à Château-Salin !), nos tournées des bonnes tables de la région, nos apéros du samedi ... vont me manquer.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à **Reinhart Ceulemans** et à **Jean Marc Guehl** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à **Daniel Locker** pour avoir également accepté de s'intéresser à mon travail. Je remercie le Professeur Ceulemans pour sa confiance dont je m'efforcerai d'être digne.

Je remercie tout particulièrement les membres de notre chère équipe, le **Professeur Francis Delmotte**, **Didier Delay**, **Romain Monclus**, **Éric Boudouresque** et **Jean-Michel Petit** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de l'équipe, pour leur implication dans des manips qui en auraient découragé plus d'un, pour leur sympathie, pour leur disponibilité, et j'en passe.

J'adresse également mes remerciements à **Marc Villar** pour sa sympathie, son implication dans les expériences du Biopôle et ses connaissances « populicoles ».

Je remercie **Erwin Dreyer** pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail et tout ce qu'il lui a apporté (des SLA, des RGR, des WUE ... et des centaines d'heures de brainstorming). J'adresse également toute ma gratitude à toute l'unité d'Écophysiologie de Champenoux pour leur accueil lors de nos nombreux séjours là-bas. Je remercie notamment chaleureusement **Jean-Marie Gioria** pour les superbes boutures, pour avoir été là dès 7 heures pour mesurer des feuilles et pour son aide technique en général. Merci également à **Claude Bréchet** pour les analyses Δ , à **Jacqueline Marchand** pour Azote/Carbone, à **Fabienne Froux** pour la thermotolérance, à **Didier Le Thiec** pour les suivis d'assimilation, à **Pierre Montpied** pour les estimations V_{cmax} , à **Rosine** et **Patrick Gross**, et à tous les autres.

J'exprime toute ma gratitude à toute l'équipe Grandes Cultures du laboratoire et particulièrement à **Stéphane Maury** d'une part pour la partie enzymologie de ce mémoire mais également pour sa gentillesse et pour s'être intéressé à cet arbre à boites de camembert. Merci également à **Alain Delaunay**, à **Adisa Causevic** et à **Sonja Gadzovska** pour leur coup de main pour les manips enzymo.

Merci **Mr Delmotte** pour vos encouragements, pour m'avoir offert un point de vue différent sur mon travail et bien sûr pour les barbecues chez vous.

Merci **Zyhton** pour ta bonne humeur perpétuelle, pour tes corrections « à la loupe », pour les boustrophédons, pour Lysistrata, pour la petite messe solennelle de Rossini ... et pour m'avoir permis de relativiser les choses et de doubler mon vocabulaire.

Merci **Romain** pour avoir fait chuter la moyenne d'âge de l'équipe, pour une manip mémorable à Champenoux, pour les Ricard à et quart et à moins le quart et pour des expressions imagées que la décence m'interdit de reproduire ici.

Merci **Erwin** pour nous avoir fait partager ta Science et nous avoir fait progresser (du moins, j'ai l'impression !).

Merci **Jean-Marie** pour ta sympathie, pour les crêpes flambées à la mirabelle et pour la bouteille du même nom.

Merci à toute l'équipe d'écophysio de Champenoux pour avoir supporté notre présence envahissante à de nombreuses reprises au cours de ces 4 ans et pour votre disponibilité à toute épreuve.

Merci **Stéphane** pour ton humour acerbe mais tellement dans le vrai, pour un formidable congrès en Crête, pour les repas chez toi, pour les restos, pour tous tes conseils et pour tout le reste.

Merci **Sonja**, **Adisa** et **Dubi** pour les repas du dimanche, pour les pitas, pour les apéros Ouzo/noix de Cajou, pour le colloque biotechnocentre (et surtout pour le voyage du retour en voiture), pour les soirées, dimanches et jours fériés au labos et pour les fous rires en général.

Je remercie **Gilles Moreau** et **Rémi Bénardeau**, le premier pour avoir réglé en un tour de main tous les problèmes techniques et informatiques possibles et imaginables, et le second pour les splendides boutures qu'il mettait à notre disposition et pour son savoir-faire à la serre.

Mes sincères remerciements aux 14 étudiants ayant fait un séjour plus ou moins long dans notre équipe (je n'ai oublié personne) et sans qui une énorme part de ce travail n'aurait pas pu être menée à son terme. Par ordre chronologique : **Muriel Pierre-Marie** pour la manip « sénescence » ; **Julien Bouilhol** (2 fois) notamment pour les essais de dosages des oses par chromatographie en phase gazeuse ; **Pierrick Priault** et **Sylvain Ribert** pour les suivis de croissance et de structure des feuilles de la manip Cycles (Chap. 1.3) ; **Guillaume Vidal** pour les estimations du pouvoir antioxydant de la manip Biopôle 01 ; **Marjorie Breton** pour les essais de dosages du Paraquat absorbé par les feuilles ; **Sébastien Mery**, **Cédric Mercier** et **François Mecattini** respectivement pour l'étude de la croissance foliaire, du statut hydrique et des SLA de la manip Biopôle 02 (Chap. 3) ; **Cécile Rinaldi** pour les estimations des activités enzymatiques de la manip Cycles (Chap. 1.5.1) ; **Florence Maunoury** et **Anne-Laure Wenes** pour les essais effectués sur arbres adultes ; **Julien Dubreuil** pour les dosages HPLC des phénols de la manip Biopôle 02 (Chap. 3) ; **Aurélié Soularue** pour les dosages HPLC des phénols et les estimations du pouvoir antioxydant de la manip Cycles (Chap. 1.5.2).

Merci **Gilles** pour le temps que tu as pu passer à régler tous les petits problèmes du quotidien mais aussi pour avoir notamment passé toute une soirée à installer mon ordinateur personnel chez moi et pour ne pas savoir dire non (ce qui peut également être un défaut !).

Merci à tous pour le travail que vous avez fourni, pour avoir mis un peu d'animation au labo et pour avoir été souvent plus que des stagiaires. Merci **Julien** pour la soirée flipper, merci **François** et **Cédric** pour la bouteille de Bordeaux, merci **Florence** pour la soirée crêpes, merci **Cécile** pour les tiramisu ...

Merci aussi d'avoir accepté des horaires hors du commun : jusqu'à onze heure du soir pour **Julien**, le 1^{er} mai pour **Sébastien**, le week-end de Pâques pour **Cécile** ...

J'aimerais également remercier **Michel Righezza**, **Saïda Ounnar** et **Christelle Dufresne** pour leur contribution à l'amélioration du gradient HPLC, les essais de quantification du Paraquat absorbé par les feuilles par spectrométrie de masse, mais aussi pour leurs accueils chaleureux lors de nos séjours à Chartres et pour leur patience face à mes questions de chimiste novice. Merci à **Gérard Keravis** pour avoir également participé à l'affinement du gradient HPLC.

Merci à tous les membres du LBLGC pour les pots, les barbecues et les « arrosages » divers et variés. Merci à **Simonne** et à **Élisabeth** pour leur gentillesse et accessoirement pour l'accès aux imprimantes couleur. Merci à **Ghélus** avec qui j'ai supporté la canicule au labo cet été.

Je remercie également tout azimut **Dominique Montigny** pour sa participation à la manip Cycles, **Gaëlle Rouault** pour son aide avec le microtome, **Annick Genty** pour les photos de coupes de feuilles au MEB, l'équipe de zoologie de l'INRA d'Ardon pour l'ambiance sympathique des cafés d'après déjeuner et les comités d'organisation 2001, 2002 et 2003 de Sciences en Sologne pour m'avoir permis de voir autre chose que du peuplier pendant ces quatre ans.

Merci à tous. Vu le nombre de personnes impliquées dans cette thèse, je n'ai finalement pas fait grand-chose !

Table des matières

	Pages
Remerciements	3
Table des matières	7
Abréviations	11
Le peuplier : histoire et culture	13
Problématique	20

Chapitre 1 Mécanismes impliqués dans la tolérance à la sécheresse

1. État des connaissances	23
2. Capacités photosynthétiques et thermotolérance	33
2.1. Matériel et méthodes	33
2.1.1. Matériel végétal	33
2.1.2. Estimation de la thermotolérance	33
2.1.3. Estimation des capacités photosynthétiques	35
2.1.4. Analyses statistiques	35
2.2. Résultats	37
2.2.1. Thermotolérance	37
2.2.2. Capacités photosynthétiques	39
2.3. Discussion	43
2.3.1. Impact de l'âge des feuilles sur leur structure, leur thermotolérance et leurs capacités photosynthétiques	43
2.3.2. Différences de capacités photosynthétiques et de thermotolérance entre clones	45
3. Croissance et structure des feuilles	47

Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'
Tree Physiology, 23:in press

4. Ajustement osmotique	61
4.1. Matériel et méthodes	61
4.1.1. Matériel végétal	61
4.1.2. Extraction des oses solubles	61
4.1.3. Dosages des oses solubles réducteurs	61
4.2. Résultats	63
4.3. Discussion	63
4.3.1. Impact de l'âge des feuilles sur leur teneur en oses solubles	64
4.3.2. Impact de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage successifs sur les teneurs foliaires en oses solubles	64

5. Systèmes enzymatiques de détoxification des formes activées de l'oxygène et composés phénoliques	66
5.1. Activités enzymatiques des feuilles	66
5.1.1. Matériel et méthodes	66
5.1.1.1. Matériel végétal	66
5.1.1.2. Extraction des protéines	66
5.1.1.3. Dosage spectrophotométrique des protéines	68
5.1.1.4. Mesure des activités enzymatiques par spectrophotométrie	68
5.1.1.4.1. Superoxyde dismutase (SOD)	68
5.1.1.4.2. Catalase	70
5.1.1.4.3. Peroxydase	71
5.1.1.5. Électrophorèses des protéines	71
5.1.1.6. Zymogrammes	71
5.1.2. Résultats	72
5.1.2.1. Protéines	72
5.1.2.2. Superoxyde dismutase	76
5.1.2.3. Catalase	78
5.1.2.4. Peroxydase	78
5.1.3. Discussion	81
5.2. Composition phénolique des feuilles et pouvoir antioxydant	83
5.2.1. Matériel et méthodes	83
5.2.1.1. Matériel végétal	83
5.2.1.2. Dosage des flavanols	83
5.2.1.3. Analyse par HPLC de la composition phénolique des extraits	83
5.2.1.4. Estimation du pouvoir antioxydant	84
5.2.2. Résultats	88
5.2.2.1. Teneurs en flavanols	88
5.2.2.2. Composition phénolique par HPLC	88
5.2.2.3. Pouvoir antioxydant	92
5.2.3. Discussion	93
5.2.3.1. Intervention des composés phénoliques dans le développement de la feuille	93
5.2.3.2. Intervention des composés phénoliques durant la sécheresse	94
5.2.4. Conclusion	98
6. Tolérance à un stress oxydatif généré artificiellement par du Paraquat	102
6.1. Matériel et méthodes	102
6.1.1. Matériel végétal	102
6.1.2. Induction du stress oxydatif	104
6.1.2.1. Effet de la concentration en Paraquat	104
6.1.2.2. Effet de la sécheresse	104
6.1.3. Détection des effets du stress oxydatif	106
6.1.3.1. Principe expérimental	106

6.1.3.2. Mesure des paramètres de fluorescence	108
6.2. Résultats	108
6.2.1. Effet de la concentration en Paraquat sur le rendement quantique du photosystème II	108
6.2.2. Effet d'un stress hydrique préalable	112
6.3. Discussion	118
7. Synthèse	124

7.1. Évolution anatomique et physiologique de la feuille de peuplier de son émergence à sa sénescence	124
7.2. Impact de la sécheresse en fonction du stade de développement de la feuille	126
7.3. Différences de réponse à la sécheresse et au ré-arrosage entre clones	129

Chapitre 2 Recherche de déterminants foliaires de productivité et d'efficacité d'utilisation de l'eau

1. État des connaissances	131
1.1. Définition et facteurs influençant la productivité	131
1.2. La feuille : liens avec la productivité	132
1.2.1. Surface foliaire	133
1.2.2. Rapport Surface / Masse foliaire	133
1.2.3. Efficacité d'utilisation de l'eau	135
2. Caractères foliaires associés à la productivité et à la discrimination isotopique du carbone parmi 31 clones de <i>Populus x canadensis</i> (Moench)	137
Leaf traits correlated with productivity and carbon isotope discrimination in 31 <i>Populus x canadensis</i> (Moench) clones <i>New Phytologist</i> , soumis	
3. Conclusion et perspectives	168

Chapitre 3 Recherche de déterminants de tolérance à la sécheresse

1. Introduction	169
2. Matériel et méthodes	173
2.1. Matériel végétal et initiation de la contrainte hydrique	173
2.2. Estimation des paramètres	173

2.3. Analyses statistiques	177
3. Résultats	179
3.1. Statut hydrique et variabilité clonale	179
3.2. Présentation des variables et différences entre clones en conditions hydriques non limitantes	179
3.3. Relations entre variables en conditions hydriques non limitantes	189
3.4. Impact de la sécheresse sur les paramètres de vigueur, de croissance et de structure des feuilles	193
3.5. Relations entre paramètres mesurés en conditions hydriques non limitantes et paramètres mesurés en conditions de sécheresse	195
4. Discussion	196
4.1. Relations entre productivité, croissance foliaire, structure des feuilles et transpiration en conditions non limitantes en eau	196
4.2. Modulation par la sécheresse des relation entre productivité, croissance des feuilles, structure des feuilles et transpiration	199
Conclusion et perspectives	
Bibliographie	205
Annexes	219
Annexe 1.1. Traits physiologiques de deux clones de <i>Populus x euramericana</i> , Luisa Avanzo et Dorskamp, durant un cycle sécheresse / ré-arrosage Physiological traits of two <i>Populus x euramericana</i> clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle Tree Physiology, 22:849-858	219
Annexe 3.1. Évolution du nombre de feuilles en fonction du temps	230
Annexe 3.2. Évolution de la surface foliaire en fonction temps	231
Annexe 3.3. Surface massique des feuilles en fonction de l'index foliaire	232
Annexe 3.4. Vitesse d'étalement des feuilles en fonction de l'index foliaire	233
Annexe 3.5. Surface foliaire en fonction de l'index foliaire	234
Annexe 3.6. Profils d'élutions (HPLC) d'extraits de feuilles	235
Annexe 3.7. Biomasse totale et coefficients d'allocation de biomasse	237

Abréviations

2000v	: clone '2000_verde'	dTLN/dt	: vitesse d'apparition des feuilles
4CL	: Coumarate:Coenzyme A Ligase	E	: transpiration foliaire
A	: Assimilation nette de CO ₂	e ⁻	: électron
ABA	: ABscissique Acid	ε	: coefficient d'élasticité volumique
A _c	: Assimilation nette de CO ₂ limitée par la carboxylation	E28	: clone 'Eco_28'
ACP ou PCA	: Analyse en Composantes Principales	EA	: Équipe d'accueil
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique	EDTA	: Éthylène Diamine TétraAcétate
ADP	: Adénosine DiPhosphate	Eq	: Équivalent
AF	: clone 'Agathe_F'	F	: Facteur
AFOCEL	: Association FORêt CELLulose	F ₀	: Fluorescence de base
A _j	: Assimilation nette de CO ₂ limitée par la régénération du RuBP	F3H	: Flavone 3-Hydroxylase
<i>al.</i>	: <i>alii</i>	F5H	: Acide Férulique 5-Hydroxylase
ANOVA	: ANalyse Of VAriance	FAO	: Food and Agriculture Organization
APX	: Ascorbate PeroXydase	Fd	: Ferredoxine
AS	: Anthocyanine Synthase	FI	: Foliar Index
ATP	: Adénosine TriPhosphate	FI _A	: index foliaire correspondant à SLA _A
Bcl	: clone 'Boccalari'	Flad	: index foliaire de la première feuille adulte le long de la tige
Bg	: clone 'Branagesi'	F _m	: Fluorescence maximale
Biomass	: Biomasse totale	FS	: Flavonol Synthase
Bt	: clone 'Brenta'	Fv	: clone 'Flevo'
c	: coefficient directeur	F _v	: Fluorescence variable
C	: feuilles en croissance	GLM	: General Linear Model
C4H	: Cinnamate 4 Hydroxylase	GR	: Glutathion Réductase
C _a	: pression partielle de CO ₂ atmosphérique	GSH	: Glutathion réduit
C _A	: teneur surfacique foliaire en carbone	Gv	: clone 'Gaver'
Cat	: (+)-catéchine	g _w ou g _s	: conductance stomatique
CAT	: Catalase	Gy	: clone 'Ghoy'
CB	: clone 'Cappa_Biglionia'	H ⁺	: proton
Cc	: clone 'Carpaccio'	H ₂ O	: eau
Cemagref	: institut public de recherche pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement	H ₂ O ₂	: peroxyde d'hydrogène
Chl _A	: teneur surfacique foliaire en chlorophylles	H5	: clone H523-9
C _i	: pression partielle de CO ₂ dans les cavités sous stomatiques	HCl	: acide chlorhydrique
Cl	: Chalcone Isomérase	HP	: Hewlett-Packard
Cm	: clone 'Cima'	HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
C _M	: teneur massique foliaire en carbone	I2	: clone 'I214'
CO ₂	: dioxyde de carbone	I4	: clone 'I45-51'
COMT	: Acide Caféique O-MéthylTransférase	IDF	: Institut pour le Développement Forestier
coum	: coumarine	IFS	: IsoFlavone Synthase
CS	: Chalcone Synthase	INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
Cyt.	: Cytochrome	IPC	: International Poplar Commission
D	: Day (jour)	J	: énergie absorbée par le PS II
Δ ¹³ C	: discrimination isotopique du carbone	JA	: jeunes feuilles adultes
ΔA	: variation d'Absorbance	J _{max}	: flux maximal d'électrons
DEA	: Diplôme d'Études Approfondies	KCN	: cyanure de potassium
DETAPAC	: DiÉthylèneTriAminePenta ACétate	k _D	: constante de vitesse de la dissipation thermique
DFR	: Déshydroflavonol réductase	k _F	: constante de vitesse de fluorescence
DHAR	: DésHydroAscorbate Réductase	k _P	: constante de vitesse de la voie photochimique
DLE	: Duration of Leaf Expansion	Kp	: clone 'Kopecky'
DMACA	: 4-(DiMéthylAmino)CinnamAldéhyde	Ks	: clone 'Koster'
Ds	: clone 'Dorskamp'	k _T	: constante de vitesse du transfert de l'énergie d'excitation au PS I
dTLA/dt	: vitesse d'étalement des feuilles	L	: Longueur de feuille

LA	: clone 'Luisa_Avanzo'	Ψ_{wp}	: potentiel hydrique foliaire de base
LA50	: Leaf Area 50	Q	: Quinone
LAm _{ax}	: surface foliaire maximale le long de la tige	r	: coefficient de corrélation linéaire de Pearson
LAR	: Leaf Area Ratio (surface foliaire rapportée à la biomasse)	Rb	: clone 'Robusta'
Lb	: clone 'Lambro'	R _d	: respiration due aux phosphorylations oxydatives
LBLGC	: Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures	RP	: Reverse Phase
LMR	: Leaf Mass Ratio (allocation de biomasse au feuillage)	RGR	: Relative Growth Rate (vitesse de croissance relative)
LPI	: Leaf Plastochron Index (index de plastochrone foliaire)	RGR _P	: ralentissement du RGR des stressés par rapport aux témoins
LPI _A	: LPI correspondant à SLA _A	RMR	: Root Mass Ratio (allocation de biomasse aux racines)
LPI _{ad}	: LPI de la première feuille adulte le long de la tige	RuBisCO	: Ribulose 1,5 diphosphate carboxylase oxygénase
Lstem	: Longueur de tige	RuBP	: Ribulose diphosphate
Man	: Mannose	RWC	: Relative Water Content (teneur relative en eau)
MC	: clone 'Mellone_Carlo'	S	: Surface foliaire
MDHAR	: MonoDésHydroAscorbate Réductase	S ₀	: coefficient directeur à l'origine du trinôme SLA=f(LPI) ou SLA=f(FI)
MF ou FW	: Masse Fraîche (Fresh Weight)	SAB	: Sérum Albumine Bovine
μkat	: microkatal	Sg	: clone 'Soligo'
MI	: clone 'Mella'	SLA	: Specific Leaf Area (surface massique)
MPa	: MégaPascal	SLA _A	: SLA maximum le long de la tige
MS ou DW	: Masse Sèche (Dry Weight)	SM	: clone 'San_Martino'
MT ou TW	: Masse à pleine Turgescence (Turgid Weight)	SNK	: Student-Newman-Keuls
N10	: clone NL-1070	SOD	: SuperOxyde Dismutase (dismutase de superoxyde)
N31	: clone NL-3149	SPAD	: Soil Plant Analysis Development
N39	: clone NL-3972	SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
N40	: clone NL-4040	SS	: Stilbène Synthase
N _A	: teneur surfacique foliaire en azote	SWC	: Soil Water Content (teneur en eau du sol)
NADP	: NicotinAmide DiPhosphate	TAL	: Tyrosine Ammonia Lyase
NAR	: Net Assimilation Rate (vitesse d'assimilation nette de CO ₂)	T _C	: Température Critique
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium (bleu nitré de tétrazolium)	TEMED	: N,N,N',N'-TÉtraMéthyl ÉthylèneDiamine
N _M	: teneur massique foliaire en azote	TLA	: Total Leaf Area
¹ O ₂	: oxygène singulet	TLN	: Total Leaf Number
O ₂	: dioxygène	Tp	: clone 'Triplo'
O ₂ ⁻	: anion superoxyde	Tris	: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
O ₃	: Ozone	UDP	: Uridine DiPhosphate
O ₂ H·	: radical perhydroxyle	UFGT	: UDP-glucose Flavanol 3-O-Glucosyl Transférase
OH·	: radical hydroxyle	UPRES	: Unité Propre à la Recherche de l'Enseignement Supérieur
OH ⁻	: ion hydroxyle	UV	: Ultra Violet
P.	: <i>Populus</i>	v	: volume
P	: Probabilité	V	: Volume cellulaire
Pa	: Pascal	V _{cmax}	: Vitesse maximale de carboxylation
PAL	: Phénylalanine Ammonia Lyase	V _{max}	: Vitesse d'étalement maximale le long de la tige
PAM	: Pulse Amplitude Measurement	WUE	: Water Use Efficiency (efficacité d'utilisation de l'eau)
PAO	: Pouvoir AntiOxydant	Y	: efficacité photochimique maximale du photosystème II
PAR	: Photosynthetically Active Radiations		
PC	: PlastoCyanine		
PFD	: Photon Flux Density		
P _i	: Phosphate inorganique		
Pn	: clone 'Pannonia'		
PQ	: PlastoQuinone		
PS I	: PhotoSystème I		
PS II	: PhotoSystème II		
Ψ	: potentiel hydrique		
Ψ _P	: potentiel de turgescence		
Ψ _{II}	: potentiel osmotique		

Le peuplier : histoire et culture

Dans la Grèce et la Rome antiques, les symboles rattachés au peuplier étaient nombreux. Dans la mythologie grecque le peuplier blanc était considéré comme l'arbre de la **résurrection**. D'après la légende, la nymphe Leuké, fille d'Océan, échappa à Hadès en se métamorphosant en peuplier blanc. À sa mort, ce dernier planta des peupliers blancs aux Champs-Élysées. Par opposition, le peuplier noir était associé à la **mort**. Les trois Héliades se métamorphosèrent en peupliers noirs pour pleurer leur frère, Phaéton, tombé dans le Pô. Le peuplier noir a d'ailleurs été traditionnellement planté dans les cimetières à défaut de cyprès ou d'ifs. Dans l'astrologie celtique, le peuplier manifeste l'**incertitude**. Lors des journées de 1830 et 1848, en France, le peuplier a été planté en grandes cérémonies comme arbre de la **liberté** et ambassadeur du **peuple** (*Populus*) qui, comme sa feuille, s'agite et tremble au moindre coup de vent.

Les origines du peuplier sont anciennes. Les paléo-botanistes ont retrouvé des empreintes fossiles de feuilles datant du paléocène (- 55/60 millions d'années) pour la section *Tacamahaca* et du miocène (- 10/15 millions d'années) pour la section *Aigeiros*. *Populus nigra* et *Populus deltoides* semblent respectivement descendre de *P. latior* et de *P. glandulifera*. Bien que *P. nigra* soit présent dans les régions méditerranéennes de l'Europe depuis des millénaires, cette espèce s'est répandue en France à partir de 1749 sur les bords du canal de Briare *via* l'Iran puis l'Italie. De plus, la légende raconte que le général Bonaparte, lors de ses campagnes en Italie, apprécia cet arbre et en fit planter dans l'Est de la France. L'espèce *P. deltoides* a été introduite d'Amérique du Nord en France et en Angleterre à la fin du 17^{ème} et au 18^{ème} siècle sous forme de boutures.

La culture du peuplier en France est traditionnelle depuis le 18^{ème} siècle mais a connu un regain d'intérêt depuis 1942 sous l'égide de Philippe Guinier (École Nationale des Eaux et Forêts) avec l'arrêt des importations de tremble scandinave pour les allumettes et d'okoumé pour le contreplaqué, et la création en 1942 de la « Commission Française du Peuplier » qui devient la « Commission Internationale du Peuplier – IPC » en 1947 à l'initiative de la France et sous l'égide de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Figure 0.1). Depuis, 28 pays sont venus agrandir la liste des 8 pays membres ayant répondu à l'appel de la France pour participer à la semaine du peuplier en

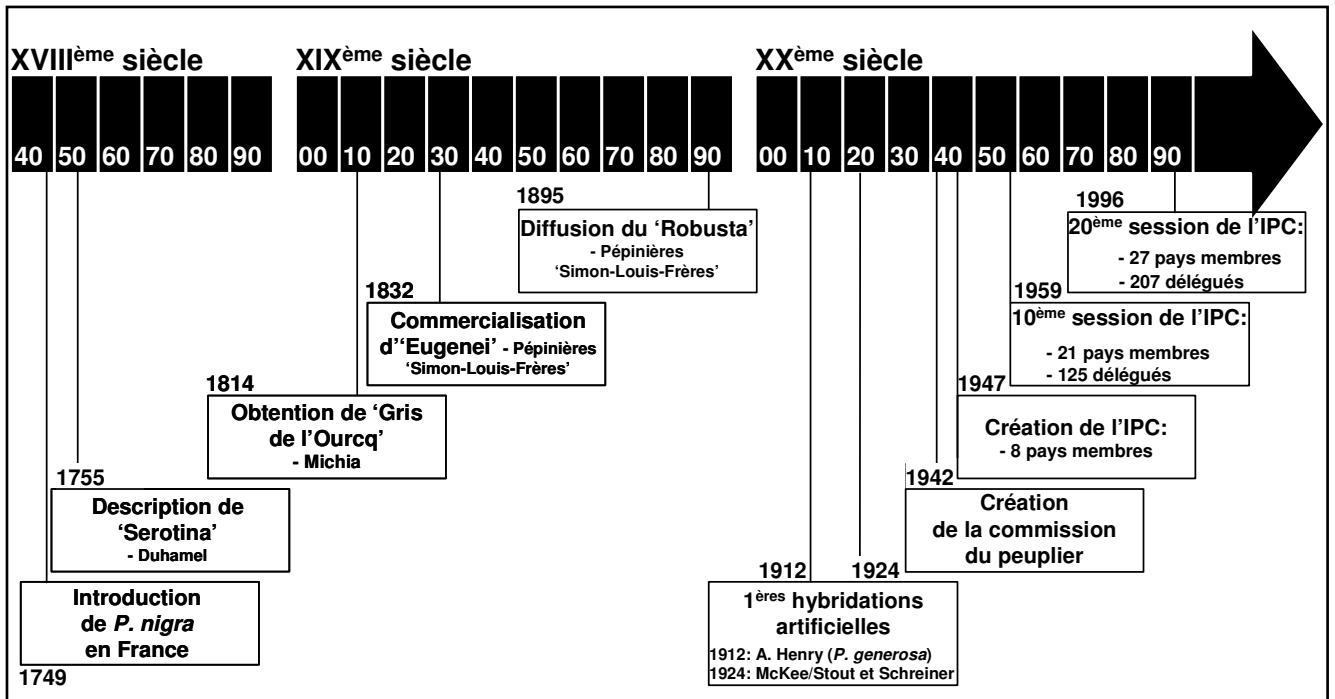


Figure 0.1. Chronologie des événements ayant marqué les débuts de la sélection des cultivars de peuplier en France et étendue à la création de la commission internationale du peuplier (IPC). D'après Viart et Fugalli 1997 et Viart 1999.



Figure 0.2. Peupleraies de Triguères (Loiret) (Cemagref) (A et B), Château-Renard (Loiret) (Cemagref) (C) et Cléry-Saint-André (Loiret) (LBLGC) (D).

avril 1947. Les fonctions de l'IPC sont multiples : étudier les aspects scientifiques, techniques, sociaux et économiques de la culture du peuplier, promouvoir les échanges d'idées et de matériel entre chercheurs, producteurs et utilisateurs, créer des programmes de recherche communs et stimuler l'organisation de rencontres (Viart et Fugalli 1997, Viart 1999).

Les peupliers sont des arbres à feuilles caduques, alternes, simples et à longs pétioles. Il s'agit d'une essence de lumière que l'on trouve à l'état naturel essentiellement aux bords des cours d'eau (Figure 0.2). Le peuplier présente une croissance extrêmement rapide et est, de ce fait, très exploité (Brosse 2000). Son développement est conforme au modèle architectural de Rauh : développement monopodial du tronc, orthotropie des axes et rythmicité de la croissance et de la ramification. L'arbre construit sa cime par réitération (Caraglio *et al.* 1990).

Le genre *Populus* regroupe près de 30 espèces de peuplier. Il appartient à la famille des Salicacées comme le genre éponyme *Salix*. C'est un genre complexe qui a dû être divisé, pour cette raison, en 6 sections botaniques (Figure 0.3). Les hybridations au sein ou entre ces sections ont donné naissance à de nombreux hybrides (Altman 1999). La seule espèce de peuplier spontanée dans le sud de la France est l'espèce *Populus nigra* dont la très répandue variété 'Italica' a été importée d'Asie. On le trouve souvent en mélange avec *P. alba*. En Amérique du Nord, le peuplier noir compte plusieurs variétés de *P. deltoides* (le « cottonwood » américain) dont les plus importantes sont le peuplier de Caroline (variété 'Angulata' = 'Carolin') et le peuplier de Virginie (variété 'Monilifera' = *P. canadensis*). Introduits en France sous forme de boutures, ces peupliers ont donné naissance à des clones décrits à tort comme des espèces.

L'aire naturelle du genre *Populus* occupe la quasi-totalité de l'hémisphère nord (États-Unis, Canada, Europe, Russie, Chine, Japon et Afrique du Nord) mais les représentants de la section *Aigeiros* sont surtout présents dans l'est des États-Unis (*P. deltoides*) et autour de la méditerranée (*P. nigra*) (Figure 0.4). Dans le monde, 25 millions d'hectares de peupliers sont plantés. La culture du peuplier est développée dans la plupart des pays de l'hémisphère nord où il est présent à l'état naturel. Dans l'hémisphère sud, le peuplier est cultivé aux abords de Buenos Aires et de Montevideo et au Chili sur la côte

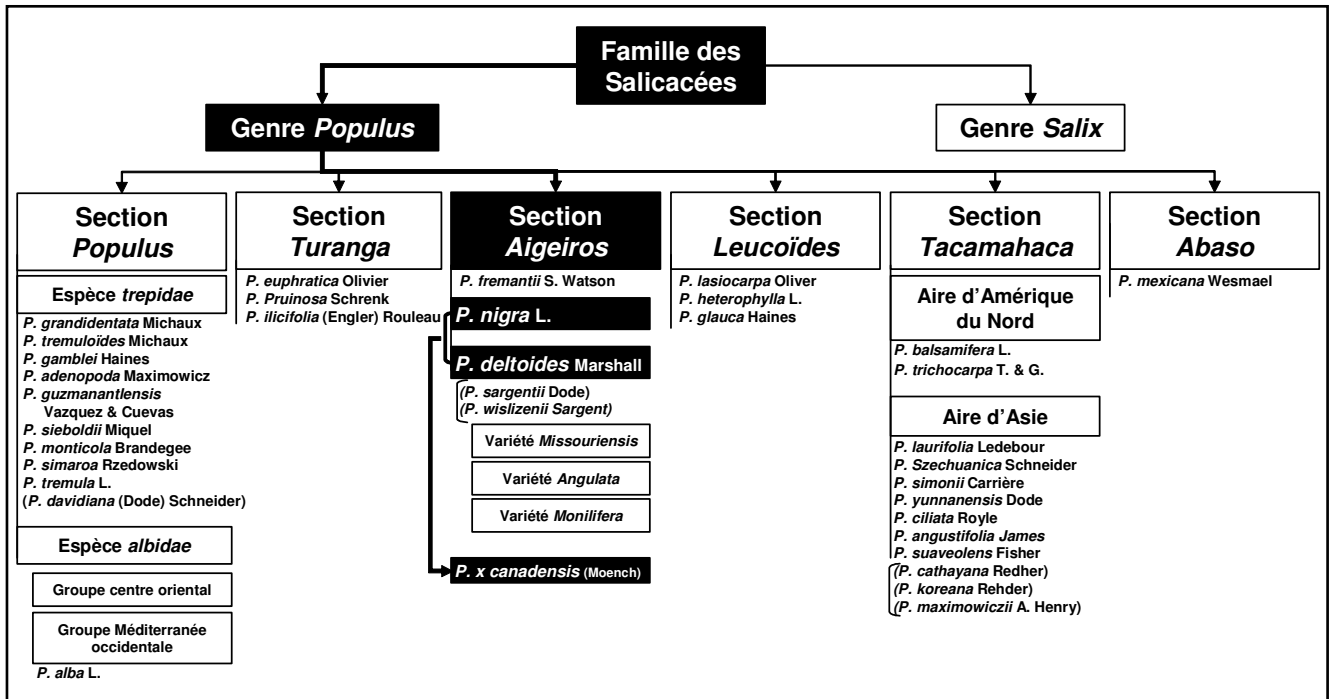


Figure 0.3. Subdivisions du genre *Populus*. Les noms entre parenthèses sont souvent considérés comme des espèces à part entière dans la littérature mais sont sans doute des sous-espèces de l'espèce les précédant. D'après Zsuffa 1975 et Eckenwalder 1996.

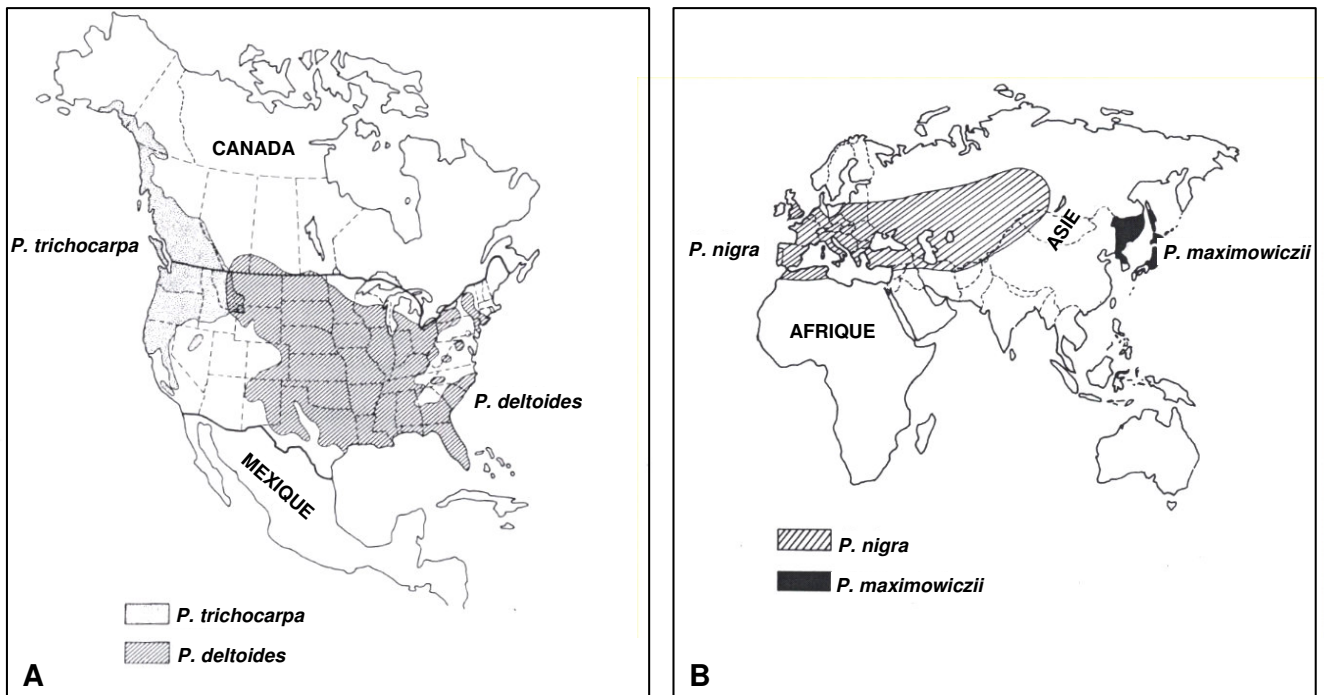


Figure 0.4. Distribution géographique de *Populus trichocarpa*, *P. deltoides* (A), *P. nigra* et *P. maximowiczii* (B) D'après Ceulemans 1990.

ouest de l'Amérique du Sud, à l'extrême sud de l'Afrique et en Nouvelle-Zélande (FAO 1956). En France, les surfaces sont passées de 100 000 ha en 1939 à près de 250 000 ha ces dernières années (Figure 0.5). La **Picardie** et le **Bassin parisien** (71 000 ha), la région **Poitou-Charentes** et le **Bassin aquitain** (respectivement 21 000 et 45 000 ha) et la **région Centre** et la **basse vallée de la Loire** (54 000 ha) sont les trois régions qui se partagent l'essentiel de la populiculture (Figure 0.6). En 1997, la **Bourgogne** et la région **Rhône-Alpes** arrivent en 4^{ème} et 5^{ème} positions avec respectivement 13 000 et 11 000 ha. Dans toutes ces régions, les peupleraies sont en continuelle expansion. Le peuplier est la troisième essence feuillue cultivée après le chêne et le hêtre. Entre 1995 et 1998, les surfaces de plantations de peuplier ont progressé de 1 à 2 % par an. En région Centre, le peuplier correspond à 3 % des essences forestières face aux chênes (64 %) et aux résineux (21 %).

Mis à part quelques clones de *P. deltoides*, de *P. trichocarpa* et de *P. alba*, la populiculture française est dominée par les **hybrides euraméricains** (*P. x canadensis* (Moench)), issus du croisement *P. deltoides* (femelle) x *P. nigra* (mâle), et par les **hybrides interaméricains**, issus du croisement *P. deltoides* x *P. trichocarpa*. Si les origines des hybrides euraméricains en France remontent à 1755, avec la description par Duhamel de '**Serotina**' puis l'obtention par Michia de '**Gris de l'Ourcq**' en 1814, les hybrides interaméricains ne sont représentés au catalogue national que depuis 1982. Ces 20 dernières années, la part relative des deux espèces dans les plantations françaises a été marquée par deux phases dictées par le comportement des clones en réponse aux attaques fongiques (Figure 0.7). Les hybrides interaméricains, issus du croisement des représentants de deux sections du genre *Populus*, présentent une remarquable vigueur hybride et rencontrent, dès leur arrivée sur le marché, un accueil très favorable de la part des exploitants. Entre 1987 et 1997, le nombre de plants d'hybrides interaméricains vendus, représentés principalement par '**Beaupré**', triple, ne laissant que peu de place aux cultivars euraméricains. Néanmoins, ces cultivars interaméricains ont subi de sévères attaques de rouille en 1997 et seront de moins en moins utilisés par la suite. En effet jusqu'en 1998, les ventes (ou la commercialisation) de clones interaméricains (représentés majoritairement par '**Beaupré**') ne font qu'augmenter mais diminuent brutalement au profit des clones euraméricains par la suite (Breton 2000, Paillassa 2001, Balzinger et Ginisty 2002). Pour les 20 années à venir, l'AFOCEL (Association FORêt CELLulose) prévoit une forte

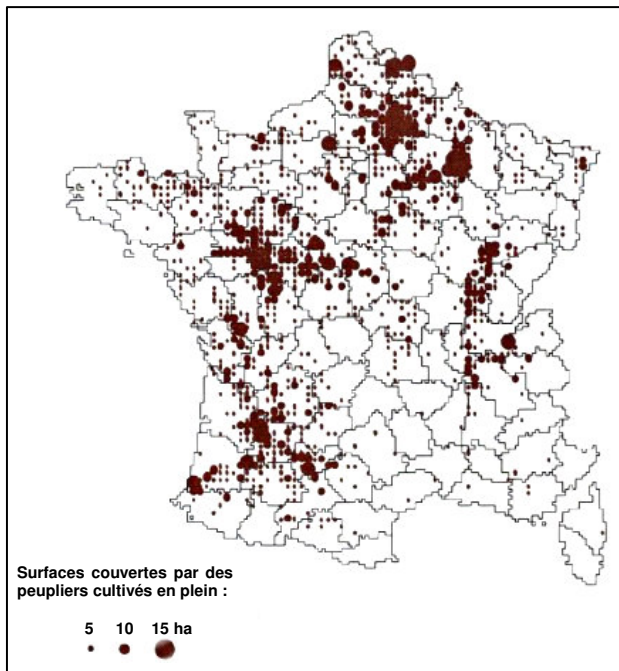


Figure 0.5. Répartition spatiale de la populiculture en France en 2000. (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche 2000).

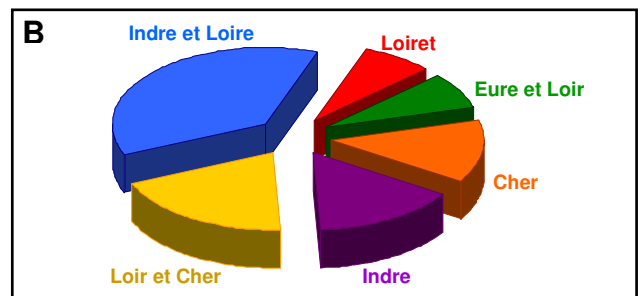
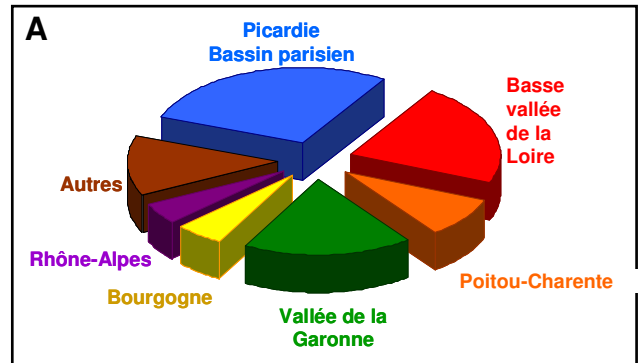


Figure 0.6. Répartition des peupleraies en France (A) et en région Centre (B). D'après Breton 2000.

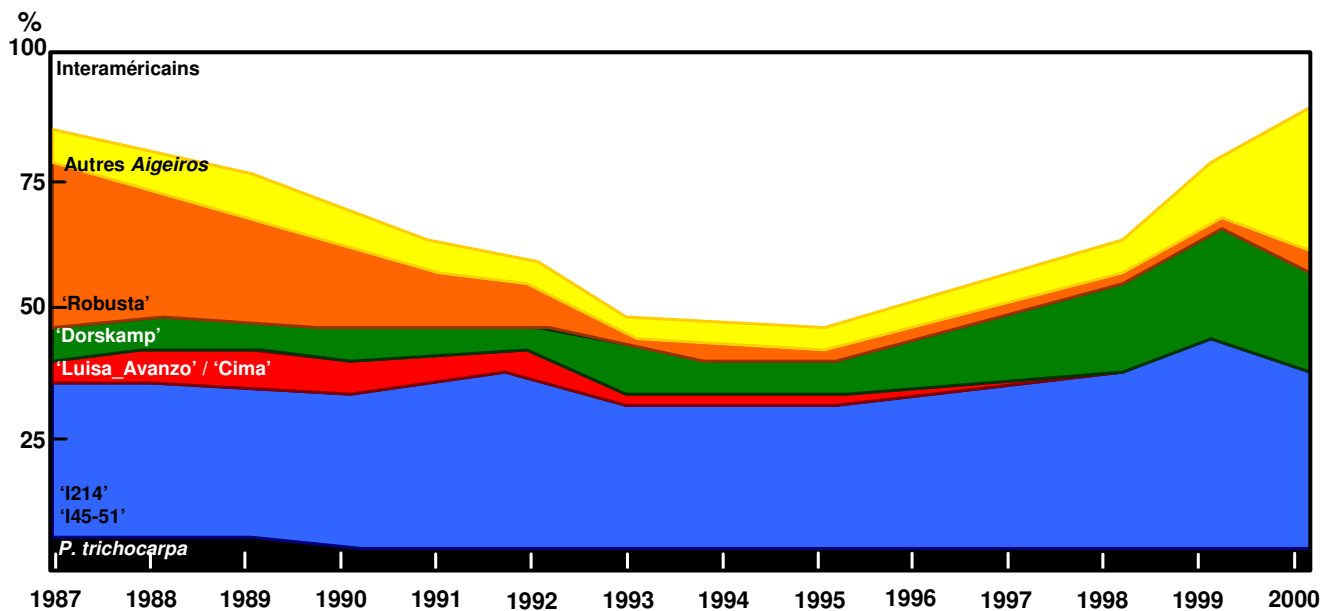


Figure 0.7. Évolution de l'importance relative des variétés de peupliers commercialisées en France entre 1987 et 2000. Les clones 'Robusta', 'Dorskamp', 'Luisa_Avanzo', 'Cima', '1214' et '145-51' appartiennent à l'espèce *P. x canadensis*, hybrides euraméricains issus de la section *Aigeiros*. D'après Breton 2000, Paillassa 2001 et Balzinger et Ginisty 2002.

augmentation de la proportion de cultivars euraméricains à croissance rapide, et en particulier du clone '**I214**', dans les peupleraies françaises au dépend des cultivars interaméricains qui, depuis 2000, ne sont déjà quasiment plus plantés (Thivolle-Cazat 2002). Après une baisse de plantation entre 1987 et 1997, les hybrides de peupliers euraméricains présentent un regain d'intérêt. Le croisement a permis d'associer les propriétés de croissance de la femelle, *P. deltoides*, aux faibles exigences de culture du mâle, *P. nigra*.

Problématique

Le peuplier occupe une place importante dans l'industrie du bois. Contrairement au chêne, essentiellement scié, 70 à 75 % du bois de peuplier sert au **déroulage** pour la fabrication d'allumettes, de contreplaqué et d'emballages légers, ces derniers constituant l'essentiel de l'utilisation du bois de peuplier (Figure 0.8). Les emballages légers sont confectionnés à 88 % à partir de bois de peuplier et la France en est le premier pays producteur. Le reste de la production de bois de peuplier est utilisée pour la production de pâte à papier et pour le **sciage**. Elle servira alors à confectionner des caisses, des palettes, des meubles, des poutres et des charpentes. Ces deux dernières utilisations demeurent néanmoins marginales depuis l'arrivée sur le marché du bois de résineux présentant des performances mécaniques nettement supérieures à celles du peuplier.

Afin de pouvoir répondre à la demande industrielle actuelle et à venir, les populteurs ont installé d'importantes surfaces de peupleraies dans des régions relativement peu populticoles telles que les basses vallées de la Loire et de la Garonne. Ces zones sont plus facilement soumises à des variations d'alimentation en eau que les zones alluviales. Or le peuplier est globalement sensible à la sécheresse et son niveau de productivité est très étroitement lié à la disponibilité en eau (Soulères 1992, Pinon et Valadon 1997). Le manque d'eau peut rapidement limiter la productivité et la qualité du bois et, de surcroît, favoriser l'installation de pathogènes (Marçais *et al.* 1993, Pinon et Valadon 1997). Il apparaît donc actuellement sur le marché un besoin de clones alliant productivité, qualité du bois et tolérance aux contraintes aussi bien biotiques qu'abiotiques.

Les peupliers, bien que globalement sensibles à la sécheresse, présentent une grande variabilité génotypique, d'une part, dans l'amplitude de la chute de productivité en réponse au manque d'eau et, d'autre part, dans les mécanismes physiologiques mis en œuvre en réponse au stress hydrique (Gebre *et al.* 1994, 1998, Liu et Dickmann 1996, Chen *et al.* 1997, Harvey et van den Driessche 1997, Robison et Raffa 1998, Tschaplinski *et al.* 1998, Brignolas *et al.* 2000) (Figure 0.9). Or, à ce jour, les liens entre les mécanismes physiologiques mis en œuvre par la plante durant la sécheresse et sa plus ou moins grande aptitude à résister au manque d'eau sont mal connus. Dans ce contexte, un des thèmes de recherche du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures – UPRES EA 1207 – de l'Université d'Orléans est l'étude des mécanismes physiologiques et

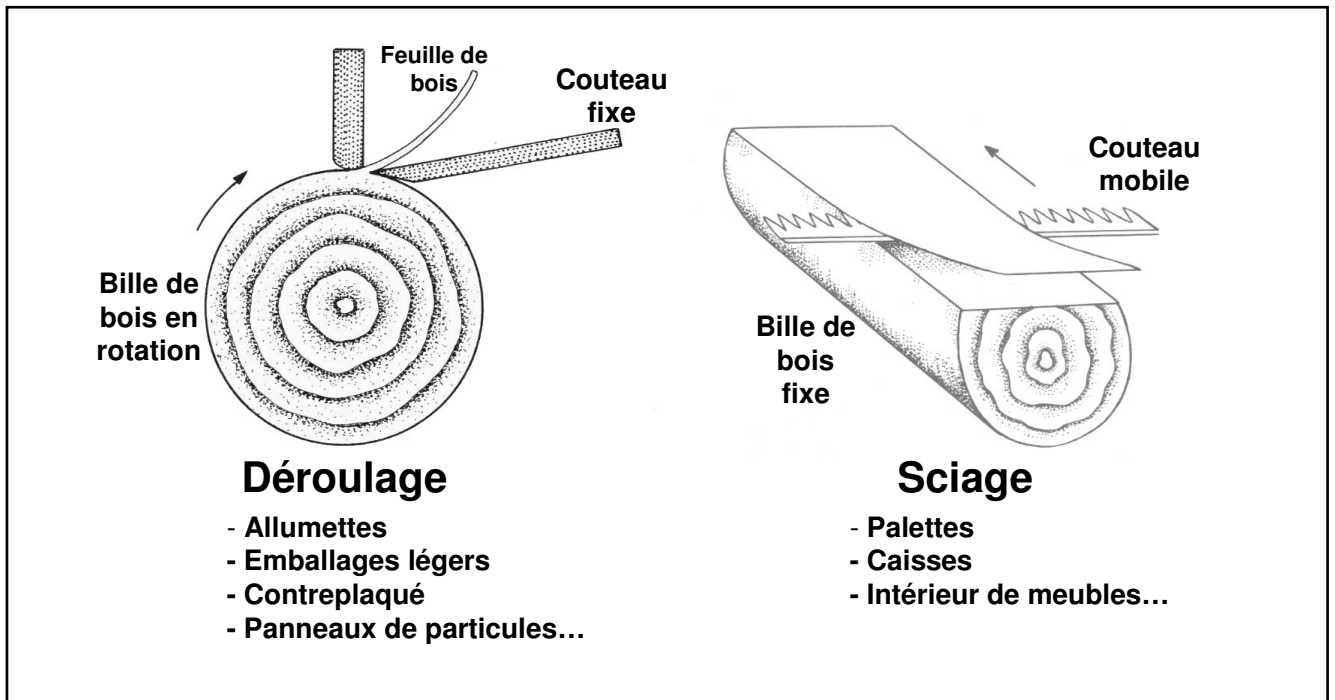


Figure 0.8. Principales utilisations du bois de peuplier. D'après Maisenbach 1969 et Altman 1999.

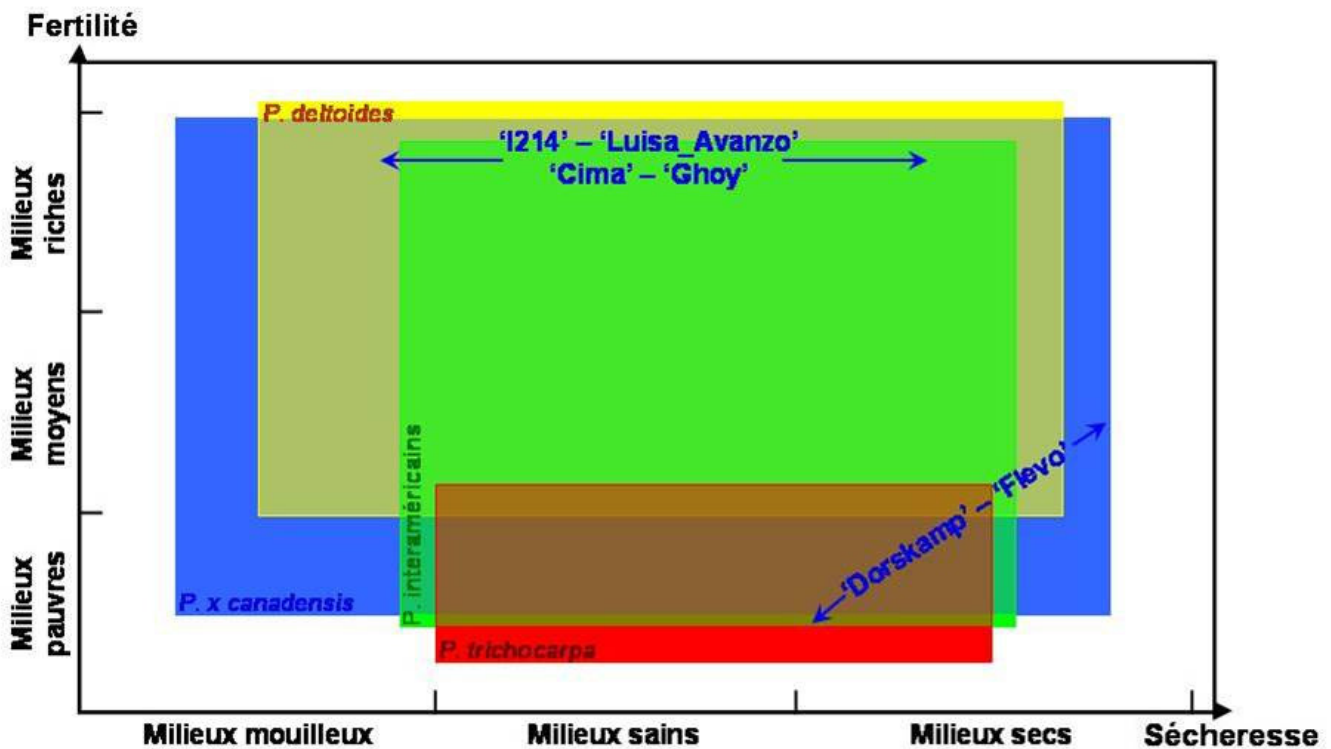


Figure 0.9. Aires d'utilisation des principaux groupes de peupliers (milieux naturels non modifiés). Les clones 'Flevo', 'Dorskamp', '1214', 'Luisa_Avanzo', 'Cima', et 'Ghoy' appartiennent à l'espèce *P. x canadensis*, hybrides euraméricains. D'après Soulères 1992.

moléculaires impliqués dans la réponse des végétaux ligneux à la sécheresse. Au sein du laboratoire, l'équipe d'Écophysiologie/Biochimie, en étroite collaboration avec le centre INRA de Nancy, poursuit deux objectifs majeurs : (i) sur le plan fondamental, elle s'intéresse à l'étude des mécanismes physiologiques dont dispose le peuplier pour faire face à la contrainte hydrique et, (ii), sur le plan appliqué, elle évalue la pertinence à utiliser certains paramètres en tant qu'indicateurs des niveaux de productivité et de tolérance à la sécheresse des clones de peuplier. Si certains de ces caractères s'avèrent, d'une part, être impliqués dans les mécanismes de tolérance à la sécheresse et, d'autre part, être indicateur des niveaux de tolérance et de productivité, ils seront alors qualifiés de déterminants. Ces déterminants potentiels sont recherchés au niveau de la feuille car c'est à ce niveau qu'ont lieu l'entrée de dioxyde de carbone (CO₂) nécessaire à la photosynthèse et la transpiration de l'eau, moteur de l'ascension de la sève brute dans la plante. Les mouvements de ces deux types de molécules entre la feuille et l'atmosphère sont régulés par les stomates dont la fermeture permet de limiter les pertes en eau en conditions de sécheresse mais réduit également l'entrée du CO₂. Cet antagonisme entre assimilation de carbone et économie de l'eau au niveau de la feuille rend cet organe particulièrement intéressant dans le cadre des études visant à associer la productivité à la tolérance à la sécheresse. La thématique est développée depuis 1998 à partir d'un modèle expérimental constitué de clones de peuplier euraméricain (*Populus x canadensis* (Moench)).

L'objectif majeur de notre thèse est la mise en évidence, au niveau de la feuille, de déterminants de productivité et de tolérance à la sécheresse au sein des hybrides euraméricains. Pour répondre à cet objectif, notre démarche s'est déroulée en trois phases : (i) étudier la réponse des peupliers euraméricains à la sécheresse en termes d'impact sur la physiologie de la feuille et d'analyse des mécanismes potentiellement impliqués dans la tolérance à la sécheresse, (ii) sur la base de ces observations, mettre en évidence des déterminants de productivité et de tolérance au manque d'eau au sein de l'espèce, (iii) valider les déterminants les plus pertinents en conditions de déficit hydrique. Ce mémoire sera divisé en trois chapitres correspondant à chacun de ces trois points.

Chapitre 1

Mécanismes impliqués dans la tolérance à la sécheresse

1. État des connaissances

Le stress hydrique est défini comme une baisse de la disponibilité de l'eau, se traduisant par une réduction de la croissance de la plante ou de sa reproduction par rapport au potentiel du génotype (Lamaze *et al.* 1995). Bien qu'il soit extrêmement difficile d'établir une chronologie précise de la réponse de la plante à la sécheresse, les mécanismes mis en œuvre peuvent être classés en trois catégories selon qu'ils entrent en jeu à court, moyen ou long terme durant la sécheresse.

Outre une altération de la balance hormonale, qui a sans doute un effet sur la croissance, les effets les plus précoces de la sécheresse sont une réduction de l'élongation cellulaire et une chute de la conductance stomatique (Blake *et al.* 1996, Socias *et al.* 1997). L'absorption d'eau par les cellules, moteur de la croissance, est liée à la différence de potentiel hydrique entre le xylème et les tissus en élongation et à la conductance des tissus pour l'eau. L'élongation cellulaire se produit lorsque l'entrée d'eau dans la cellule élève la pression de turgescence au dessus du seuil de déformation des parois. La baisse de croissance cellulaire en conditions de stress hydrique peut donc résulter d'une baisse de la turgescence, d'une diminution de l'extensibilité des parois, d'une réduction de la conductibilité hydraulique ou d'une augmentation du seuil de déformation des parois. L'importance relative de ces quatre paramètres pour expliquer la diminution d'élongation cellulaire est très variable (Passioura et Fry 1992). Il semble néanmoins que l'extensibilité des parois soit déterminante pour la croissance dans un grand nombre de situations (Cosgrove 1993). La fermeture des stomates est un processus rapide et flexible qui protège la plante des risques de cavitation du xylème lorsque l'eau du sol devient limitante (Blake *et al.* 1996, Harvey et van den Driessche 1997). Lorsque la demande évaporatrice de l'air est importante et l'eau du sol limitante, la tension responsable de l'ascension de l'eau dans

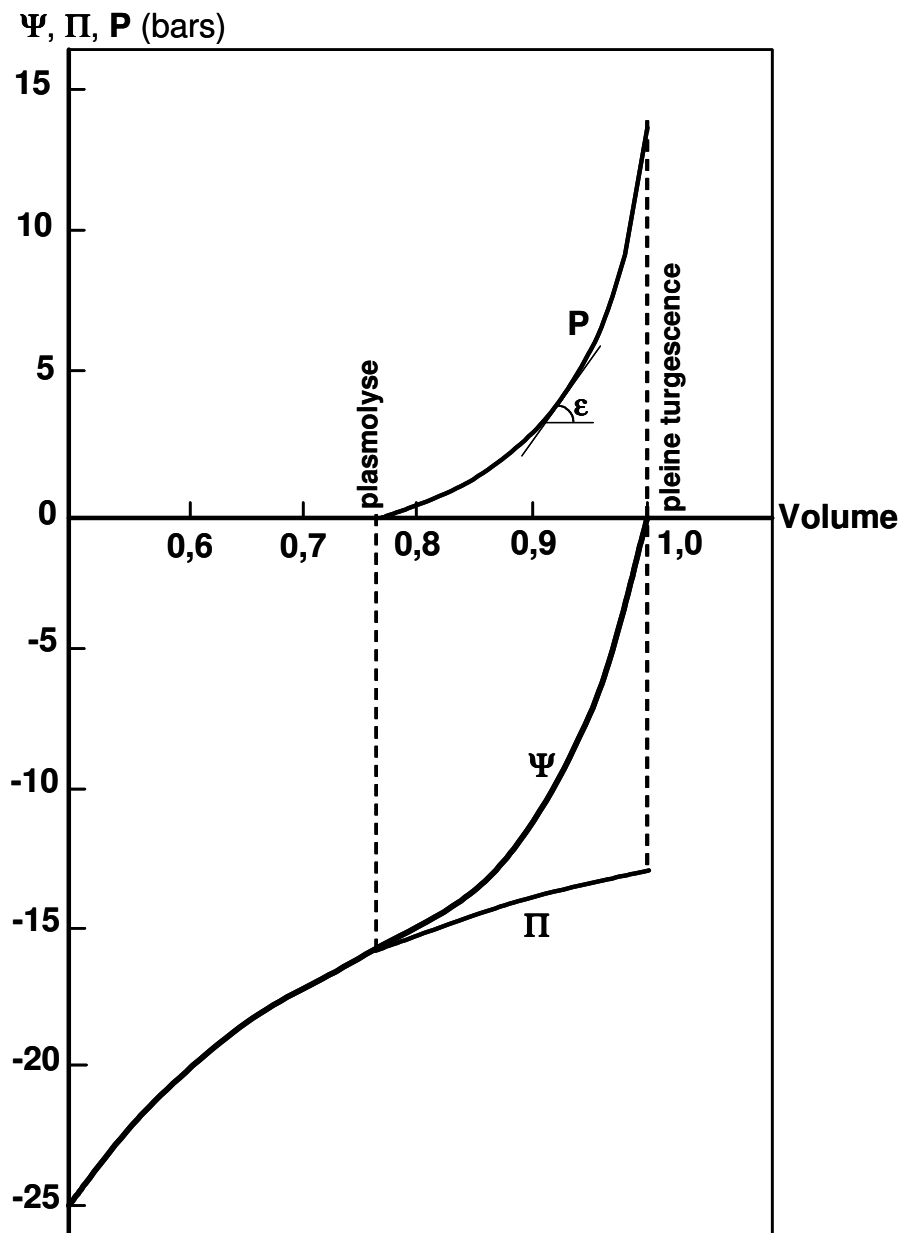


Figure 1.1. Diagramme de Höfler : relations « potentiel hydrique – volume » au niveau de la cellule végétale. Variations des deux composantes du potentiel hydrique (Ψ), la pression de turgescence (P) et la pression osmotique (Π), en fonction du volume cellulaire. Le module d'élasticité volumique (ϵ) correspond à la pente de la relation $P = f(V)$. D'après Cruiziat 1997.

la plante devient telle qu'elle peut causer une rupture de la cohésion de la colonne d'eau et mener au phénomène de cavitation puis d'embolie. La fermeture des stomates peut être induite par une augmentation de la teneur en acide abscissique (ABA) au voisinage des cellules de garde. Cette hormone est libérée par les racines, puis transportée par le flux de sève ascendant (Davies et Zhang 1991).

À moyen terme, un ajustement osmotique peut être détectable. Il a été défini comme un abaissement du potentiel osmotique, par accumulation de solutés ou en réduisant le volume cellulaire, en réponse à un stress salin ou hydrique (Nguyen et Lamant 1989, Lamaze *et al.* 1996). L'ajustement osmotique vise à maintenir un équilibre hydrique entre les réservoirs apo- et symplasmique de la feuille compatible avec un métabolisme fonctionnel (Hsiao *et al.* 1976, Clifford *et al.* 1998). La croissance cellulaire est principalement dépendante du potentiel hydrique (Ψ) dont les deux principales composantes sont le potentiel osmotique (Ψ_{Π}) et le potentiel de turgescence (Ψ_P) (Figure 1.1) (Cruiziat 1997). Dans la cellule vivante, Ψ_{Π} , grandeur négative, et Ψ_P , grandeur positive liée à la pression exercée par la paroi et la membrane sur le contenu cellulaire, s'opposent. Lorsque la cellule est à pleine turgescence, ces deux forces s'annulent ; le potentiel hydrique est nul. Par ailleurs, la plasmolyse correspond au moment où Ψ_P devient nul et où, par conséquent, le potentiel hydrique devient égal à Ψ_{Π} . Dans ce système, le module d'élasticité volumique (ϵ) a été défini comme le coefficient directeur de la relation $\Psi_P = f(V)$, où V est le volume cellulaire. Il détermine l'amplitude des variations de volume d'une cellule en réponse à une même variation de potentiel de turgescence : un grand ϵ entraînera une variation de volume moindre qu'un ϵ faible. Une forte élasticité correspond à un faible ϵ et vice versa. Autrement dit, une valeur importante de ϵ correspond à une paroi « rigide », un faible ϵ à une paroi « élastique » (Cruiziat 1997). En cas de sécheresse, l'abaissement du potentiel hydrique peut être dû à une diminution de Ψ_P ou à une diminution de Ψ_{Π} . Les solutés accumulés sont très variés et appartiennent à diverses familles biochimiques comme les acides aminés (proline, arginine, citrulline, ornithine...), les amides (glutamine et asparagine), les polyamines, les acides organiques (citrate, malate, lactate...), les oses, osides et ositols (saccharose, pinitol, sorbitol, mannitol, glycérol...), les amines quaternaires (bétaine) et les sels minéraux (K^+ , Na^+ , Cl^-). La proline et les hexoses contribuent néanmoins majoritairement à l'ajustement osmotique chez de nombreuses espèces (Irigoyen *et al.* 1992, Costa *et al.* 1998). Pour le peuplier,

l'oside préférentiellement accumulé en réponse à la contrainte hydrique est le saccharose (Gebre *et al.* 1994, Pelah *et al.* 1997, Sibout *et al.* 1998). Néanmoins, il a été montré que le glucose, le fructose et le *myo*-inositol contribuent également à l'ajustement osmotique pour *P. deltoides* et *P. nigra* (Gebre *et al.* 1994, Sibout *et al.* 1998).

À plus long terme, la sécheresse occasionne des changements physiologiques et anatomiques. Ces changements sont en partie la conséquence de la réduction de l'élongation cellulaire, effet immédiat du manque d'eau, mais résultent surtout d'une modification de l'allocation de carbone aux différents organes de la plante : les racines sont favorisées au dépend des feuilles et de la tige. Ce phénomène a pour conséquence une réduction de la surface foliaire de la plante, liée à une diminution de la taille individuelle et du nombre des feuilles, et une augmentation des rapports racines/tige et racines/feuillage (Roden *et al.* 1990, Metcalfe *et al.* 1990, Braatne *et al.* 1992, Khalil et Grace 1992, Liu et Dickmann 1993, Van Splunder *et al.* 1996, Chen *et al.* 1997, Ibrahim *et al.* 1997, Tschaplinski *et al.* 1998). Ces modifications présentent le double avantage d'améliorer l'absorption racinaire de l'eau et de réduire la surface transpirante et ainsi de limiter les risques de cavitation (Braatne *et al.* 1992, Tschaplinski *et al.* 1994). Afin de diminuer la surface transpirante pendant la sécheresse, trois phénomènes coexistent chez le peuplier : la perte des feuilles, la réduction de la taille individuelle des feuilles mises en place et la diminution du nombre de feuilles en croissance. En conditions naturelles, la chute des feuilles est couramment observée en conditions de sécheresse, notamment pour *P. trichocarpa* et *P. deltoides* (Cooper et Van Haverbeke 1990, DeBell 1990). Néanmoins la perte des feuilles est une stratégie radicale et, en réponse au manque d'eau, la plante commence par réduire sa croissance foliaire. Il a été montré que la réduction du nombre de feuilles dominait la réponse adaptative de la surface foliaire de la plante entière à la sécheresse (Ibrahim *et al.* 1997). Cependant, une réduction de la taille des feuilles et une coexistence des deux stratégies, réduction du nombre et de la taille individuelle des feuilles, ont également été observées pour le peuplier (Roden *et al.* 1990, Liu et Dickmann 1993). La diminution de taille des feuilles est due à des réductions conjointes de la division et de la croissance cellulaire (Dale 1988). Des modifications structurales des feuilles en réponse à la contrainte hydrique ont également été couramment observées. En effet, la sécheresse occasionne fréquemment une réduction de la surface massique des feuilles (SLA) due à une augmentation de leur densité (Witkowski et Lamont 1991, Groom et

Lamont 1997, Niinemets 2001, Marron *et al.* 2003). Cette augmentation de densité des feuilles est liée à un épaississement des parois cellulaires et à des cellules plus petites et plus serrées (Cutler *et al.* 1977, Krause et Kummerow 1977, Goryshina *et al.* 1979, Schulz 1984, Jones 1985, Niinemets 1999). Il semble que les espèces à faible SLA maintiennent plus efficacement leur statut hydrique lors de la contrainte, mais les bases physiologiques de cette relation sont mal connues (Nautiyal *et al.* 2002). L'effet néfaste ou bénéfique des variations de SLA durant la sécheresse semble être déterminé par l'origine des changements de densité. Si une accumulation de composés solubles est responsable de l'augmentation de densité des feuilles, l'ajustement du potentiel osmotique cellulaire permettra un meilleur maintien du potentiel hydrique (Cruiziat 1997) (Figure 1.1, page 24). Au contraire, si les modifications sont d'ordre structural, épaississement des parois par exemple, l'effet sera une augmentation du module d'élasticité volumique (ϵ) qui limitera les variations du volume cellulaire (Bowman et Roberts 1985, Irigoyen *et al.* 1992, Niinemets 2001, Marron *et al.* 2002, Marron *et al.* 2003).

Tous ces mécanismes ont pour but de limiter les pertes en eau et d'en favoriser l'absorption mais certains d'entre eux ont des conséquences néfastes auxquelles la plante doit également faire face. Une sécheresse légère réduit l'absorption de CO_2 que nécessite la photosynthèse à cause de la fermeture des stomates. Si la sécheresse se poursuit, une inhibition directe de la photosynthèse se produit. Dans les deux cas, le résultat est l'exposition du chloroplaste à un excès d'énergie d'excitation. Il existe plusieurs mécanismes de protection tels que les mouvements de feuille minimisant l'absorption lumineuse et la dissipation de chaleur *via* les caroténoïdes ou la photorespiration. L'excès d'énergie d'excitation non dissipé par les mécanismes de photoprotection est utilisé pour former l'anion superoxyde (O_2^-) et l'oxygène singulet. Ces formes activées de l'oxygène sont respectivement produites dans le chloroplaste par photoréduction de l'oxygène et par transfert d'énergie de la chlorophylle excitée vers l'oxygène. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) sont ensuite formés par des réductions successives de l'anion superoxyde, l'addition d'un électron supplémentaire à O_2^- menant à H_2O_2 , un troisième électron coupant O_2 en $\text{OH}\cdot$ (Smirnoff 1993, Mathews et van Holde 1996) (Tableau 1.I). Les formes réduites de l'oxygène sont de loin des espèces chimiques beaucoup plus réactives et potentiellement beaucoup plus toxiques pour les cellules et les tissus que l'oxygène lui-même. Ces molécules et radicaux dégradent les protéines et les

Tableau 1.I. Principales molécules toxiques dérivées de l'oxygène, actives dans la plante : oxygène singulet, anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle et radical perhydroxyle. D'après Buchanan *et al.* 2001.



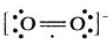
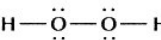

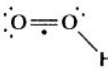
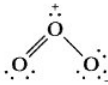
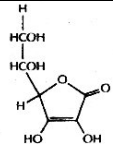
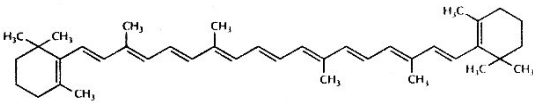
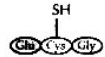
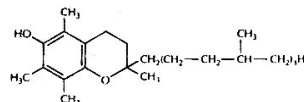
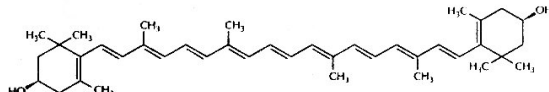
Composé	Abréviation	Représentation	Sources
Oxygène moléculaire (état triplet)	O ₂ ; ³ Σ	 $1s^2 2s^2 (\sigma_s)^2 (\sigma_s^*)^2 (\sigma_p)^2 (\pi_y)^2 (\pi_z)^2 (\pi_y^*)^1 (\pi_z^*)^1$	Forme la plus commune du dioxygène gazeux
Oxygène singulet (état excité)	¹ O ₂ ; ¹ Δ	 $1s^2 2s^2 (\sigma_s)^2 (\sigma_s^*)^2 (\sigma_p)^2 (\pi_y)^2 (\pi_z)^2 (\pi_y^*)^2$	Irradiation UV, Photoinhibition, Réactions de transfert d'e ⁻ du PS II (chloroplastes)
Anion superoxyde	O ₂ ⁻		Réactions de transfert d'e ⁻ mitochondriales, Réaction de Mehler chloroplastiques, Photorespiration glyoxysomale, Activité des peroxysomes, Oxydation du Paraquat, Fixation d'N, défense contre les pathogènes, Réaction de O ₃ et OH ⁻ dans l'apoplaste
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂		Photorespiration, β-oxydation, Décomposition de O ₂ ⁻ proton-induite, Défense contre les pathogènes
Radical hydroxyle	OH [•]		Décomposition de O ₃ en présence de protons dans les espaces apoplastiques, Défense contre les pathogènes
Radical perhydroxyle	O ₂ H [•]		Réaction de O ₃ et OH ⁻ dans les espaces apoplastiques
Ozone	O ₃		Décharge électrique ou radiation UV dans la stratosphère, Réactions impliquant les produits de combustion de fuels fossiles

Tableau 1.II. Localisation subcellulaire des enzymes antioxydantes. D'après Buchanan *et al.* 2001.

Enzyme antioxydante	Abréviation	Localisation
Ascorbate peroxydase	APX	Cytosol, Stroma du plastide, Membrane du plastide
Catalase	CAT	Cytosol, Glyoxysome, Peroxysome
Déshydroascorbate réductase	DHAR	Cytosol, Stroma du plastide, Nodules racinaires
Glutathion réductase	GR	Cytosol, Mitochondrie, Stroma du plastide, Nodules racinaires
Monodéshydroascorbate réductase	MDHAR	Stroma du plastide, Nodules racinaires
Superoxyde dismutase (associée à un cofacteur métallique)	Cu/Zn-SOD Mn-SOD Fe-SOD	Cytosol, Peroxysome, Plastide, Nodules racinaires Mitochondrie Plastide

Tableau 1.III. Localisation subcellulaire des principaux antioxydants. D'après Buchanan *et al.* 2001.

Composé	Représentation	Localisation
Ascorbate (vitamine C)		Apoplaste, Cytosol, Plastide, Vacuole
β-Carotène		Plastide
Glutathion réduit (GSH)		Cytosol, Plastide, Mitochondrie
Polyamines (ici la putrescine)	$H_2N(CH_2)_4NH_2$	Cytosol, Plastide, Mitochondrie, Noyau
α-Tocophérol (vitamine E)		Membrane cellulaire
Zéaxanthine		Chloroplaste

pigments, endommagent l'ADN, inactivent les enzymes contenant des groupements sulfhydryle et initient des processus de lipoperoxydation responsables d'une rigidification des membranes et d'une diminution de leur perméabilité (McKersie 1991). Pour lutter contre les formes activées de l'oxygène, la plante dispose de deux types de mécanismes de protection (Alscher *et al.* 1997) : (i) la voie de détoxification de Halliwell-Asada, un système d'origine enzymatique impliquant la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase, la déshydroascorbate réductase, la monodéshydroascorbate réductase et la glutathion réductase (Foyer *et al.* 1997) (Figure 1.2 et Tableau 1.II), (ii) un système d'origine non enzymatique faisant intervenir des molécules à caractère antioxydant telles que l'ascorbate, le glutathion, l' α -tocophérol, les caroténoïdes, des polyamines (spermine et spermidine), la proline et des composés phénoliques (Larson 1988, Halliwell et Gutteridge 1990, Smirnoff 1993, Foyer *et al.* 1994) (Tableau 1.III). L'étude des mécanismes permettant à la plante de tolérer la sécheresse, c'est-à-dire maintenir une production de biomasse durant la sécheresse tout en en minimisant les conséquences néfastes, doit donc englober l'étude des mécanismes mis en œuvre directement en réponse au manque d'eau (fermeture des stomates, ajustement osmotique, modifications morphologiques) et la faculté du végétal à protéger ses cellules des dommages oxydatifs consécutifs à ce stress.

La sécheresse est souvent associée à d'importantes élévations de température. La température est une variable écologique essentielle qui détermine pour une large part la distribution des végétaux et peut conditionner leur productivité (Trabaud et Méthy 1992). Les plantes ont généralement un optimum photosynthétique entre 20 et 30°C mais avec une amplitude pouvant s'étendre de 15 à 45°C suivant les températures qu'elles ont subies durant leur croissance et le type auquel elles appartiennent (C₃ ou C₄). Toutefois, une température de 50°C est généralement considérée comme limite pour l'activité photosynthétique des végétaux vasculaires (Berry et Björkman 1980, Saugier 1983). Le photosystème II est une des composantes de l'appareil photosynthétique les plus sensibles à un certain nombre de contraintes majeures de l'environnement, telles que les ultraviolets ou la chaleur (Trabaud et Méthy 1992, Schumaker *et al.* 1997). La réponse de l'assimilation du CO₂ à la pression partielle de CO₂ intercellulaire a été montré comme étant l'un des plus utiles outils diagnostiques dans l'étude de la photosynthèse (von Caemmerer 2000). En 1981, von Caemmerer et Farquhar ont établi des courbes de réponse

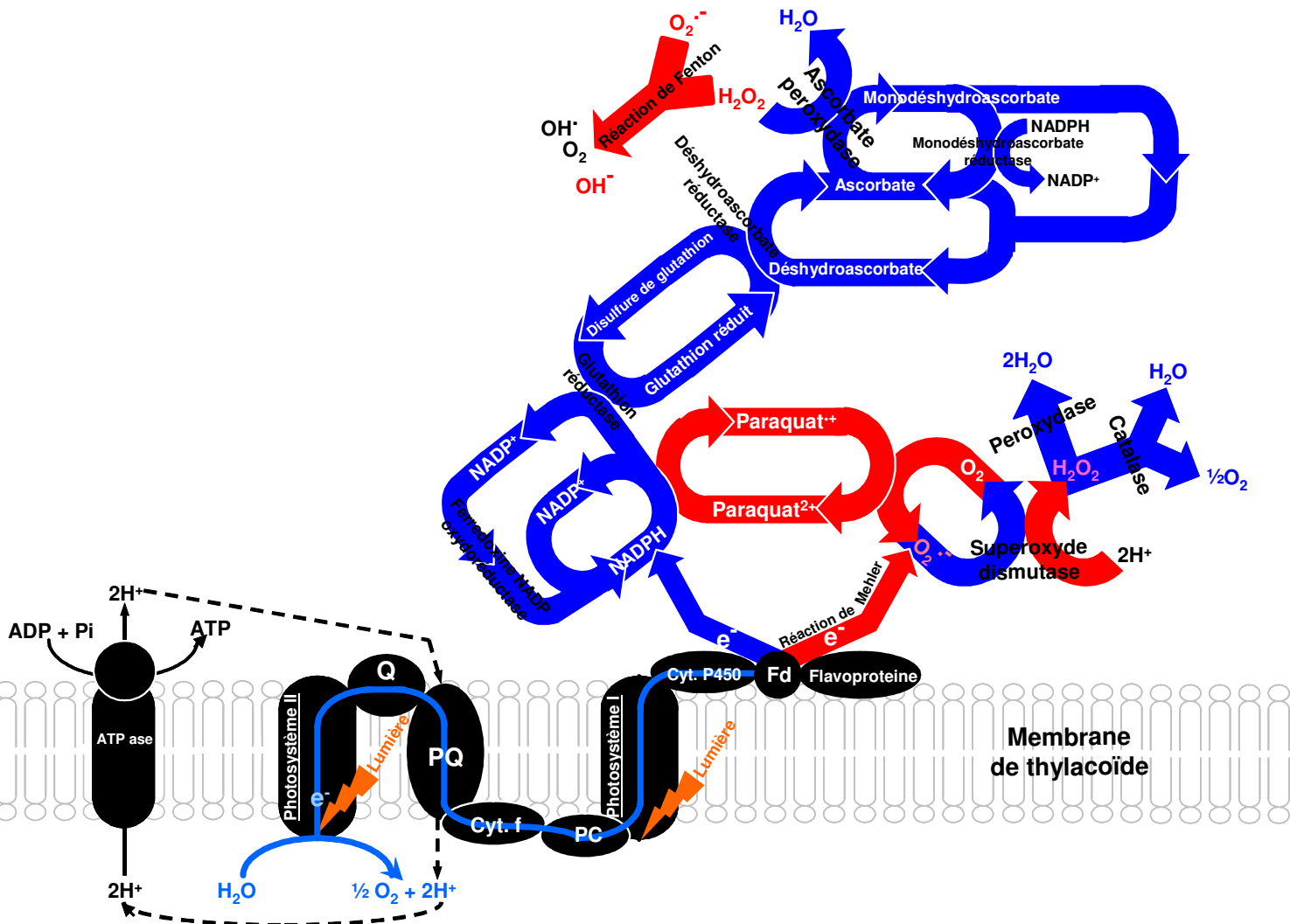


Figure 1.2. Représentation schématique de la voie de détoxification de Halliwell - Asada et mode d'action du Paraquat. **Fd** : Ferredoxine ; **PC** : Plastocyanine ; **PQ** : Plastoquinone ; **Q** : Quinone ; **Cyt.** : Cytochrome. D'après Smirnov 1993, Foyer *et al.* 1997 et Buchanan *et al.* 2001.

au CO₂ pour le haricot sous diverses perturbations environnementales et les ont utilisées pour tester des modèles de prédictions. La désactivation du photosystème II induite par la chaleur apparaît entraîner des désordres tels qu'une dénaturation de certaines protéines et une dissociation des pigments périphériques et du complexe du photosystème II. Ces altérations résultent de changements dans les interactions lipides-protéines associés à une augmentation de la fluidité des membranes des thylacoïdes à température élevée (Berry et Björkman 1980, Nash *et al.* 1985, Sundby *et al.* 1986, Thompson *et al.* 1989). La thermostabilité de l'appareil photosynthétique est l'une des caractéristiques de la thermotolérance qui peut être estimée par un suivi de la fluorescence de base de la chlorophylle *a* (F₀). Une augmentation brutale de F₀ en réponse à une augmentation graduelle de la température (1°C min⁻¹) traduit des dégradations irréversibles de l'appareil photosynthétique (Bilger *et al.* 1987, Epron 1997).

L'étude des mécanismes impliqués dans la réponse à la sécheresse des peupliers euraméricains a été entreprise depuis 1998 par l'équipe d'Écophysiologie/Biochimie du LBLGC à partir de deux clones, 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp', connus pour présenter des comportements tranchés en conditions de sécheresse. Le clone 'Dorskamp' a été sélectionné en 1952 en Hollande, à Dorskamp (Wageningen). Les premières plantations du clone 'Dorskamp' en Maine et Loire et en Indre et Loire datent de 1973 mais son inscription au catalogue français des cultivars commercialisables n'est effective que depuis 1974. Le clone 'Luisa_Avanzo', anciennement appelé Giorgione, a été expérimenté en Italie (Institut de Populiculture de Casale Monferrato) par le professeur Avanzo à partir de 1968 et est utilisé en France depuis 1987. Le choix de ces clones par le laboratoire dans le cadre de l'étude de la réponse des peupliers à la sécheresse a été conditionné par des observations réalisées en forêt sur arbres adultes par les forestiers. Contrairement au clone 'Dorskamp', la croissance du clone 'Luisa_Avanzo' est limitée par les sols riches en argile, pauvres en nutriments ou pour lesquels l'alimentation en eau est excessive, insuffisante ou variable (Terrasson 1988, Soulères 1992). Des études menées par l'équipe avaient déjà mis en évidence des différences dans le comportement des boutures des deux clones en réponse à la sécheresse. Il a été montré que le clone 'Luisa_Avanzo' présentait des vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles supérieures à celles du clone 'Dorskamp' lorsque l'eau n'était pas limitante. Cependant, soumis à une sécheresse dont l'intensité est équivalente pour les deux clones, la croissance du clone 'Luisa_Avanzo' était plus affectée

que celle du clone 'Dorskamp' (Brignolas *et al.* 2000). En 2000, les objectifs de notre DEA, effectué au sein de l'équipe, étaient de juger de l'impact d'un cycle sécheresse/ré-arrosage sur le statut hydrique, la croissance, la structure, estimée *via* les SLA, l'ajustement osmotique et les capacités antioxydantes des feuilles des deux clones. Cette étude a été publiée en juillet 2002 dans la revue *Tree Physiology* (Annexe 1). En conditions non limitantes en eau, les feuilles mises en place plus rapidement par le clone 'Luisa_Avanzo' se sont avérées moins denses et/ou moins épaisses que celles du clone 'Dorskamp', présentaient des teneurs par unité de surface moindres en chlorophylles et en sucres solubles et une activité antioxydante plus faible. En conditions limitantes en eau, la croissance foliaire des deux clones était réduite. Cependant la réponse des deux cultivars au manque d'eau différait à plusieurs niveaux. La fermeture des stomates était plus précoce pour le clone 'Luisa_Avanzo' que pour le clone 'Dorskamp'. De plus, seul le clone 'Dorskamp' présentait une importante synthèse de sucres solubles durant la sécheresse. Enfin, tous les paramètres foliaires étudiés et leur modulation par le manque d'eau puis par le ré-arrosage étaient très dépendants de l'âge des feuilles considérées. L'expérience comportait néanmoins deux limites majeures. D'abord, la croissance des clones présentait au cours de l'expérience de fortes variations indépendantes de la contrainte. Ensuite, et bien que les deux clones aient été soumis à la même intensité de contrainte, les feuilles du clone 'Luisa_Avanzo' présentaient un RWC plus faible que celles du clone 'Dorskamp', limitant de ce fait nos interprétations quant aux capacités antioxydantes comparées des deux clones. Afin de combler ces lacunes et de poursuivre la comparaison des clones 'Luisa_Avanzo'/'Dorskamp', trois séries d'expériences ont été menées : (1) une caractérisation des capacités photosynthétiques et de la thermotolérance des feuilles des deux cultivars, (2) l'étude de l'impact, au niveau des feuilles, d'une succession de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage sur le statut hydrique, la croissance, la structure, l'ajustement osmotique et les systèmes enzymatiques et non enzymatiques de détoxification des formes activées de l'oxygène, et, enfin, (3) l'estimation de leur tolérance à un stress oxydatif généré artificiellement par un herbicide, le Paraquat, et l'impact d'une sécheresse préalable sur cette tolérance. Tous les caractères foliaires étudiés dans le cadre de ces expériences ont été analysés en fonction de l'âge des feuilles. Les aspects de croissance et de structure foliaires du point 2 font l'objet de notre deuxième publication dans la revue *Tree Physiology* (Marron *et al.* 2003).

2. Capacités photosynthétiques et thermotolérance

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel végétal

L'expérience a été réalisée au sein du centre INRA de Nancy. Des boutures ligneuses de 6 mois provenant de tiges âgées de 2 ans des clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' ont été utilisées. En mars 2001, 10 boutures racinées âgées de 1 mois de chaque clone ont été rempotées en pots de 4 litres avec un mélange de tourbe blonde et de sable (3/7, v/v) et fertilisées avec un fertilisant à diffusion lente (N/P/K, 1/1/1) (Nutricote, Puteaux SA, Les Clayes sous Bois). Toutes les boutures ont été placées dans une serre exposée à la lumière naturelle et ont été arrosées manuellement tous les 2 jours. En septembre 2001, les feuilles de chaque bouture ont été numérotées de l'apex (Index Foliaire, FI = 0) vers la base (FI = n) de la tige. Les index de plastochrone foliaires (Leaf Plastochron Index = LPI), indicateurs de l'âge des feuilles, ont été calculés à partir de la formule d'Erickson et Michellini (1957) : $LPI = FI + [(\log L_0 - \log 20) / (\log L_0 - \log L_{-1})]$ où L_0 est la longueur du limbe en millimètres de la feuille indexée « 0 » (≥ 20 mm) et L_{-1} est la longueur du limbe en millimètres de la feuille « -1 », située au dessus de la feuille « 0 » et mesurant moins de 20 mm de long. Cinq boutures de chaque clone ont été utilisées pour les mesures de thermotolérance, les cinq autres servant aux estimations de capacités photosynthétiques. Une semaine avant le début des mesures, les boutures étaient acclimatées en chambre climatisée à 20°C. La teneur relative en chlorophylles de chaque feuille utilisée dans les expériences a été évaluée avec un SPAD-502 (Chlorophyll meter SPAD-502, Minolta). Les surfaces foliaires ont été calculées selon $\log S = a \log X$, où S est la surface de la feuille, X, sa largeur mesurée manuellement et a, un coefficient respectivement égal à 1,73 et 1,81 pour les clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' (Brignolas *et al.* 2000). Les SLA ont été calculées d'après la relation $SLA = S / MS$, où MS est la masse sèche de la feuille placée 24 heures à 75°C.

2.1.2. Estimation de la thermotolérance

Des courbes de réponse de la fluorescence de base (F_0) à une augmentation de température ont été établies. Les boutures étaient placées 12 heures à l'obscurité avant les mesures. Pour 13 rangs de feuille par bouture ($0 < LPI < 27$), des disques foliaires de 16

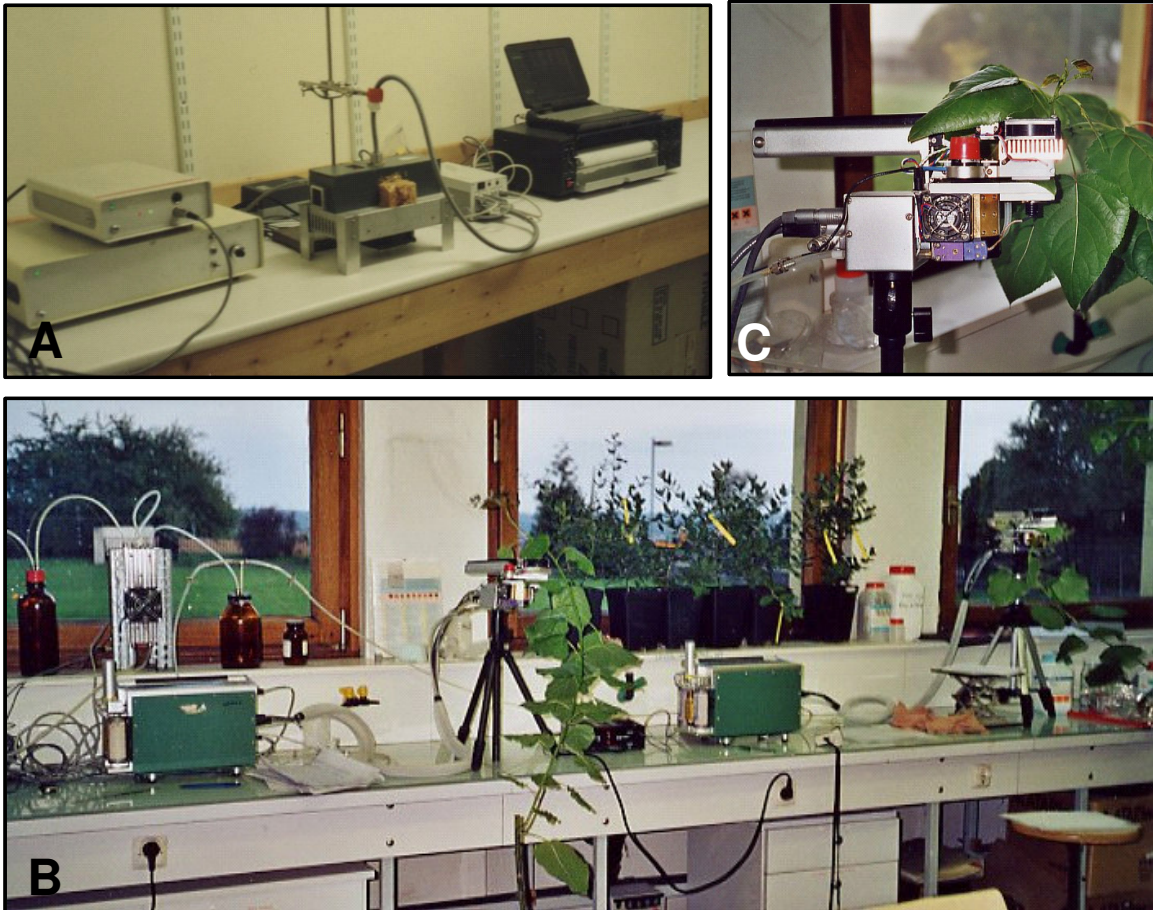


Figure 1.3. Système d'estimation de la thermotolérance (A), montage de deux LiCor 6400 analysant simultanément les clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' (B) et tête sensorielle/IRGA à l'œuvre avec le clone 'Luisa_Avanzo' (C) à l'INRA de Champenoux (Meurthe-et-Moselle).

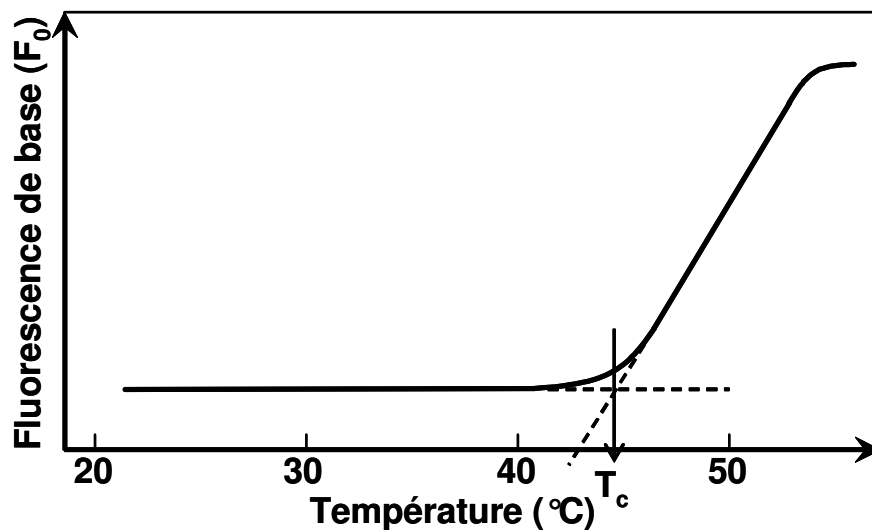


Figure 1.4. Principe de la méthode de détermination de la température critique. La fluorescence de base de la chlorophylle *a*, F_0 , est suivie durant une cinétique d'augmentation régulière de la température de 1°C par minute. La température à laquelle la fluorescence augmente brutalement est la température critique (T_c). Elle traduit la désorganisation de la photochimie et l'apparition de dégradations irréversibles de l'appareil photochimique. D'après Bilger *et al.* 1987.

mm de diamètre ont été confectionnés, placés dans une enceinte en aluminium et soumis à une augmentation graduelle de la température de 1°C par minute de 20 à 60°C (Figure 1.3, A). La température critique pour la stabilité de la photochimie (T_C) était définie comme la valeur extrapolée de l'origine de la brutale augmentation de F_0 (Bilger *et al.* 1987) (Figure 1.4).

2.1.3. Estimation des capacités photosynthétiques

La réponse de l'assimilation nette de CO_2 à la pression partielle de CO_2 (C_a) a été déterminée avec un LiCor 6400 (LiCor, Lincoln, Nebraska, USA) pour 11 rangs de feuilles par bouture (Figure 1.3, B et C). Les feuilles ont été insérées dans la chambre de mesure et la photosynthèse a été induite durant 20 minutes à 25°C sous une pression partielle (C_a) de 35 Pa et pour une densité de flux de photons (PFD) de 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. C_a a ensuite été élevée à 175 Pa, puis graduellement réduite jusqu'à 5 Pa en 12 points de mesure. À chaque point, l'assimilation nette de CO_2 (A), la conductance stomatique (g_w) et la pression partielle de CO_2 estimée dans les cavités sous stomatiques (C_i) ont été enregistrés après stabilisation. Chaque point a consisté en 3 répétitions à 1 minute d'intervalle pour s'assurer de la stabilité de la mesure. À la fin de chaque courbe de réponse, la lumière a été éteinte et la respiration due aux phosphorylations oxydatives (R_d) a été mesurée sous une pression partielle de CO_2 de 35 Pa après 5 minutes de stabilisation (Figure 1.5). La vitesse de carboxylation maximale (V_{cmax}) et le flux maximal d'électrons (J_{max}) ont été estimés par ajustement du modèle de Farquhar aux courbes A- C_i (Dreyer *et al.* 2001) (Figure 1.6). Les feuilles analysées ont été prélevées, séchées 24 heures à 75°C et broyées. Leurs teneurs totales en azote et en carbone ont été déterminées à partir de 1,5 mg de poudre à l'aide d'un analyseur élémentaire (2500 NCS, ThermoQuest, Finnigan CE Instruments, Courtaboeuf) et exprimées en mg g_{MS}^{-1} et en g m^{-2} de surface foliaire.

2.1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques du chapitre 1 ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Software). Les moyennes sont exprimées avec leurs erreurs standard et comparées par analyse de variance (ANOVA). Pour les comparaisons multiples, les regroupements ont été effectués à l'aide du test de Student, Newman et Keuls (SNK) dans le cas où le nombre de répétitions était constant, à l'aide du test de Scheffé dans le cas contraire. Les comparaisons de moyennes dans le temps ont été effectuées en utilisant la

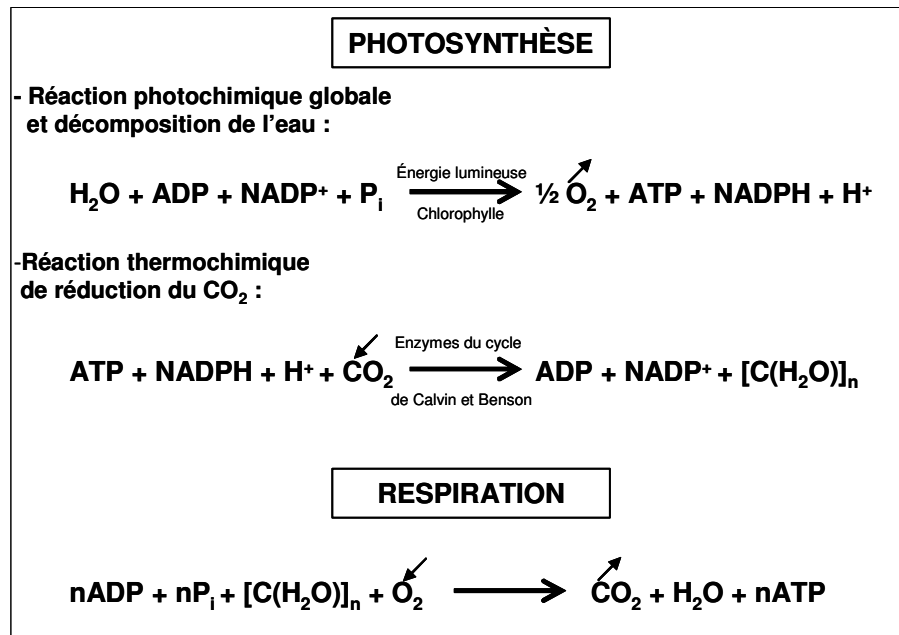


Figure 1.5. Équations globales décrivant la photosynthèse et la respiration. La respiration est présentée dans le cas d'un substrat organique. **ADP** : Adénosine diphosphate ; **ATP** : Adénosine triphosphate ; **[C(H₂O)]_n** : composé carboné (typiquement le glucose, C₆H₁₂O₆) ; **CO₂** : dioxyde de carbone ; **H⁺** : proton ; **H₂O** : eau ; **NADP** : Nicotinamide diphosphate ; **O₂** : dioxygène ; **P_i** : Phosphate inorganique. D'après Laval-Martin et Mazliak 1995.

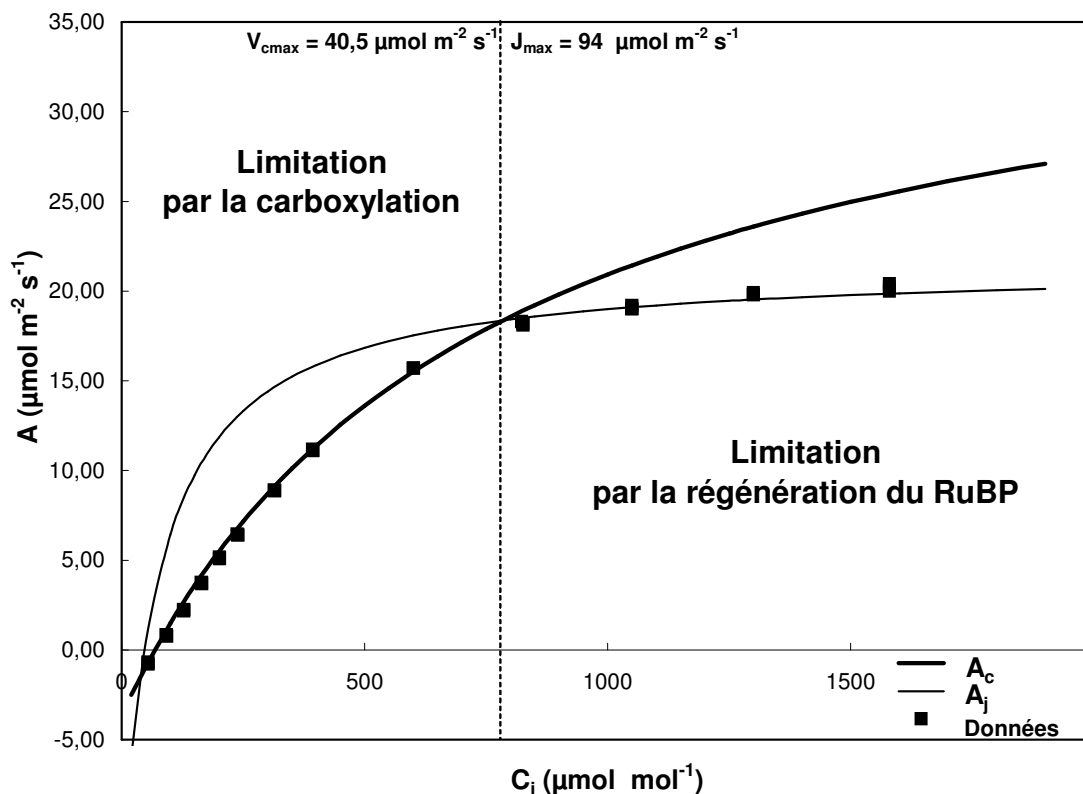


Figure 1.6. Réponse de l'assimilation de CO₂ (A) à une augmentation de la concentration sous-stomatique en CO₂ (C_i) pour une feuille d'index foliaire 4 du clone 'Luisa_Avanzo'. V_{cmax} (vitesse maximale de carboxylation) et J_{max} (flux maximal d'électrons) ont été estimés par ajustement du modèle de Farquhar aux courbes A-C_i (Le Roux *et al.* 1999, Dreyer *et al.* 2001). **A_c** : Assimilation limitée par la carboxylation ; **A_j** : Assimilation limitée par la régénération du RuBP.

procédure Modèle Linéaire Général (GLM) pour mesures répétée (Split Plot in Time). Quand les paramètres sont exprimés en fonction de l'index foliaire ou du LPI, les ANOVA ont été réalisées dans des portions linéaires des relations variable/LPI ou variable/index foliaire et l'index foliaire ou le LPI a été inclus dans le modèle statistique comme covariable. Les relations entre les paramètres ont été testées en utilisant des corrélations linéaires (coefficient de Pearson) et les relations entre l'index foliaire et les paramètres, en utilisant des corrélations de rang (coefficient de Spearman). Les résultats sont représentés comme significatifs lorsque les valeurs de *P* sont inférieures ou égales à 5 % (*), à 1 % (**) et à 1 ‰ (***).

2.2. Résultats

2.2.1. Thermotolérance

Les surfaces individuelles, les SLA, les teneurs surfaciques en chlorophylles et les valeurs de température critique (T_C) des feuilles étaient nettement dépendantes de la position des feuilles sur la tige des boutures des deux clones (Figure 1.7 et Tableau 1.IV). L'évolution des surfaces foliaires le long de la tige était marquée par deux phases (Figure 1.7, A). Jusqu'aux LPI proches de 10, la surface des feuilles augmentait, reflétant l'étalement des feuilles. Les feuilles de LPI proches de 10 présentaient une surface maximale le long de la tige, probablement révélatrice de la fin de la phase de croissance. Pour des LPI supérieurs à 10, la surface des feuilles diminuait, indiquant clairement la mise en place de feuilles de plus en plus grandes par la plante. La SLA augmentait au cours de la phase de croissance de la feuille puis diminuait pendant la phase adulte (Figure 1.7, B). Les teneurs en chlorophylles augmentait durant l'étalement des feuilles puis se stabilisaient une fois la phase de croissance achevée (Figure 1.7, C). La température critique variait de 43 à 47°C le long de la tige des boutures (Figure 1.7, D). Les feuilles en croissance présentaient la température critique la plus basse. Dès la phase de croissance terminée, la température critique augmentait avec le vieillissement des feuilles.

Les feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ne différaient ni par leur surface, ni par leur température critique. Néanmoins, dans cette expérience, les feuilles du clone 'Dorskamp' avaient des SLA et des teneurs en chlorophylles par unité de surface significativement supérieures à celles du clone 'Luisa_Avanzo'.

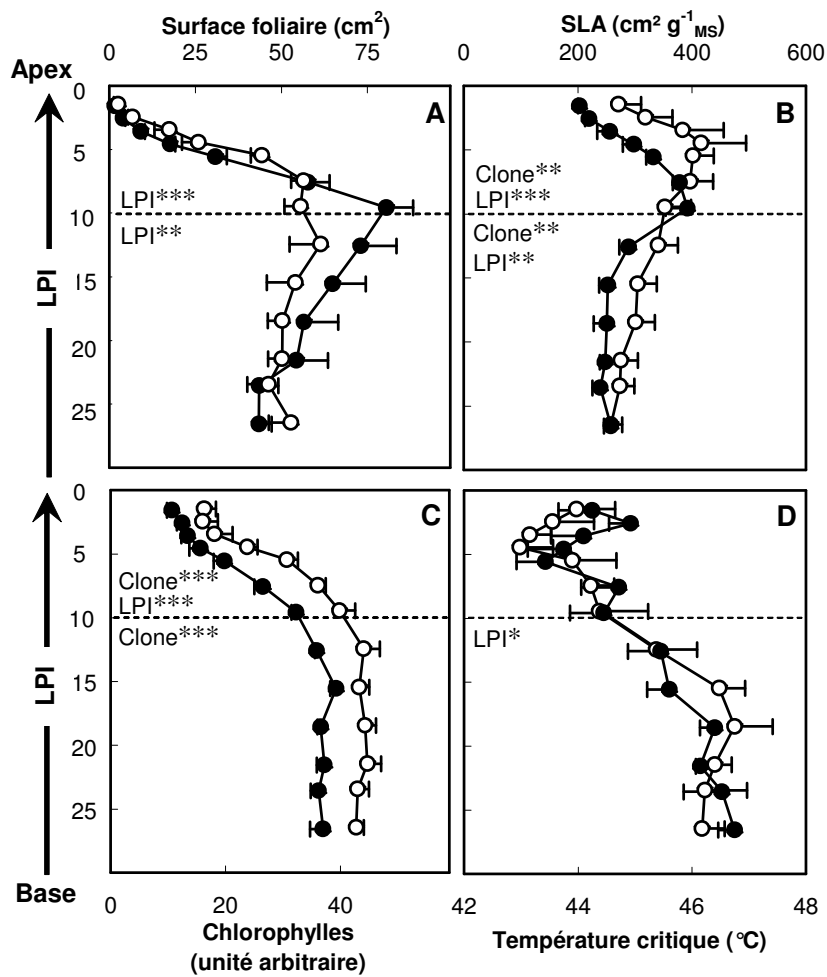


Figure 1.7. Effet de l'âge des feuilles des clones 'Dorskamp' (blanc) et 'Luisa_Avanzo' (noir) sur leur surface (A), leur SLA (B), leur teneur surfacique en chlorophylles (C) et leur température critique (D). Les feuilles sont indexées du sommet vers la base de la tige. Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 5 mesures. Les différences significatives entre clones et entre LPI sont indiquées, d'une part pour les LPI inférieurs à 10 et, d'autre part, pour les LPI supérieurs à 10, par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$.

2.2.2. Capacités photosynthétiques

V_{cmax} , J_{max} , R_d et les teneurs en chlorophylles, en azote et en carbone des deux clones étaient significativement liées à la position des feuilles sur la tige (Figure 1.8). Comme pour l'expérience précédente, l'évolution de ces paramètres le long de la tige des boutures des deux clones était marquée par deux phases correspondant à l'étalement des feuilles, jusqu'aux LPI proches de 10, puis à leur vieillissement, au-delà. Durant la phase de croissance foliaire, comprise entre LPI 0 et 10, J_{max} , V_{cmax} et les teneurs en chlorophylles par unité de surface augmentaient (Figure 1.8, A, B et E). Au contraire, R_d , les teneurs en azote et les teneurs en carbone par unité de masse sèche diminuaient durant l'expansion des feuilles (Figure 1.8, C, F, G et I). Durant la phase adulte, au-delà de LPI 10, tous ces paramètres se stabilisaient, à l'exception de V_{cmax} et des teneurs en azote par unité de masse qui déclinaient avec le vieillissement des feuilles.

Quel que soit leur stade de développement, les feuilles du clone 'Luisa_Avanzo' avaient des SLA supérieures et des teneurs en carbone par unité de surface inférieures à celles du clone 'Dorskamp' (Figure 1.8, D et H). Les feuilles en croissance du clone 'Luisa_Avanzo' montraient une respiration et des teneurs en azote et en carbone par unité de masse sèche plus élevées que celles du clone 'Dorskamp'. Les feuilles en croissance de ce dernier étaient cependant plus riches en chlorophylles. Les valeurs de J_{max} , V_{cmax} et R_d des feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo' étaient supérieures à celles du clone 'Dorskamp'.

V_{cmax} et J_{max} étaient très significativement corrélés entre eux pour les deux clones (Tableau 1.IV). Les capacités photosynthétiques des deux clones, qu'il s'agisse de V_{cmax} ou de J_{max} , étaient significativement et positivement corrélées aux teneurs en chlorophylles. Ces teneurs étaient, en revanche, négativement liées à la respiration. Parmi les paramètres descriptifs des capacités photosynthétiques, seul V_{cmax} était négativement corrélée à la respiration.

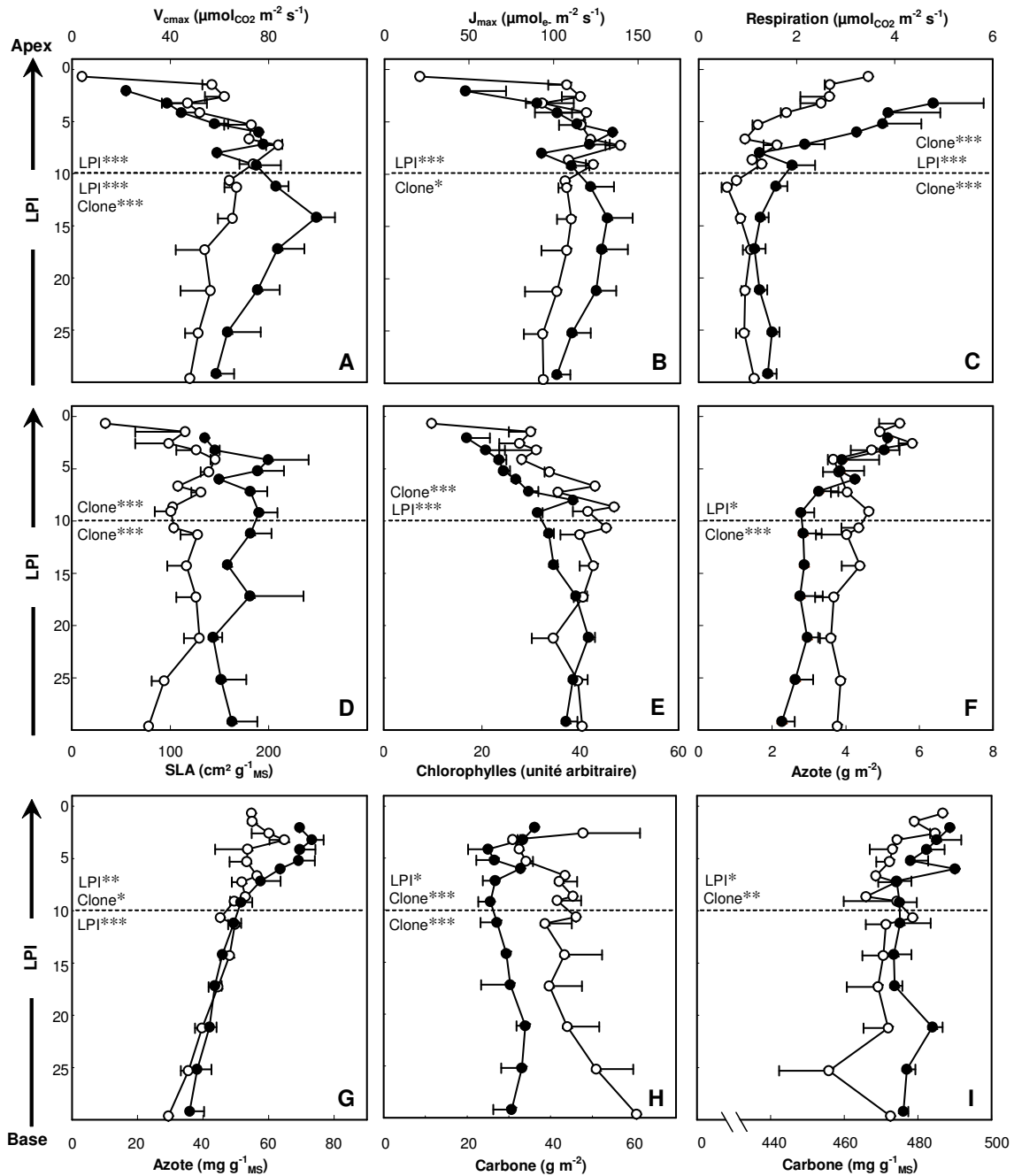


Figure 1.8. Effet de l'âge des feuilles des clones 'Dorskamp' (blanc) et 'Luisa_Avanzo' (noir) sur leur vitesse maximale de carboxylation, V_{cmax} (A), leur flux maximal d'électrons, J_{max} (B), leur respiration (C), leur SLA (D), leur teneur surfacique en chlorophylles (E) et leur teneur en azote et en carbone par unité de surface foliaire (F et H) et de masse sèche de feuilles (G et I). Les feuilles sont indexées du sommet vers la base de la tige. Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 5 mesures. Les différences significatives entre clones et entre LPI sont indiquées, d'une part pour les LPI inférieurs à 10 et, d'autre part, pour les LPI supérieurs à 10, par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$.

Tableau 1.IV. Corrélations linéaires (coefficients de Pearson) entre les paramètres descriptifs de la thermotolérance (température critique, T_C) des capacités photosynthétiques (vitesse maximale de carboxylation, V_{cmax} , flux maximal d'électrons, J_{max}), de respiration (dark respiration, R_d), de structure (SLA, teneurs surfaciques et massiques en azote, N_A , N_M , et en carbone, C_A , C_M), les teneurs surfaciques en chlorophylles (Chl_A) des feuilles et leur LPI pour 'Dorskamp' (gras) et 'Luisa_Avanzo' (normal). Les corrélations significatives sont indiquées par des astérisques : * = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$ et *** = $P \leq 0,001$.

		'Dorskamp'										
		Thermotolérance			Capacités photosynthétiques							
		T_C	LPI	SLA	Chl_A	V_{cmax}	J_{max}	R_d	N_A	N_M	C_A	C_M
'Luisa_Avanzo'	Thermotolérance	T_C	0,72 ***	-0,51 ***	0,68 ***	0,21	0,1	-0,74 **	-0,69 *	-0,64 *	0,35	-0,59 *
	Capacités photosynthétiques	LPI	0,70 ***	0,09	-0,42 **	0,07	0,09	0,63 ***	0,37 **	0,47 **	0,69 **	-0,61 **
		SLA	-0,22	0,18	-0,18	0,13	0,17	-0,14	-0,65 ***	-0,17	-0,86 ***	-0,31
		Chl_A	0,67 ***	-0,78 ***	-0,16	0,46 **	0,40 *	-0,65 ***	-0,05	-0,26	0,41	-0,65 **
		V_{cmax}	0,61	-0,28	-0,06	0,65 ***	0,95 ***	-0,39 *	0,17	0,01	-0,15	-0,32
		J_{max}	0,52	-0,24	-0,16	0,53 ***	0,91 ***	-0,14	0,20	-0,03	-0,29	-0,32
		R_d	-0,87 **	0,59 ***	-0,14	-0,82 ***	-0,61 ***	-0,31	0,28	0,47 **	-0,27	0,70 **
		N_A	-0,80 **	0,59 ***	-0,54 **	-0,58 ***	-0,32	-0,08	0,81 ***	0,38 *	0,08	0,50 *
		N_M	-0,93 ***	0,84 ***	0,10	-0,79 ***	-0,40 *	-0,30	0,76 ***	0,76 ***	-0,54 *	0,41
		C_A	0,21	0,20	-0,95 ***	-0,02	-0,34	-0,38	-0,10	0,36	0,02	-0,14
C_M	-0,46	-0,43	-0,58 *	-0,56 *	-0,61 *	-0,44	-0,60 *	0,79 ***	0,63 *	0,60 *		

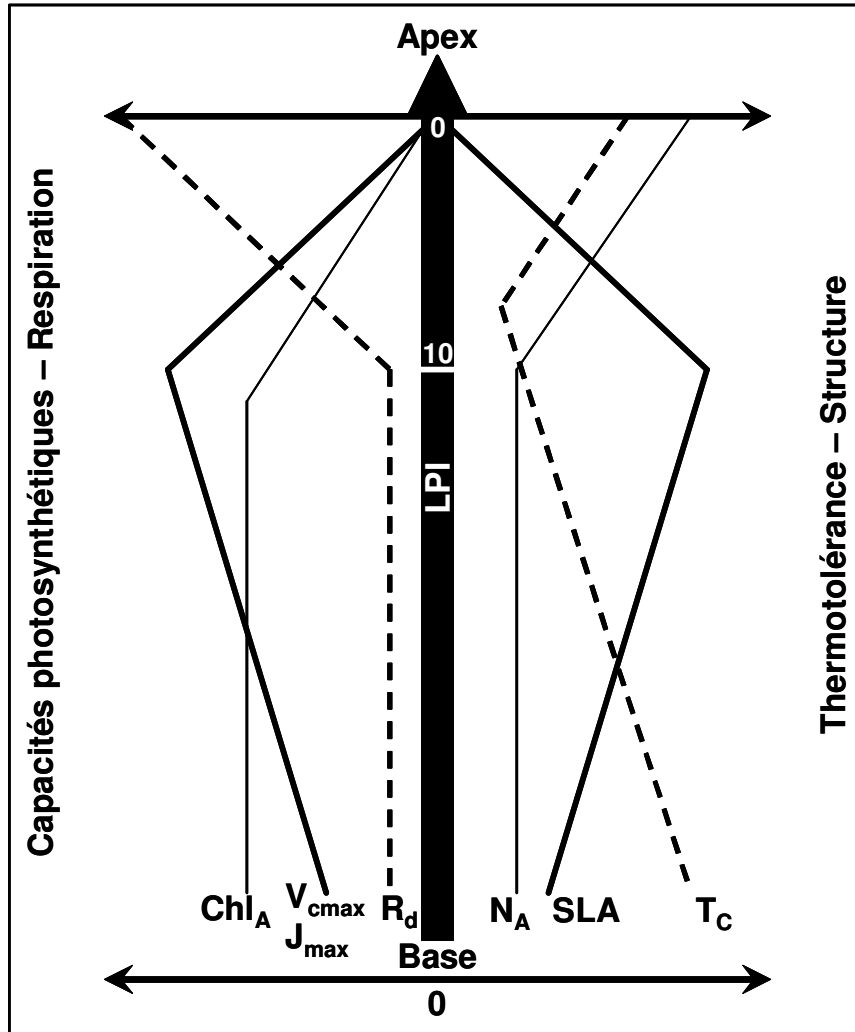


Figure 1.9. Tendances de l'évolution, le long de la tige des boutures de peuplier, des capacités photosynthétiques (V_{cmax} , vitesse de carboxylation maximale ; J_{max} , flux maximal d'électrons ; Chl_A , teneur surfacique en chlorophylles), de la respiration (R_d , dark respiration), de la thermotolérance (T_C , température critique) et de la structure (SLA , surface massique ; N_A , teneurs surfaciques en azote).

2.3. Discussion

2.3.1. Impact de l'âge des feuilles sur leur structure, leurs capacités photosynthétiques et leur thermotolérance

L'évolution des surfaces foliaires et des SLA le long de la tige des boutures montre deux phases au cours de la vie de la feuille (Figure 1.7, A et B ; Figure 1.8) : (1) une phase de croissance, jusqu'à ce que la feuille ait atteint sa surface définitive, durant laquelle son épaisseur et/ou sa densité diminue proportionnellement à son expansion et (2) une phase adulte au cours de laquelle sa densité/épaisseur augmente progressivement. Pour les deux clones, les valeurs de V_{cmax} , de J_{max} , de R_d et de T_C variaient respectivement entre 4 et 99,5 $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entre 21 et 140 $\mu\text{mol}_e \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entre 0,5 et 5 $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et entre 43 et 46,75°C. En 1998, Niinemets *et al.* ont relevé, pour *P. tremula*, des valeurs de V_{cmax} et de J_{max} comprises respectivement entre 24 et 68 $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et entre 54 et 175 $\mu\text{mol}_e \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En 1996, Ceulemans et Isebrands ont rapporté dans la littérature une amplitude de variation de R_d , pour les peupliers euraméricains, de 0,4 à 2,5 $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De la même façon, les études menées sur la thermotolérance des arbres de climats tempérés ont montrées que les plus tranchés en terme de température critique ne différaient entre eux que de 3°C environ (Logan et Monson 1999, Dreyer *et al.* 2001). Les valeurs mesurées à partir des boutures des clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' sont plus tranchées que celles relevées dans la littérature, probablement en raison du fait que les feuilles en croissance, présentant des caractéristiques très différentes de celles des feuilles adultes, n'ont sans doute pas été prises en compte dans ces études.

Au cours de l'étalement de la feuille, les teneurs en azote par unité de surface diminuent, probablement du fait de l'augmentation des SLA (Figure 1.9). En revanche, elle s'enrichit en chlorophylles et sa photosynthèse, en termes de vitesse de carboxylation et de flux d'électrons, est de plus en plus efficace, comme l'attestent les augmentations de V_{cmax} et de J_{max} (Figure 1.8, A et B). Il a été montré, pour le peuplier, que l'épaisseur de la feuille ne faisait qu'augmenter entre LPI 5 et 15, avec un épaississement des parenchymes palissadique et lacuneux, et des épidermes supérieur et inférieur (Schumaker *et al.* 1997). L'augmentation de la SLA observée au cours de l'étalement ($\text{LPI} \leq 10$) ne peut donc être due qu'à une diminution de la densité de la feuille, elle-même liée à un accroissement des espaces intra et intercellulaires. La respiration évolue inversement aux capacités photosynthétiques : plus la feuille gagne en efficacité de la photosynthèse, moins sa respiration est active. À mesure que la feuille s'enrichit en chlorophylles et gagne en

surface assimilatrice, la photosynthèse prend le pas sur la respiration. Au cours de cette phase, il apparaît que le degré d'étalement de la feuille n'a pas d'incidence sur sa thermotolérance. Celle-ci est très faible en comparaison de celle mesurée pour des LPI supérieurs à 10.

Lorsque la feuille a atteint sa taille définitive, aux LPI proches de 10 (Figure 1.7, A), elle présente une densité et des teneurs en azote minimales. Même si elle fait preuve, à ce niveau, de capacités photosynthétiques optimales, sa tolérance à la chaleur est minimale. À ce stade, la feuille semble privilégier l'optimisation photosynthétique de sa surface au renforcement de sa structure, la rendant moins résistante aux contraintes environnementales. Il a déjà été montré que c'est aux alentours de LPI 10 que les feuilles de peuplier ont l'activité photosynthétique la plus importante et présentent une sensibilité maximale aux contraintes, telles que les radiations UV-B (Schumaker *et al.* 1997). Une plus grande sensibilité des jeunes feuilles adultes aux oxydations consécutives à la sécheresse, comparée à celle des feuilles en croissance et des feuilles adultes plus âgées, a également été observée (Marron *et al.* 2002). À ce stade, la densité foliaire minimale le long de la tige peut donc présenter l'avantage de faciliter l'acheminement du CO₂ jusqu'aux sites de carboxylation (résistance mésophyllienne réduite) (Syvertsen *et al.* 1995, Reich *et al.* 1999, Niinemets 2001) et d'offrir à la lumière une importante surface foliaire par unité de biomasse mais aussi l'inconvénient de réduire l'inertie lors d'élévations de températures.

Le vieillissement de la feuille (LPI > 10) s'accompagne d'une augmentation d'épaisseur et/ou de densité comme l'atteste la diminution des SLA. Pour des LPI supérieurs à 10, les teneurs en chlorophylles n'évoluent quasiment plus, alors que les capacités photosynthétiques et teneurs en azote ont tendance à décliner. En 1983, Reich avait montré que, pour des boutures ligneuses d'un hybride interaméricain (clone 207 issu du croisement *P. deltoides* x *trichocarpa*) élevées en serre, le rendement quantique et les teneurs en chlorophylles augmentaient durant l'étalement des feuilles puis déclinaient graduellement au cours de leur vieillissement. Plus précisément, il observait un fléchissement progressif des courbes de réponse de l'assimilation de CO₂ à la lumière entre la deuxième et la huitième semaine de développement de la feuille. L'augmentation de densité et/ou d'épaisseur de la feuille au cours de son vieillissement pourrait accroître la résistance mésophyllienne au transfert du CO₂ jusqu'aux sites de carboxylation (Syvertsen *et al.* 1995, Reich *et al.* 1999, Niinemets 2001). Pour les arbres à feuilles caduques, il a été

montré que la diminution de V_{cmax} intervenait pour 75 % dans la diminution d'assimilation de carbone liée au vieillissement des feuilles (Wilson *et al.* 2000). En revanche, l'augmentation de densité et/ou d'épaisseur de la feuille semble présenter l'avantage d'augmenter la tolérance de la feuille à la chaleur.

Dans cette expérience et pour les deux clones, V_{cmax} et J_{max} étaient étroitement corrélés ($P \leq 0,001$). Cette corrélation met en évidence une évolution conjointe de ces deux variables et une co-limitation de la photosynthèse par la RuBisCO et par le transport d'électrons (Wullschleger 1993, Niinemets *et al.* 1998).

2.3.2. Différences de capacités photosynthétiques et de thermotolérance entre clones

Les feuilles des deux clones ne différaient pas par leur niveau de tolérance à la chaleur (Figure 1.7, B). Dans le cadre de l'estimation des capacités photosynthétiques des deux clones, le clone 'Luisa_Avanzo' présentait des SLA significativement supérieures à celles du clone 'Dorskamp'. Les feuilles du clone 'Luisa_Avanzo' sont moins structurées que celles du clone 'Dorskamp'. En effet, elles présentent, par rapport aux feuilles du clone 'Dorskamp', des SLA plus élevées et des teneurs en azote, en carbone et en chlorophylles par unité de surface plus faibles (Figure 1.8). Les capacités photosynthétiques du clone 'Luisa_Avanzo' sont cependant supérieures à celles du clone 'Dorskamp', essentiellement au niveau des feuilles adultes. Au niveau des feuilles en croissance, le clone 'Luisa_Avanzo' présente une respiration plus active que celle du clone 'Dorskamp'. L'influence de la SLA sur les capacités photosynthétiques de la plante est ambiguë. En effet, une feuille épaisse, à faible SLA, présentera plus de couches de tissu palissadique ou des cellules plus grandes dans chaque couche et, par conséquent, plus de chloroplastes et d'enzymes photosynthétiques par unité de surface foliaire (Hanson 1917). Cependant, si une augmentation de l'épaisseur de la feuille est bénéfique à son assimilation par unité de surface, une augmentation de densité provoquera une augmentation de la résistance au transfert des gaz des espaces intercellulaires aux chloroplastes (Syvertsen *et al.* 1995, Reich *et al.* 1999, Niinemets 2001). Les capacités photosynthétiques légèrement supérieures pour les feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo' par rapport à celles du clone 'Dorskamp' peuvent donc nous laisser supposer que les différences de SLA entre clones sont dues principalement à des différences de densité plutôt que d'épaisseur de feuilles. Enfin, il a été montré que les espèces à faibles SLA privilégient l'investissement de l'azote

dans les composants structuraux de la feuille alors que les espèces à fortes SLA privilégient l'investissement dans les composants métaboliques, favorisant ainsi la photosynthèse (Vitousek *et al.* 1990, Lloyd *et al.* 1992, Parkhurst 1994, Terashima et Hirotsuka 1995, Reich *et al.* 1998). Par conséquent, bien que le clone 'Dorskamp' présente des teneurs en azote par unité de surface foliaire légèrement inférieures à celles du clone 'Luisa_Avanzo', cette dernière a une assimilation supérieure pour une même quantité d'azote.

Au niveau des feuilles adultes, le clone 'Luisa_Avanzo' présentait des capacités photosynthétiques plus élevées que celles du clone 'Dorskamp'. Comme cela est habituellement constaté pour des boutures de 2 mois (Marron *et al.* 2002, Marron *et al.* 2003), les feuilles du clone 'Luisa_Avanzo' utilisées pour l'estimation des capacités photosynthétiques montraient également des SLA supérieures à celles du clone 'Dorskamp'. De plus, l'évolution des capacités photosynthétiques des deux clones le long de la tige de leurs boutures était parallèle à celle des SLA. Il semble donc exister un lien négatif entre la densité de la feuille et ses capacités photosynthétiques. En revanche, l'évolution de la température critique le long de la tige des boutures était inverse à celle des SLA, les feuilles les plus denses/épaisses s'avérant les plus résistantes à la chaleur. Néanmoins, dans le cadre de l'estimation de la thermotolérance, le clone 'Luisa_Avanzo' présentait des SLA inférieures à celles du clone 'Dorskamp' et les deux clones ne différaient pas en termes de températures critiques des feuilles. L'écart de SLA entre les clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' observé pour de jeunes boutures semble se réduire avec le vieillissement des boutures. Il semble donc exister une influence positive de la densité/épaisseur de la feuille sur sa thermotolérance.

3. Croissance et structure des feuilles

Les résultats relatifs à l'effet de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage sur les paramètres de croissance et de structure des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' font l'objet de l'article inséré ci-après et publié en 2003 dans la revue *Tree Physiology* (Marron *et al.* 2003) (Figure 1.10). Cette étude, réalisée à l'Université d'Orléans, présentait trois objectifs majeurs : (1) définir les relations entre la position des feuilles sur la tige et leur croissance et leur structure, (2) juger de l'impact de la sécheresse puis du ré-arrosage sur ces relations, et (3) déterminer l'influence d'une succession de cycles sécheresse/ré-arrosage. Le dispositif expérimental présenté dans la partie Matériel et Méthodes de cet article est également à l'origine du matériel végétal utilisé pour comparer les capacités d'ajustement osmotique ainsi que les aptitudes antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. Les précautions expérimentales relatives à la collecte des échantillons pour les analyses seront précisées dans les parties correspondantes.

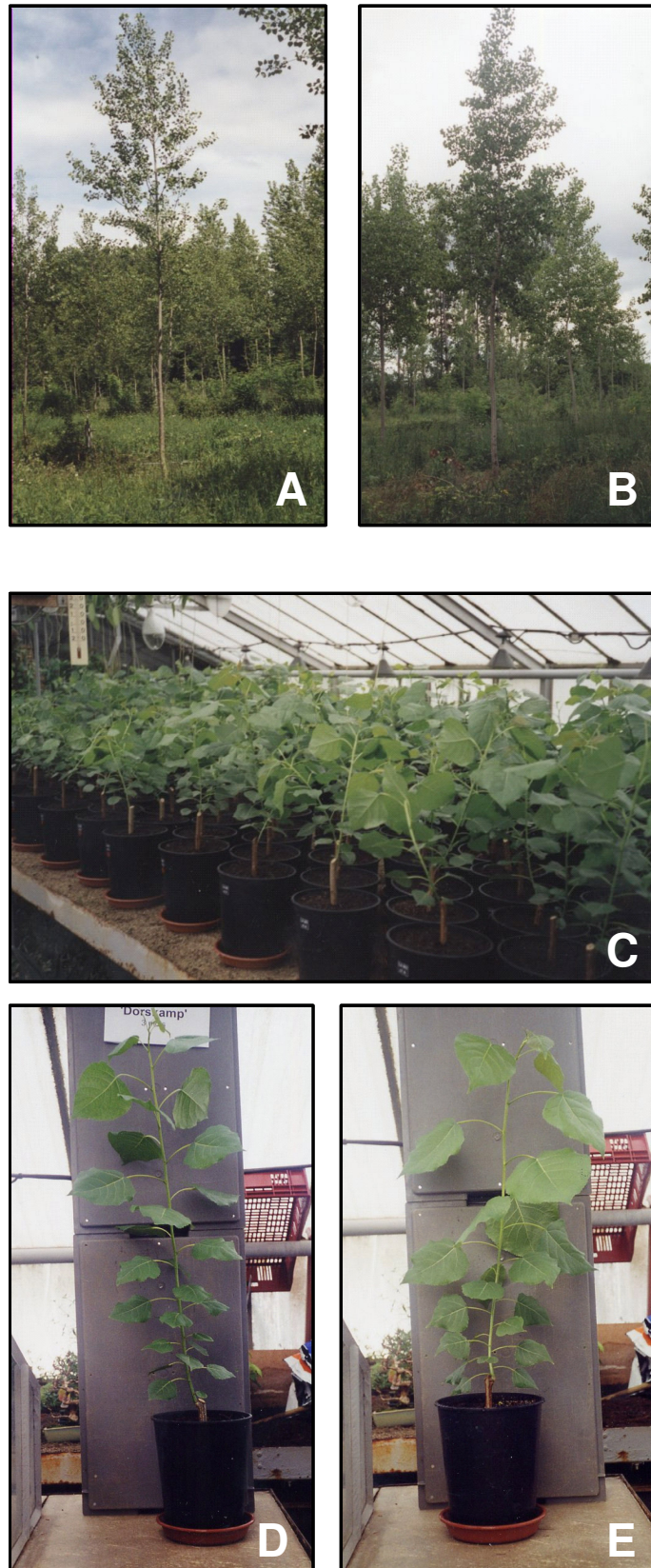


Figure 1.10. Arbres de 6 ans : clones 'Dorskamp' (A) et 'Luisa_Avanzo' (B) à Cléry-Saint-André (Loiret) (LBLGC), disposition des boutures à la serre du LBLGC (Université d'Orléans) lors de l'expérience « Cycles de sécheresse » (C) et boutures âgées de 3 mois des clones 'Dorskamp' (D) et 'Luisa_Avanzo' (E).

Impact de cycles successifs sécheresse / ré-arrosage sur la croissance et la surface massique des feuilles de deux clones de *Populus x canadensis* (Moench), 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'

Nicolas Marron, Erwin Dreyer, Éric Boudouresque, Didier Delay, Jean-Michel Petit, Francis M. Delmotte et Franck Brignolas

Tree Physiology, 23:in press

Résumé

Les réponses de deux clones de *Populus x canadensis* (Moench), 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo', à une succession de cycles sécheresse / ré-arrosage (1 à 3 cycles) ont été comparées. La vitesse d'apparition des feuilles, la durée d'expansion foliaire, les vitesses d'étalement totale et individuelle des feuilles ainsi que la conductance stomatique ont été mesurées périodiquement durant l'expérience. La teneur en eau du sol (SWC) et le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) ont été déterminés quatre fois durant chaque cycle. En parallèle, la teneur relative en eau (RWC) et la surface massique des feuilles (SLA) ont été déterminées pour les feuilles prélevées de l'apex vers la base de chaque bouture.

En conditions non limitantes en eau, 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' se montraient différents dans leur dynamique de croissance foliaire. Même si la durée d'étalement des feuilles était similaire pour les deux clones, 'Luisa_Avanzo' montrait des vitesses d'apparition et d'étalement foliaire individuelle supérieures à celles de 'Dorskamp'. En conséquence, les boutures de 'Luisa_Avanzo' atteignaient des surfaces foliaires totales et individuelles plus importantes que celles de 'Dorskamp'. Les feuilles de 'Dorskamp' avaient des SLA inférieures à celles de 'Luisa_Avanzo'.

En réponse aux cycles successifs de sécheresse, les deux clones ont réduit les vitesses d'apparition et de croissance de leurs feuilles. Les surfaces individuelles des feuilles ainsi que les surfaces totales du feuillage étaient cependant drastiquement réduites uniquement dans le cas de 'Luisa_Avanzo'. 'Dorskamp' maintenait une surface foliaire constante en raison de l'augmentation de la durée d'étalement foliaire durant la sécheresse et d'une stimulation significative de la vitesse individuelle d'étalement et de la vitesse d'apparition des feuilles en réponse au ré-arrosage. La sécheresse entraînait une diminution des SLA de 'Luisa_Avanzo' plus importante que pour 'Dorskamp'. Les feuilles étalées par 'Dorskamp' étaient constitutivement denses et/ou épaisses, alors que celles de 'Luisa_Avanzo' devenaient denses et/ou épaisses en réponse à la sécheresse. Pour les deux clones, le ré-arrosage causait un retour partiel des SLA à des valeurs témoin.

Notre expérience confirme les observations effectuées sur le terrain et en serre attribuant à 'Dorskamp' une meilleure tolérance aux sécheresses et ré-arrosages successifs qu'à 'Luisa_Avanzo'. Cette différence entre les deux clones est imputable à la plasticité de 'Dorskamp' après ré-arrosage, plutôt qu'à des différences clonales de réponse à la sécheresse.

4. Ajustement osmotique

4.1. Matériel et méthodes

4.1.1. Matériel végétal

Les teneurs en oses solubles des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ont été déterminées à partir de l'expérience visant à faire subir aux deux clones de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage successifs. Pour chaque bouture, une feuille sur deux a été collectée, plongée dans de l'azote liquide et lyophilisée. Les échantillons ont ensuite été broyés puis stockés sous vide en présence de silicagel. Les oses solubles ont été extraits et dosés pour les six feuilles les plus jeunes de chaque bouture des deux clones ($0 < \text{LPI} < 12$) et pour les trois cycles sécheresse/ré-arrosage.

4.1.2. Extraction des oses solubles

Les extractions ont été réalisées à partir de 30 mg de poudre lyophilisée mis en suspension dans 1,5 mL d'une solution méthanol¹ / eau à 80 % (Jay-Allemand *et al.* 1988, Scalbert 1992). Le mélange a été soumis à sonication 30 min puis centrifugé 10 min à 20 000 g et 900 µL de surnageant ont été prélevés. Le culot a été remis en suspension dans les 600 µL restants auxquels ont été ajoutés 900 µL de méthanol 80 %. Le mélange a de nouveau été traité par ultrasons puis centrifugé comme précédemment et 900 µL de ce surnageant ont été prélevés et ajoutés au premier. L'extrait constitué du mélange des deux fractions (1,8 mL) a ensuite été filtré sur colonne « cartridge Sep-Pak C18 » (Waters) afin d'éliminer les pigments photosynthétiques (Yamasaki *et al.* 1997).

4.1.3. Dosage des oses solubles réducteurs

Les oses réducteurs contenus dans les extraits ont été dosés à l'aide d'une microméthode au résorcinol-acide sulfurique (Monsigny *et al.* 1988). Elle permet la mise en évidence des aldopentoses et des aldohexoses qui, après déshydratation intramoléculaire provoquée par l'acide sulfurique concentré, réagissent sous forme de furfural et de son dérivé 5-hydroxyméthylé avec le résorcinol pour produire des complexes colorés.

¹ Réactifs et produits chimiques de qualité HPLC fournis par Fisher Scientific (méthanol).

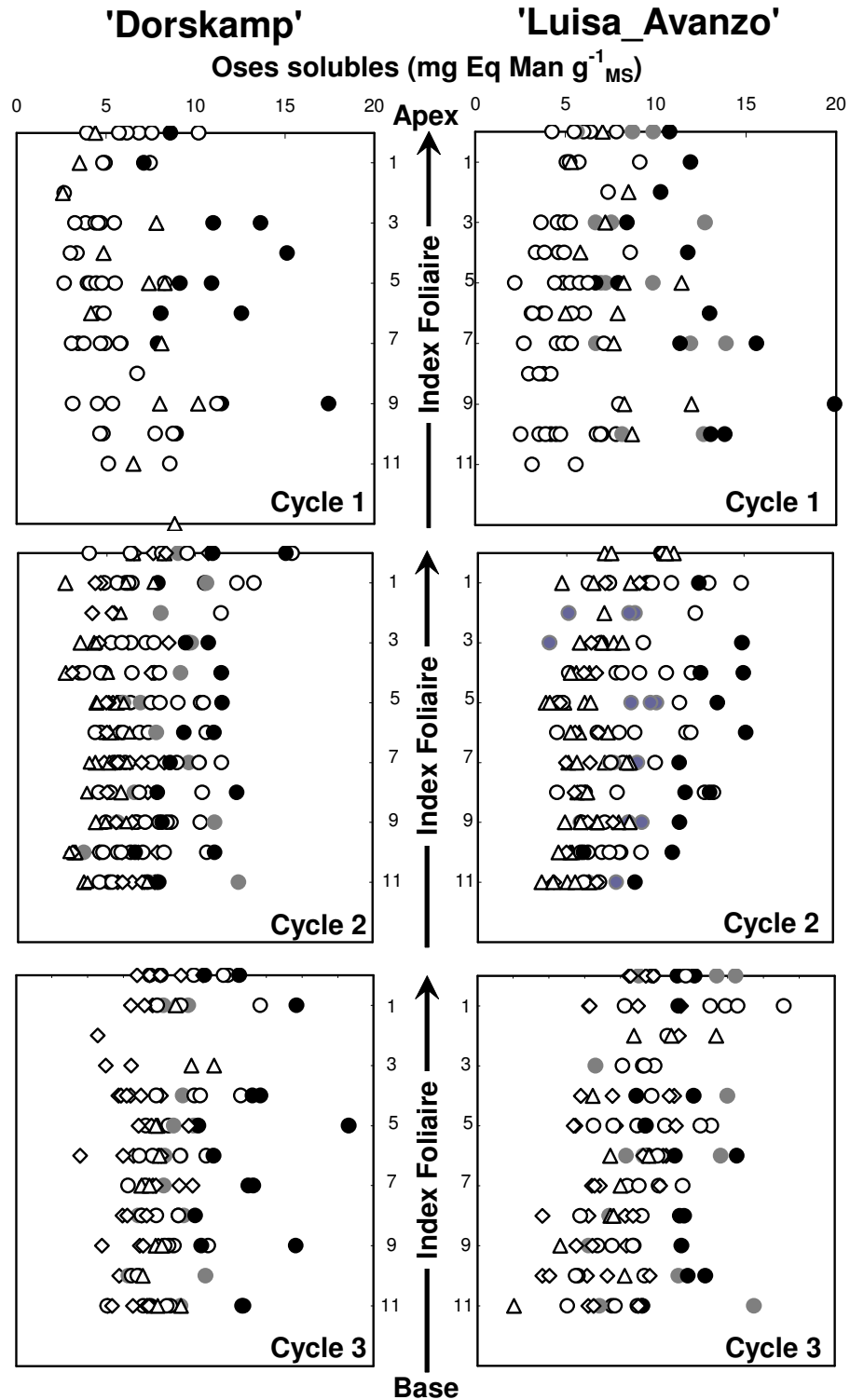


Figure 1.11. Teneurs massiques en oses solubles des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en fonction de leur position sur la tige de boutures témoin (cercles blancs), stressées (cercles gris à chute de conductance et cercles noirs au plus fort du stress), ré-arrosées du cycle en cours (triangles blancs) et ré-arrosées du cycle précédent (losanges blancs) au cours des cycles 1, 2 et 3. Les feuilles sont indexées de l'apex vers la base des boutures. Pour chaque clone et chaque traitement, 3 boutures ont été utilisées. Pour chaque traitement, la significativité des effets « index » et « clone » est indiquée par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les tests ont été effectués en dissociant les index inférieurs à 6 des index supérieurs à 6 pour les témoins, tous index confondus pour les autres traitements.

Des dilutions en cascade dans de l'eau, des extraits et d'une solution de mannose² à 0,9 g L⁻¹, ont été effectuées dans les puits à fond plat de plaques de microtitration. À 20 µL de ces solutions diluées jusqu'au 1/8 ont été ajoutés 20 µL de résorcinol² (6 g L⁻¹ dans de l'eau) puis 100 µL d'acide sulfurique² 75 % dans de l'eau distillée. Le contenu des cupules a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un agitateur Titramax 1000, puis les plaques ont été placées à l'étuve 30 min à 90°C. Après 30 min passées à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques (*µQuant*) et le logiciel KC4 (BIOTEK). Les concentrations en oses solubles ont été exprimées en milligramme Équivalent mannose par gramme de matière sèche (mg Eq Man g⁻¹_{MS}) et en gramme Équivalent mannose par mètre carré de surface foliaire (g Eq Man m⁻²).

4.2. Résultats

Les résultats ont été exprimés par unité de masse sèche de feuille (Figure 1.11). En conditions non limitantes en eau, les deux clones ne différaient pas par leurs teneurs foliaires en oses solubles. Néanmoins, ces teneurs ont augmenté graduellement tout au long de l'expérience pour les deux cultivars et pour tous les étages de feuilles. Les feuilles d'index foliaires inférieurs à 2 présentaient des teneurs en oses solubles plus élevées que les feuilles d'index supérieurs. En réponse à un premier arrêt d'arrosage, les teneurs augmentaient d'un facteur 2 pour toutes les feuilles des deux clones (Figure 1.11, T1). Cette augmentation était plus marquée pour les feuilles les plus âgées. Les effets d'un deuxième arrêt d'arrosage étaient moins marqués. Le troisième arrêt d'arrosage n'impliquait plus que de faibles variations pour le clone 'Luisa_Avanzo' alors que, pour le clone 'Dorskamp', une augmentation générale des teneurs était encore observable. Quel que soit le cycle, le ré-arrosage provoquait un retour des teneurs des feuilles stressées au niveau des témoins (Figure 1.11, T2 et T3).

² Réactifs et produits chimiques fournis par Serlabo (mannose), Prolabo-Rectapur (résorcinol) et Carlo Erba-Reagente Puro Erba (acide sulfurique).

4.3. Discussion

4.3.1. Impact de l'âge des feuilles sur leur teneur en oses solubles

Pour les deux clones, la distribution des teneurs foliaires en oses solubles le long de la tige des boutures était semblable. Comme cela avait déjà été observé lors de notre DEA (Marron *et al.* 2002), les feuilles les plus jeunes des boutures des deux clones présentaient des teneurs en oses solubles supérieures à celles des autres feuilles. Ces teneurs élevées contribuent probablement à favoriser l'influx d'eau dans les cellules et, par conséquent, la turgescence nécessaire à l'expansion cellulaire (Hare *et al.* 1998). Dickson avait montré en 1986 que, pour le peuplier de Virginie (*Populus deltoides*), les jeunes feuilles adultes sont les plus grandes productrices de photosynthétats le long de la tige. Toutefois, elles redistribuent leur production à la fois vers les feuilles en croissance et vers les adultes plus âgées, ces deux dernières catégories de feuilles conservant pour elles-mêmes leur maigre production. Chez l'abricotier, il a été montré que le métabolisme glucidique des feuilles évolue de manière importante au cours de leur développement (Bieleski et Redgwell 1985). Les très jeunes feuilles synthétisent essentiellement du saccharose à partir de leur propre production de glucose et de celui qu'elles reçoivent des feuilles plus âgées. Cette catégorie de feuilles ne redistribue quasiment rien. Lorsque la feuille est pleinement étalée, elle produit à partir du glucose, en plus du saccharose, du sorbitol. Bien que ces feuilles présentent des capacités photosynthétiques élevées par rapport aux feuilles plus jeunes et plus âgées et que leur production d'oses soit plus diversifiée, elles montrent le long de la tige des teneurs en oses légèrement inférieures à celles des deux autres catégories car la majeure partie des produits de la photosynthèse est destinée à l'exportation. Quand la feuille vieillit, le saccharose n'est plus synthétisé à partir du sorbitol qui s'accumule. La quantité totale en oses foliaires augmente graduellement durant toute la vie de la feuille.

4.3.2. Impact de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage successifs sur les teneurs foliaires en oses solubles

Pour les deux clones, l'augmentation des teneurs en réponse aux arrêts d'arrosage et le retour au niveau des témoins après ré-arrosage souligne la participation des oses solubles à l'ajustement osmotique. Des expériences préliminaires, menées dans le cadre de notre DEA, de peracétylation des oses puis de séparation chromatographique sur couche mince de silice avaient permis de déterminer la présence majoritaire de saccharose et, dans une moindre mesure, de fructose chez le clone 'Dorskamp' et des teneurs plus faibles chez le

clone 'Luisa_Avanzo'. Dans ces dernières expériences, l'accumulation d'oses en réponse à la contrainte est voisine pour les deux clones mettant en évidence que les différences observées lors de notre DEA (Marron *et al.* 2002) étaient sans doute liées à l'arrêt de croissance subi par les boutures du clone 'Dorskamp'. La comparaison des deux expériences met en évidence un lien entre croissance et aptitude à l'ajustement osmotique : il semble exister un antagonisme entre croissance et ajustement osmotique. Le ralentissement de la croissance foliaire observée durant la sécheresse pourrait donc correspondre à une stratégie visant non seulement à réduire la surface foliaire transpirante afin de limiter les pertes en eau mais aussi à privilégier l'ajustement osmotique.

5. Systèmes enzymatiques de détoxification des formes activées de l'oxygène et composés phénoliques

5.1. Activités enzymatiques des feuilles

5.1.1. Matériel et méthodes

5.1.1.1. Matériel végétal

Les teneurs en protéines et les activités de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la peroxydase des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ont été estimées à partir de l'expérience visant à faire subir aux deux clones de 1 à 3 cycles sécheresse/ré-arrosage successifs (Marron *et al.* 2003). Pour chaque bouture utilisée lors du premier cycle sécheresse/ré-arrosage, un lot de 2 feuilles en croissance (Index Foliaire = $3,12 \pm 0,16$) et un lot de 2 jeunes feuilles adultes (Index Foliaire = $10,40 \pm 0,61$) ont été prélevés, plongés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C . Pour chaque clone et chaque étage de feuilles, quatre classes de potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{wp}) ont été étudiées : (1) $-0,59 \pm 0,01$ MPa ; (2) $-0,94 \pm 0,01$ MPa ; (3) $-1,41 \pm 0,04$ MPa ; (4) $-2,52 \pm 0,25$ MPa. Trois répétitions par clone, par étage de feuilles et par classe de Ψ_{wp} ont été traitées. Pour les électrophorèses de protéines et les zymogrammes les répétitions ont été doublées.

5.1.1.2. Extraction des protéines

Dans de l'azote liquide, 0,4 g de feuilles congelées a été broyé en une fine poudre. Cette poudre, transférée dans un mortier posé sur de la glace, a été reprise dans 2 mL de tampon d'extraction (tampon phosphate de potassium³ 50 mM, pH 7,8 ; éthylènediaminetétraacétate, EDTA³ 100 mM ; Triton X-100³ 0,4 %). Les extraits ont alors été centrifugés à 19 000 g pendant 15 minutes à 4°C . Le surnageant contenant les protéines solubles a été récupéré et conservé à 4°C pour diverses analyses (Schwanz et Polle 2001).

Les quantités de protéines et les activités enzymatiques de chaque extrait ont été déterminées par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaque (*μQuant*) et du logiciel KC4 (BIOTEK). Les analyses ont été réalisées dans des plaques de microtitration de 96 puits. Une agitation a été effectuée avant lecture à l'aide de l'agitateur Titramax 1000. Trois répétitions ont été réalisées par dosage pour chacune des activités.

³ Réactifs et produits chimiques fournis par Prolabo (KH_2PO_4 , K_2HPO_4) et Fluka (EDTA, Triton X-100).

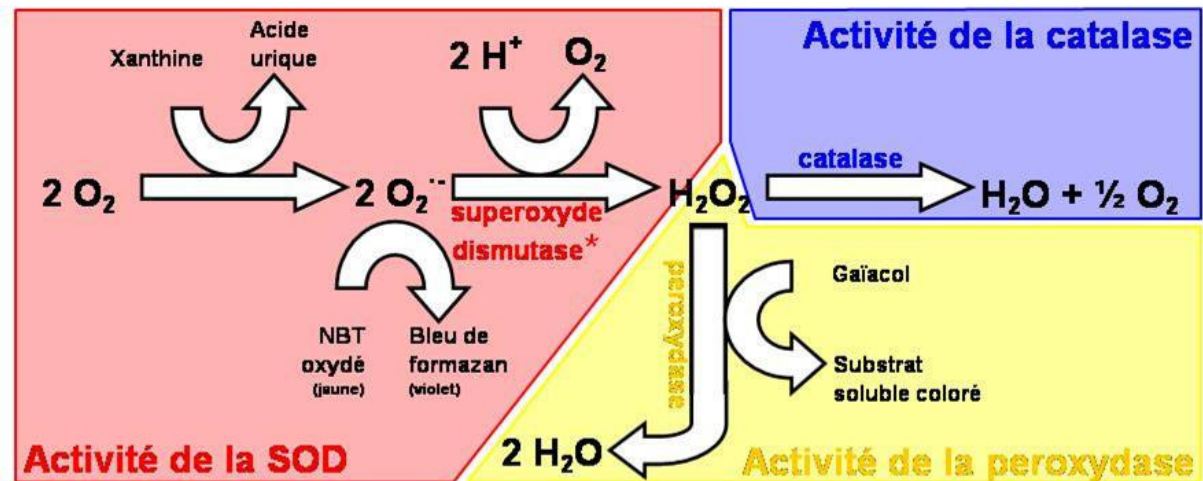
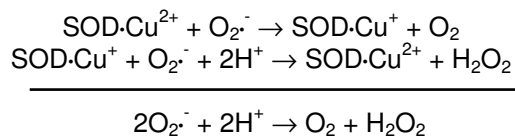


Figure 1.12. Voies du système de défense antioxydant enzymatique et principes des dosages des activités de la superoxyde dismutase (SOD) (rouge), de la catalase (bleu) et de la peroxydase (jaune).

* La réaction de la SOD se passe en deux étapes au cours desquelles un atome de cuivre (dans le cas de la Cu-SOD, par exemple) lié à la protéine est réduit puis oxydé :



D'après Hagège *et al.* 1992, Horton *et al.* 1994, Fu et Huang 2001.

5.1.1.3. Dosage spectrophotométrique des protéines

Une gamme étalon a été réalisée avec de la sérum albumine bovine⁴ (SAB) à 0,33 mg mL⁻¹. À 195 µL de réactif Bio-Rad Protein Assay⁴ (Bradford 1976), 0,33 à 3,3 µg de SAB ont été additionnés. Pour doser la quantité de protéines dans les extraits, 5 µL du surnageant contenant les protéines solubles ont été ajoutés à 195 µL de réactif Bio-Rad Protein Assay. L'absorbance de la solution était lue à 595 nm. Un témoin blanc a été réalisé avec 5 µL d'eau ultra pure et 195 µL de réactif. Les résultats ont été exprimés par unité de masse fraîche ($\mu\text{g g}^{-1}_{\text{MF}}$) et de surface foliaire ($\mu\text{g cm}^{-2}$).

5.1.1.4. Mesure des activités enzymatiques par spectrophotométrie

5.1.1.4.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La mesure de l'activité de la SOD a été réalisée à l'aide du système xanthine/xanthine oxydase qui produit l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en présence d'oxygène (adapté de Hagège *et al.* 1992). Cet anion réduit le NBT (bleu nitré de tétrazolium), ajouté au milieu réactionnel, en bleu de formazan qui absorbe à 560 nm. Sous sa forme oxydée, le NBT est de couleur jaune, tandis que sa forme réduite est de couleur violette. Ce composé coloré reflète la quantité d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ produit par le système xanthine/xanthine oxydase. La SOD transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), il y a alors une inhibition de la réduction du NBT en présence de SOD (Figure 1.12). Une courbe témoin a été réalisée sans SOD pour tester la capacité de production de $\text{O}_2^{\cdot-}$ par le système xanthine/xanthine oxydase. Le coefficient directeur de la courbe témoin obtenue en fonction du temps devait être compris entre 0,002 et 0,007 min⁻¹ ($0,015 < \Delta A_{560} < 0,050$ pour 8 minutes) pour générer suffisamment d' $\text{O}_2^{\cdot-}$. Une cinétique d'absorption à 560 nm a été réalisée pendant 8 minutes. Un maximum de réduction du NBT était alors observé. Le coefficient directeur de la courbe témoin à l'origine correspond à une absence d'activité de la SOD. Les échantillons dont les courbes présentent des coefficients directeurs compris entre 20 et 80 % de celui du témoin ont été considérés comme significatifs. L'activité de la SOD pour un échantillon de peuplier était obtenue par la différence entre les coefficients directeurs des cinétiques du témoin et de l'échantillon : $[1 - (c_e/c_t)] \times 100$. Le coefficient directeur c_e correspondait à la variation d'absorbance à 560 nm (ΔA_{560}) de l'échantillon

⁴ Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (SAB) et Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay).

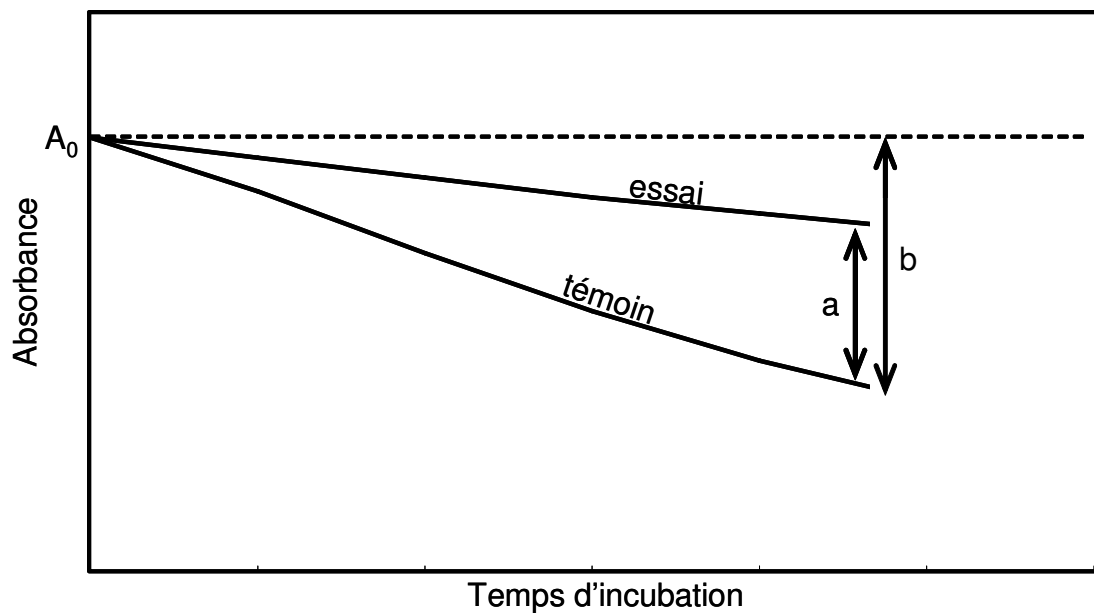


Figure 1.13. Principe d'estimation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et du pouvoir antioxydant (PAO) des extraits, où **a** est la variation d'absorbance de l'essai pendant la cinétique, **b**, la variation d'absorbance du témoin et **A_0** , l'absorbance initiale des émulsions. L'activité de la SOD ou le PAO des essais dans le système sont exprimés en pourcentage de protection apporté par l'extrait par rapport au témoin : $(a / b) \times 100$. L'évolution de l'absorbance est suivie pendant 8 minutes à 560 nm dans le cadre de l'estimation de l'activité de la SOD ou pendant 45 minutes à 470 nm dans le cadre de l'estimation du PAO. Ces temps d'incubation correspondent à une décroissance linéaire de l'absorbance.

divisée par le temps de la cinétique (Figure 1.13). Le coefficient directeur c_t correspondait à la ΔA_{560} du témoin divisée par le temps de la cinétique.

La courbe témoin a été réalisée avec 30 μL de xanthine oxydase⁵ (0,25 unité mL^{-1}) mélangés à 10 μL de xanthine⁵ 1,8 mM, 10 μL de NBT⁵ 2,24 mM, 10 μL de tampon d'extraction et, ajoutés au dernier moment, 240 μL de réactif NBT (tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,8 ; diéthylènetriaminepentaacétate, DETAPAC⁵ 1,33 mM ; NBT 2,24 mM ; xanthine 1,8 mM). Pour mesurer l'activité SOD des échantillons, 1 μL d'extrait de protéines solubles a été utilisé. Un blanc a été obtenu avec 60 μL de tampon d'extraction et 240 μL de réactif NBT. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de protection apporté par l'extrait par rapport au témoin (% , Figure 1.13). Ces résultats ont également été exprimés par unité de masse de protéines ($\% \mu\text{g}^{-1}$ protéines) et par la $\text{LA}_{50\text{SOD}}$ (Leaf Area 50_{SOD}), surface foliaire permettant la protection de 50 % du NBT lors du dosage, ainsi plus cette surface est petite, plus l'enzyme est efficace.

5.1.1.4.2. Catalase

L'activité de la catalase a été mesurée au regard de la disparition au cours du temps de son substrat, le peroxyde d'hydrogène en spectrométrie d'absorption à 240 nm (adapté de Fu et Huang 2001) (Figure 1.12). Une cinétique d'absorption à 240 nm a été réalisée pendant 20 minutes pour chaque échantillon. Le coefficient directeur de la droite obtenue devait être supérieur à $2,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ pour être considéré comme significatif ($\Delta A_{240} > 0,005$ pour 20 minutes). Une gamme étalon a été réalisée en mélangeant de 20 à 200 μL de solution substrat (peroxyde d'hydrogène⁵ 20 mM dans le tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0) avec du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0 dans un volume final de 200 μL . Les analyses ont été réalisées en mélangeant extemporanément 1 μL de surnageant contenant les protéines solubles avec 199 μL de solution substrat. Le blanc contenait 200 μL de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,0. Les résultats ont été exprimés en terme d'activité brute (μkat), d'activité spécifique par unité de masse de protéines ($\mu\text{kat g}^{-1}$ protéines) et par unité de surface foliaire ($\mu\text{kat cm}^{-2}$).

⁵ Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (xanthine oxydase, xanthine, DETAPAC, NBT, H_2O_2).

5.1.1.4.3. Peroxydase

L'activité de la peroxydase a été déterminée à partir de la cinétique d'apparition du produit de peroxydation du gaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène (adapté de Fu et Huang 2001) (Figure 1.12). Une cinétique d'absorption à 420 nm a été réalisée pendant 100 secondes. La concentration a été calculée grâce à la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'absorption molaire du produit de la peroxydase est égal à $6\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Un microlitre de surnageant a été mélangé à 199 μL de solution substrat (tampon phosphate de sodium⁶ 0,1 M, pH 6,0 ; gaïacol⁶ 20 mM ; peroxyde d'hydrogène 0,1 %). Le témoin blanc était constitué de 200 μL de tampon phosphate de sodium. Les résultats ont été exprimés en terme d'activité brute (μkat), d'activité spécifique par unité de masse de protéines ($\mu\text{kat g}^{-1}$ protéines) et par unité de surface foliaire ($\mu\text{kat cm}^{-2}$).

5.1.1.5. Électrophorèse des protéines

Afin de visualiser les différentes isoformes de la SOD, des électrophorèses sur gel de polyacrylamide en condition native ont été réalisées (Ye *et al.* 2000, Martinez *et al.* 2001, Vitória *et al.* 2001). Les protéines sont séparées selon leur charge. Les gels de séparation et de concentration étaient respectivement à 10 % et à 5 % d'acrylamide/bis-acrylamide⁶ (19:1) (Tableau 1.V). Le tampon utilisé pour la migration était du tampon Tris-glycine pH 8,3 (glycine⁶ 192 mM ; Tris-HCl⁶ 25 mM). En condition native, 20 μL d'échantillon ont été déposés par puits, à raison de 16 μL de surnageant contenant les protéines solubles mélangés à 4 μL de tampon de charge natif. Un témoin contenant de la SOD commerciale a également été déposé. À 20 μL d'échantillon, 10 μL de marqueurs moléculaires étaient ajoutés par puits. La migration des électrophorèses débutait avec un voltage de 90 V. Une fois le gel de séparation atteint, le voltage était augmenté de dix volts en dix volts toutes les dix minutes jusqu'à atteindre un voltage de 120 V. L'ampérage était de 30 mA par gel au maximum. La migration était arrêtée lorsque le bleu de bromophénol du tampon de charge atteignait le bas du gel.

5.1.1.6. Zymogrammes

Les isoformes de la SOD sont différentes selon leur localisation cellulaire, selon le cofacteur métallique (cation) nécessaire pour leur activité enzymatique et leur charge. La

⁶ Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (gaïacol, acrylamide/bis-acrylamide, glycine, Tris-HCL, SOD commerciale) et Prolabo (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4).

révélation de ces différentes isoformes nécessite de faire 3 gels. Les solutions de révélation contiennent des inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme (Tableau 1.VI).

Les gels ont été placés dans leur solution de révélation à l'obscurité pendant 45 minutes sous agitation. Ils ont ensuite été rincés avec de l'eau ultra-pure et exposés à la lumière. La riboflavine produit l'anion radicalaire $O_2^{\cdot-}$ lorsqu'elle est placée à la lumière. En présence de NBT, le gel se colorait en violet sauf aux endroits où se trouvaient les différentes isoformes de la SOD.

5.1.2. Résultats

Dans le cadre de la lutte contre les oxydations, la surface foliaire exposée à la lumière est prépondérante. Compte tenu de l'influence majeure de l'âge des feuilles, de la sécheresse et du clone considéré sur la surface massique des feuilles, les résultats exprimés par unité de masse de protéines et par unité de surface foliaire sont présentés et discutés. Les activités enzymatiques brutes et spécifiques sont également rapportées. L'activité brute, en μkat ou $\mu\text{mol s}^{-1}$ (ou en pourcentage de protection pour la superoxyde dismutase), correspond à l'activité globale de l'échantillon pour l'enzyme considérée. L'activité spécifique représente l'activité de l'échantillon ramenée à une base fixe : la quantité de protéines ou la surface foliaire. Cette expression des résultats permet, par rapport à l'activité brute, de tenir compte de l'influence de la perte en eau des feuilles lors de la sécheresse, d'une part, et, d'autre part, d'avoir des indications sur le facteur de variation de l'activité brute : la quantité d'enzyme ou l'activité d'une quantité fixe.

5.1.2.1. Protéines

Pour les deux clones et tous les traitements, les teneurs en protéines des jeunes feuilles adultes étaient égales ou supérieures à celles des feuilles en croissance (Figure 1.14). En l'absence de contrainte, les jeunes feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo' présentaient des teneurs en protéines significativement supérieures à celles du clone 'Dorskamp' tandis que les feuilles en croissance des deux clones montraient des teneurs similaires. Ces teneurs variaient peu pour des intensités de contrainte croissantes dans le cas des feuilles en expansion alors qu'une augmentation significative de la synthèse était observée, pour le clone 'Dorskamp' uniquement, lorsque les Ψ_{wp} variaient de -0,5 à -1 MPa.

Tableau 1.V. Composition, en millilitres et pour un gel, des gels d'électrophorèses des protéines en conditions native et dénaturante. Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (Tris, acrylamide/bis-acrylamide, TEMED, persulfate d'ammonium).

	Gel de concentration	Gel de séparation
	5 %	10 %
Tris 1 M pH 6,8	0,75	-
Tris 1 M pH 8,8	-	6,75
Acrylamide/bis-acrylamide (19:1) 40 %	0,75	4,5
TEMED 15 %	0,04	0,12
Persulfate d'ammonium 9 %	0,12	0,18
Eau distillée	4,40	6,40

Tableau 1.VI. Composition des solutions de révélations des différentes isoformes de la superoxyde dismutase et isoformes révélées pour chaque solution. Réactifs et produits chimiques fournis par Fluka (EDTA), Sigma-Aldrich (Riboflavine, NBT, TEMED, H₂O₂, KCN) et Prolabo (KH₂PO₄, K₂HPO₄).

Composition	EDTA 1 mM		
	Riboflavine 300 µM		
	NBT 0,25 mM		
	TEMED 28 mM		
	Tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,8		
Isoformes révélées	EDTA 10 mM	H ₂ O ₂ 20 mM	KCN 100 mM
	Solution 1	Solution 2	Solution 3
	Cu/Zn		
	Mn		
	Fe		Fe

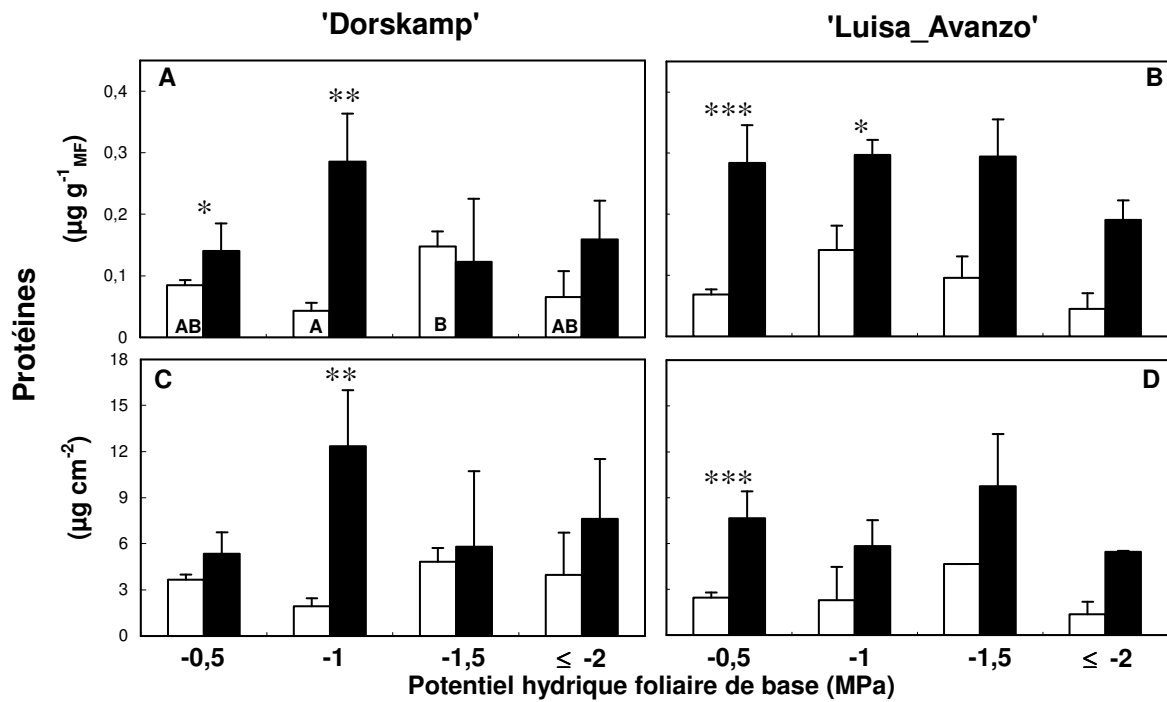


Figure 1.14. Quantité de protéines des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo', exprimée par unité de masse fraîche (A et B) et par unité de surface foliaire (C et D), en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les différences significatives entre classes de potentiel hydrique foliaire de base pour les feuilles en croissance sont indiquées par des lettres différentes.

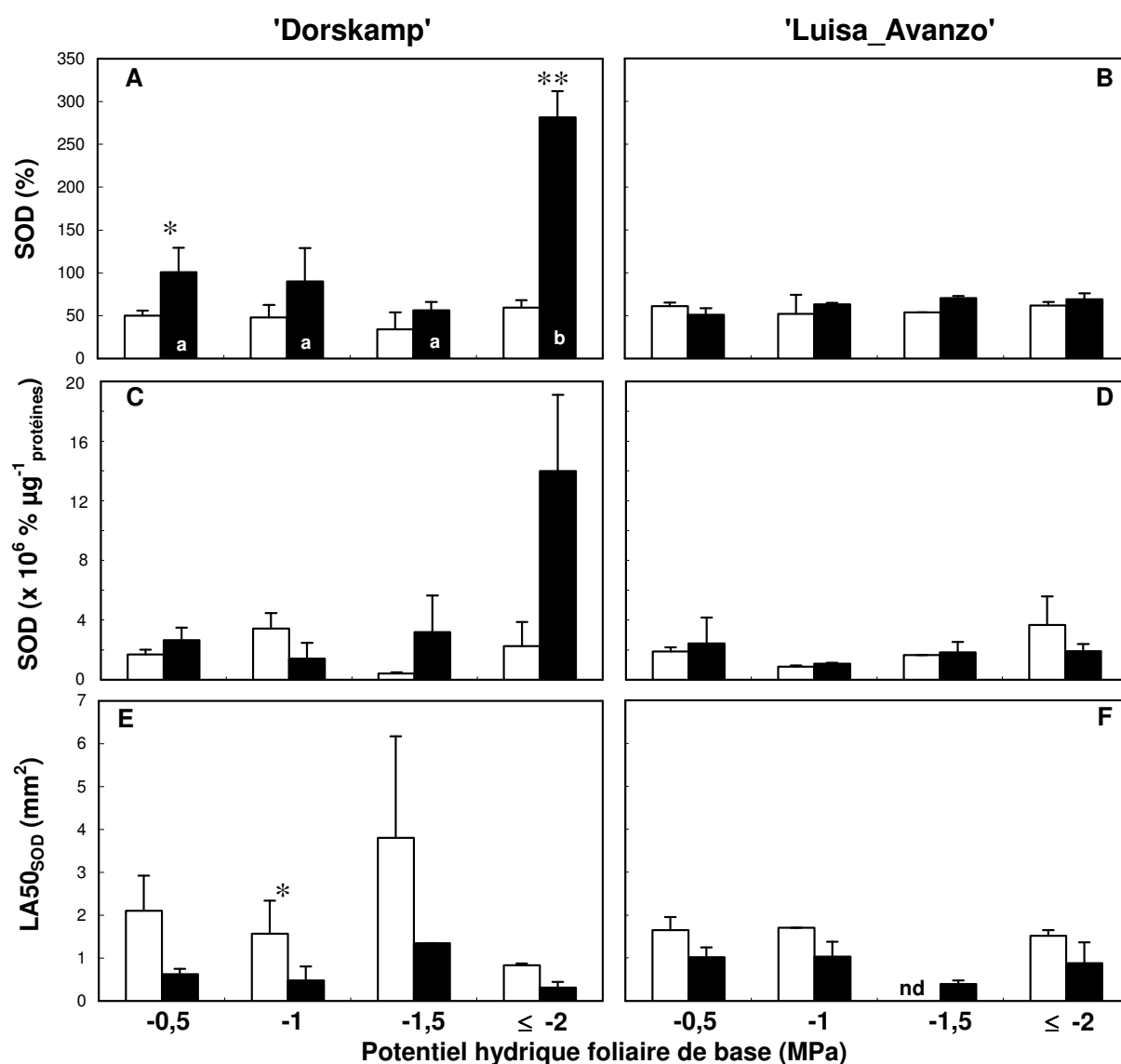


Figure 1.15. Activité de la superoxyde dismutase (SOD) des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo', exprimée en pourcentage de protection (A et B), par unité de masse de protéines (C et D) et comme la surface foliaire permettant la protection de 50% du bleu nitré de tétrazolium (NBT) lors du dosage (E et F), en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (**) pour $P \leq 0,01$. Les différences significatives entre classes de potentiel hydrique foliaire de base pour les jeunes feuilles adultes sont indiquées par des lettres différentes. La LA50_{SOD} des feuilles en croissance de 'Luisa_Avanzo' pour $\Psi_{wp} = -1,5$ MPa n'a pas été déterminée (nd).

5.1.2.2. Superoxyde dismutase

Dans le cas du clone 'Luisa_Avanzo', l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) ne variait ni en fonction de l'âge des feuilles, ni en réponse à la contrainte (Figure 1.15, B, D et F). En revanche, une forte intensité de contrainte ($\Psi_{wp} \leq -2$ MPa) entraînait une augmentation d'un facteur 3 de l'activité de la SOD des jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp' uniquement (Figure 1.15, A, C et E).

Il existe plusieurs isoformes de la SOD, ayant chacune une localisation, une charge et un cofacteur métallique différents (Tableau 1.II, page 28). La Mn-SOD est localisée dans la matrice mitochondriale, la Fe-SOD dans les chloroplastes et la Cu/Zn-SOD dans la fraction soluble, les chloroplastes et les peroxysomes. Pour déterminer quelles étaient les isoformes présentes et éventuellement induites lors d'un stress hydrique pour les clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo', des zymogrammes, ou électrophorèses en condition native, permettant de séparer les isoformes en fonction de leur charge, de leur forme et de leur volume hydrodynamique, ont été réalisés. En raison de l'augmentation marquée de l'activité de la SOD dans le cas des jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp', les électrophorèses de protéines et les zymogrammes ont été effectués pour cet étage de feuilles uniquement. Quatre isoformes ont pu être détectées au maximum (Tableau 1.VII). Une seule était réellement importante chez le clone 'Dorskamp', l'isoforme 3, alors que deux étaient majoritaires pour le clone 'Luisa_Avanzo', les isoformes 1 et 3. À l'aide d'inhibiteurs, le cyanure de potassium KCN et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , la nature exacte des isoformes présentes chez les deux clones a pu être déterminée (Tableau 1.VIII). Trois gels ont été réalisés, chacun en présence ou en absence d'inhibiteur. L'isoforme 1 semblait être inhibée par le traitement avec H_2O_2 uniquement et devrait par conséquent être une Fe-SOD. Les isoformes 2 et 4 étaient inhibées par les deux traitements KCN et H_2O_2 , elles correspondraient donc à des Cu/Zn-SOD. L'isoforme 3 semblait insensible aux traitements, elle pourrait donc être une Mn-SOD. Les 2 isoformes principales du clone 'Luisa_Avanzo' étaient la Mn-SOD et la Fe-SOD. Pour le clone 'Dorskamp', la Mn-SOD était majoritaire. En réponse à une sécheresse d'intensité croissante, une augmentation des isoformes Fe-SOD et Mn-SOD était observée pour le clone 'Dorskamp', avec un maximum à -2 MPa (Tableau 1.IX). L'isoforme Cu/Zn-SOD restait tout juste détectable. En revanche, pour le clone 'Luisa_Avanzo', le maximum était obtenu pour des Ψ_{wp} de -1

Tableau 1.VII. Profils de zymogrammes de la superoxyde dismutase sans inhibiteur pour trois échantillons de 'Luisa_Avanzo' et trois échantillons de 'Dorskamp'. pH 8,8

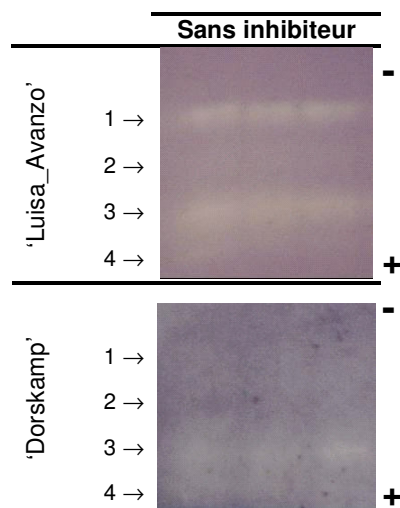


Tableau 1.VIII. Exemples de profils de zymogrammes de la superoxyde dismutase obtenus pour des échantillons de 'Luisa_Avanzo' avec les trois inhibiteurs, EDTA, KCN et H₂O₂ (A), et isoformes révélées par chaque traitement (B). pH 8,8

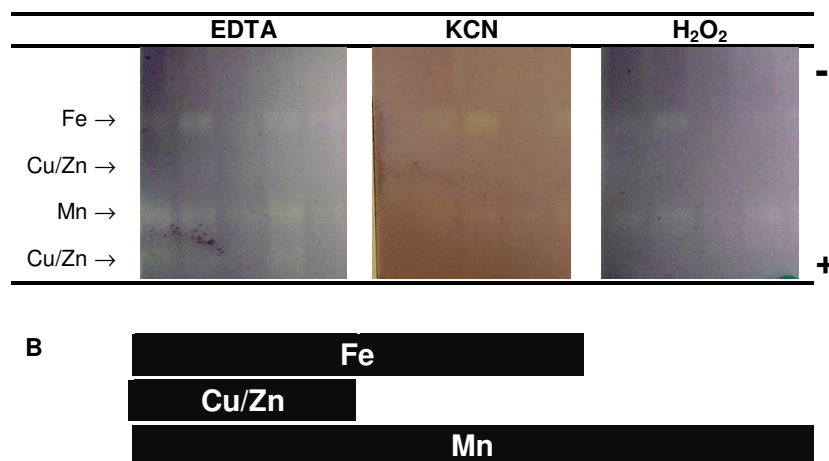


Tableau 1.IX. Quantités relatives des trois isoformes de la superoxyde dismutase, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD et Mn-SOD, présentes chez les jeunes feuilles adultes de 'Dorskamp' et de 'Luisa_Avanzo' en fonction du potentiel hydrique foliaire de base, Ψ_{wp} .

Clone Ψ_{wp} (MPa)	'Dorskamp'			'Luisa_Avanzo'		
	Fe	Cu/Zn	Mn	Fe	Cu/Zn	Mn
-0,5	++	-	+/-	++	+/-	++
-1	++	+/-	++	+++	+/-	+++
-1,5	++	+/-	++	++	+	++
≤ -2	+++	+	+++	++	+	++

MPa. Les isoformes Mn-SOD et Fe-SOD étaient majoritaires mais la Cu/Zn-SOD était également détectée.

5.1.2.3. Catalase

L'activité brute de la catalase était nettement plus importante pour les jeunes feuilles adultes que pour les feuilles en croissance, essentiellement pour le clone 'Dorskamp' (Figure 1.16, A et B). Comme dans le cas de la SOD, les faibles quantités de protéines détectées dans les feuilles en croissance entraînaient, par unité de masse de protéines, une supériorité de l'activité spécifique de la catalase dans les feuilles en croissance (Figure 1.16, C et D). En conditions hydriques non limitantes, les activités des deux clones ne différaient pas.

Pour les Ψ_{wp} de -2 MPa, les activités brute et exprimée par unité de surface des jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp' augmentaient et devenaient supérieures à celle du clone 'Luisa_Avanzo'. L'abaissement de Ψ_{wp} avait peu d'effet sur les feuilles en croissance. Pour le clone 'Luisa_Avanzo', l'augmentation de l'activité de la catalase était moins marquée et n'était effective que jusqu'aux Ψ_{wp} proches de -1 MPa, après quoi elle était réduite.

5.1.2.4. Peroxydase

Les feuilles du clone 'Luisa_Avanzo' montraient une activité de la peroxydase plus élevée que celles du clone 'Dorskamp' (Figure 1.17). L'activité de la catalase n'était pas différente entre les feuilles en croissance et les jeunes feuilles adultes. Exprimée par unité de masse de protéines (Figure 1.17, C et D), l'activité était très nettement supérieure dans les feuilles en croissance des deux clones, du fait de la plus faible quantité de protéines détectée dans ces feuilles comparées aux jeunes feuilles adultes.

En réponse à un abaissement du potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}), l'activité de la peroxydase avait tendance à augmenter pour les fortes contraintes pour les feuilles en croissance du clone 'Dorskamp'. Pour les feuilles en croissance du clone 'Luisa_Avanzo', l'activité de la peroxydase augmentait fortement pour les Ψ_{wp} intermédiaires (≈ -1 MPa) puis diminuait lorsque la contrainte s'accroissait.

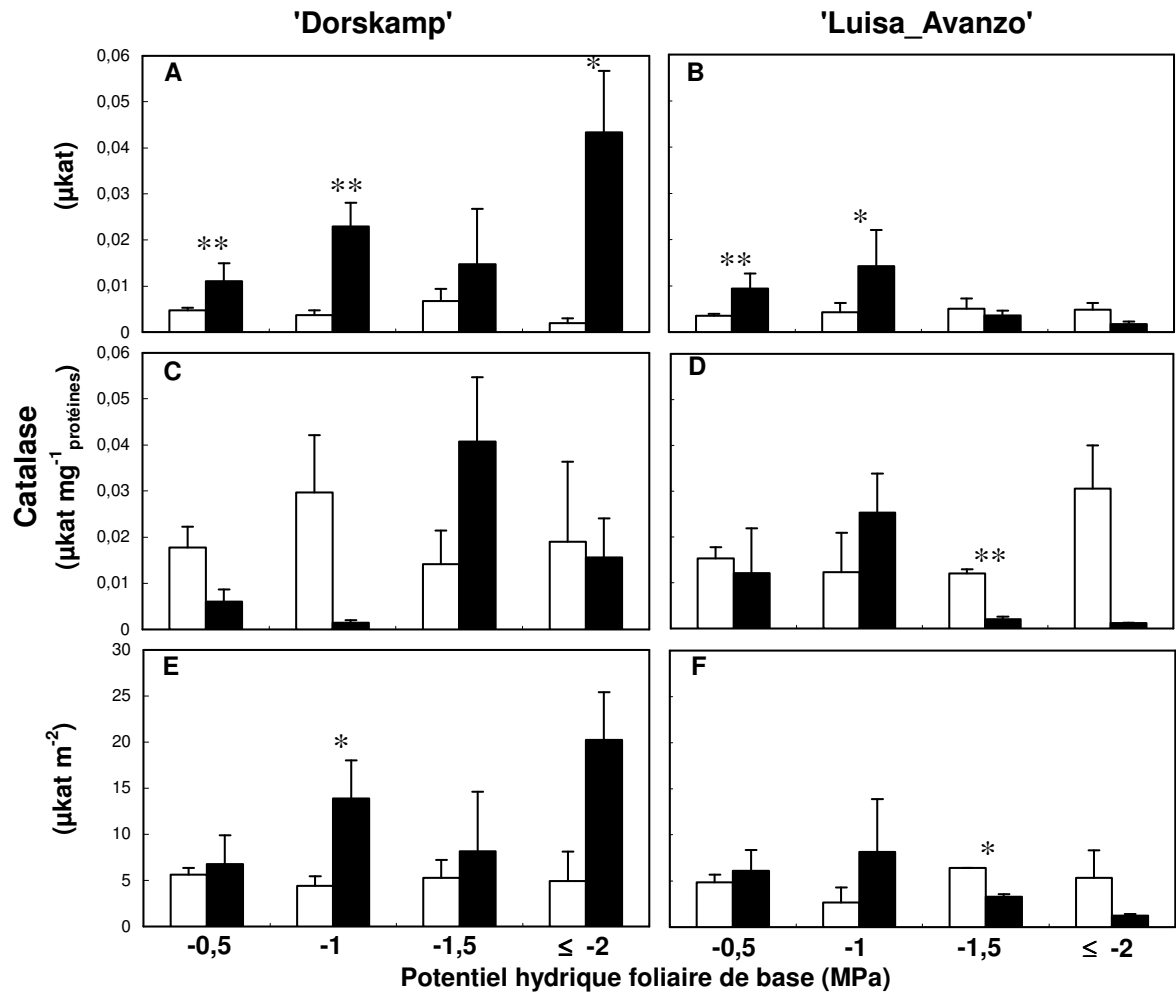


Figure 1.16. Activités brute (A et B), spécifique (C et D) et exprimée par unité de surface foliaire (E et F) de la catalase des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (**) pour $P \leq 0,01$.

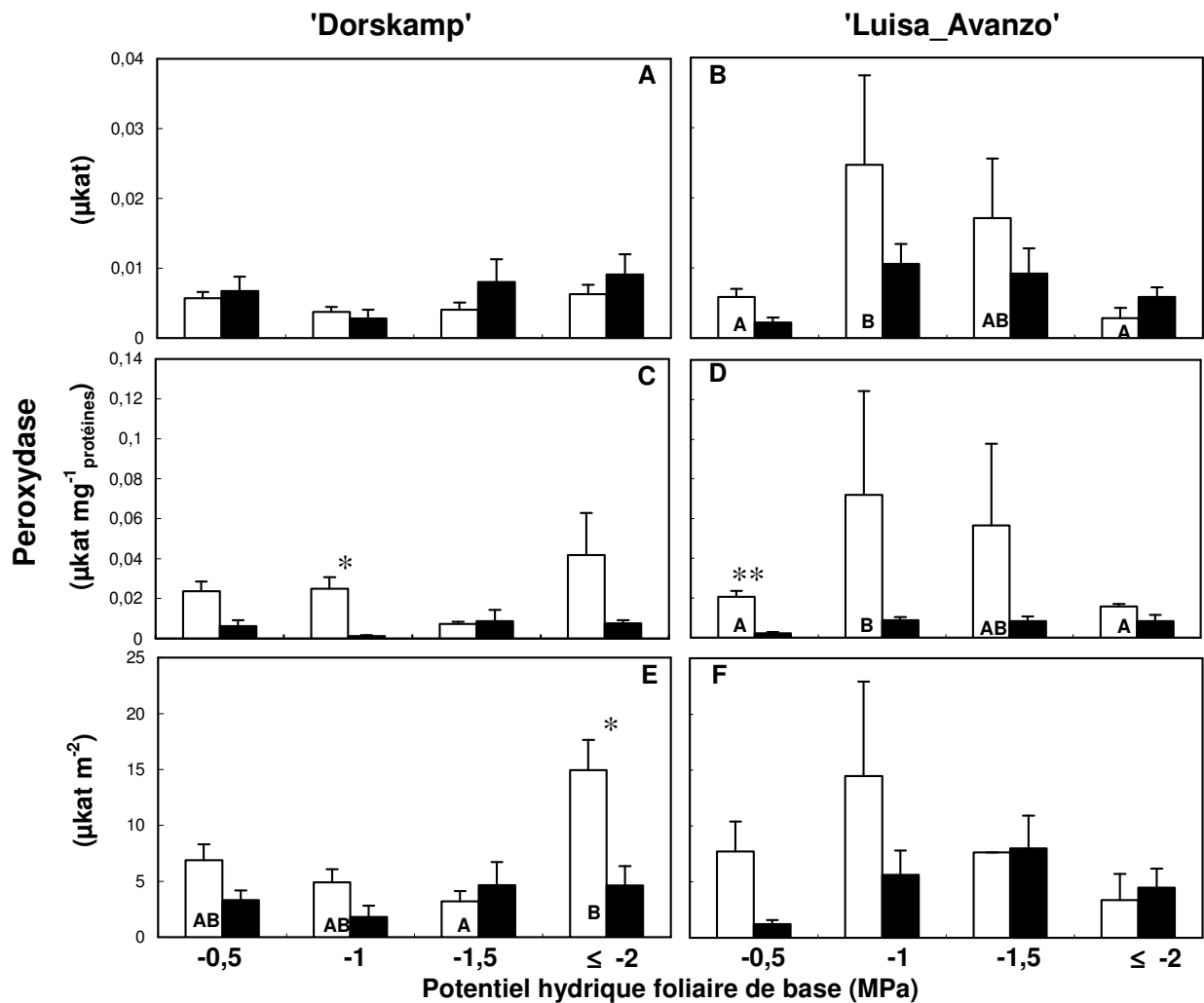


Figure 1.17. Activités brute (A et B), spécifique (C et D) et exprimée par unité de surface foliaire (E et F) de la peroxydase des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (**) pour $P \leq 0,01$. Les différences significatives entre classes de potentiel hydrique foliaire de base pour les feuilles en croissance sont indiquées par des lettres différentes.

5.1.3. Discussion

Les feuilles en croissance et les jeunes feuilles adultes des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' différaient par la nature des enzymes de détoxification de la voie de Halliwell-Asada dont les activités sont stimulées durant la sécheresse (Figure 1.2, page 30). Pour les deux clones, mais de façon plus marquée pour le clone 'Luisa_Avanzo', les feuilles en croissance stimulent essentiellement l'activité de la peroxydase. Pour les jeunes feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo', la réduction du Ψ_{wp} n'entraîne pas de variation significative de l'activité des enzymes. En revanche pour le clone 'Dorskamp', la contrainte hydrique occasionne une importante stimulation des activités de la SOD et de la catalase des jeunes feuilles adultes. La stimulation conjointe de ces deux enzymes permet l'élimination des anions superoxydes, substrat de la SOD, et du peroxyde d'hydrogène, substrat de la catalase. Des augmentations des activités de la SOD, de la catalase et de l'ascorbate peroxydase en réponse à la sécheresse sont un phénomène couramment observé (Burke *et al.* 1985, Perl-Treves et Galun 1991, Mittler et Zilinskas 1994). En 2001, Fu et Huang ont montré que, chez un cultivar de maïs réputé tolérant à la sécheresse, les activités de la SOD et de la catalase augmentaient en réponse à un stress hydrique. Les activités spécifiques variaient de manière analogue à l'activité brute. Ces données suggèrent que le clone 'Dorskamp' induit soit une synthèse *de novo* de la SOD, soit une activation post-traductionnelle d'enzymes préexistantes. L'augmentation de l'activité enzymatique de la SOD mesurée principalement chez le clone 'Dorskamp' semble essentiellement due aux isoformes Fe-SOD et Mn-SOD. Ces isoformes sont présentes dans les compartiments particulièrement sensibles pour cette activité : les chloroplastes et les mitochondries. De tels résultats avaient déjà été observés pour la pomme de terre alors que, pour le pois, la sécheresse entraînait une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'isoforme Cu/Zn (Martinez *et al.* 2001).

Les deux clones sont également différents en termes d'intensité de contrainte à partir de laquelle les activités enzymatiques sont stimulées. Pour le clone 'Luisa_Avanzo', l'activité de la peroxydase des feuilles en croissance est stimulée pour les Ψ_{wp} de -1 MPa uniquement. Pour le clone 'Dorskamp', en revanche, les activités de la SOD et de la catalase des jeunes feuilles adultes et de la peroxydase des feuilles en croissance sont stimulées pour les Ψ_{wp} inférieurs ou égaux à -2 MPa. Ces résultats sont corroborés par l'évolution des quantités des isoformes de la SOD durant la sécheresse : les trois isoformes augmentent parallèlement à l'intensité de la contrainte pour le clone 'Dorskamp' alors

qu'elles présentent un maximum pour les Ψ_{wp} intermédiaires pour le clone 'Luisa_Avanzo'. Il semble que, dès les contraintes moyennes (Ψ_{wp} proches de -1 MPa), les enzymes du clone 'Luisa_Avanzo' aient atteint leur maximum d'activité. Pour des contraintes plus importantes, les activités enzymatiques semblent inhibées.

En résumé, les jeunes feuilles adultes se démarquent des feuilles en croissance en modulant à la fois la synthèse de protéines et l'activité de certaines enzymes en réponse à la sécheresse. Les deux clones se distinguent par la nature des enzymes stimulées durant la sécheresse : le clone 'Luisa_Avanzo' favorise la peroxydase alors que le clone 'Dorskamp' privilégie la SOD et la catalase. Il apparaît enfin que la synthèse et l'activité des enzymes soit stimulée jusqu'aux plus faibles Ψ_{wp} chez le clone 'Dorskamp' alors que chez le clone 'Luisa_Avanzo' les maxima des activités enzymatiques sont atteints pour des Ψ_{wp} intermédiaires ($\Psi_{wp} \approx -1$ MPa).

5.2. Composition phénolique des feuilles et pouvoir antioxydant

5.2.1. Matériel et méthodes

5.2.1.1. Matériel végétal

L'étude de la composition phénolique et de son pouvoir antioxydant a été effectuée à partir des mêmes extraits méthanoliques que ceux utilisés pour le dosage des oses solubles (paragraphe 4.1.2). Dans le cas des analyses phénoliques, nous nous sommes limités aux extraits provenant d'une feuille en croissance (Index Foliaire = $1,42 \pm 0,15$) et d'une jeune feuille adulte (Index Foliaire = $7,59 \pm 0,27$) lors du premier cycle sécheresse / ré-arrosage. Pour chaque clone et chaque étage de feuilles, quatre classes de potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{wp}) ont été étudiées : (1) $-0,59 \pm 0,01$ MPa ; (2) $-0,94 \pm 0,01$ MPa ; (3) $-1,41 \pm 0,04$ MPa ; (4) $-2,52 \pm 0,25$ MPa. Trois répétitions par clone, par étage de feuilles et par classe de Ψ_{wp} ont été traitées.

5.2.1.2. Dosage des flavanols

En milieu fortement acide, la fonction aldéhyde du 4-(diméthylamino)cinnamaldéhyde (DMACA) se condense spécifiquement avec les noyaux aromatiques des flavan-3-ols, flavan-diols et procyanidines. Les produits de la réaction sont des composés bleus dont le spectre d'absorption présente un maximum à 637 nm (Treutter 1989, Treutter *et al.* 1994).

Le réactif a été préparé à partir de 50 mg de DMACA⁷ dissous dans 5 mL d'une solution méthanolique d'acide sulfurique 1,5 M (8,6 mL d'acide sulfurique 96 % ajoutés à 91,4 mL de méthanol pur). Des volumes de 10 à 50 μ L d'extrait ont été complétés à 250 μ L avec du méthanol 80 % dans les puits à fonds plats de plaques de microtitration. Vingt microlitres de réactif ont été ajoutés. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 637 nm. Les résultats ont été exprimés en milligramme Équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg Eq Cat g^{-1}_{MS}) et en milligramme Équivalent catéchine par mètre carré de surface foliaire (mg Eq Cat cm^{-2}) à partir d'une gamme de (+)-catéchine⁷ de 0 à 40 μ g mL^{-1} en solution dans le méthanol.

5.2.1.3. Analyse par HPLC de la composition phénolique des extraits

Les composés phénoliques des extraits méthanoliques ont été séparés par RP-HPLC et dosés par spectrométrie d'absorption à 280 nm (Hewlett-Packard® Séries HP 1100)

⁷ Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (DMACA, (+)-catéchine).

(Figure 1.18, A). La phase stationnaire était composée d'un monolithe de silice poreux dont la surface est recouverte de chaînes aliphatiques à 18 atomes de carbone, le tout inclus dans une colonne de 100 mm de long et de 4,6 mm de diamètre interne [Chromolith™ Performance RP-18e 100-4,6 (Merck)]. Cette colonne était précédée d'une pré-colonne Chromolith™ Guard Cartridge RP-18e 10-4,6 (Merck). La phase mobile était un éluant dont la proportion en solvant hydroorganique (acétonitrile⁸ / acide acétique⁸ / eau ultra pure 5:1:194 v/v/v) et en solvant organique (acétonitrile) variait en 30 min selon le gradient décrit Figure 1.18, B. Le débit de l'éluant était fixé à 2 mL min⁻¹. Des volumes de 20 µL d'un mélange contenant 95 µL d'extrait et 5 µL d'une solution de coumarine⁸ à 0,25 mg mL⁻¹ servant de standard interne, ont été injectés. Les concentrations des composés présents dans les extraits ont été exprimées en milligramme Équivalent coumarine par gramme de matière sèche (mg Eq coum g⁻¹_{MS}) et en milligramme Équivalent coumarine par mètre carré de surface foliaire (mg Eq coum m⁻²).

5.2.1.4. Estimation du pouvoir antioxydant

La capacité de protection des extraits phénoliques vis-à-vis des radicaux peroxydes a été estimée *in vitro* par la méthode d'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène (adaptée de Miller 1971). L'acide linoléique s'oxyde au simple contact de l'oxygène de l'air. Ce phénomène, en 3 étapes, est générateur de radicaux peroxydes (Figure 1.19). L'étape d'initiation correspond à la perte d'un atome d'hydrogène (H·) par l'acide linoléique (LH). Le produit de cette réaction (L·) réagit très facilement avec l'oxygène de l'air pour former le radical peroxyde (LOO·) qui peut, à son tour, réagir avec l'acide linoléique et former des hydro-péroxydes (LOOH) (phase de propagation). La phase de terminaison intervient quand l'acide linoléique devient limitant et mène à la synthèse de composés plus stables. L'oxydation du β-carotène, induite par les hydro-péroxydes formés au cours de l'auto-oxydation de l'acide linoléique, mène à une modification de ses propriétés : le β-carotène est orange sous forme réduite avec un maximum d'absorption à 470 nm et incolore sous forme oxydée. Le dosage consiste à mesurer le ralentissement de la décoloration du β-carotène à 470 nm sous l'effet d'un volume constant d'extrait phénolique susceptible de prévenir l'oxydation de l'acide linoléique par rapport à un même volume de méthanol 80 %.

⁸ Réactifs et produits chimiques de qualité HPLC fournis par Fisher Scientific (acétonitrile), Carlo Erba (acide acétique) et Sigma-Aldrich (coumarine).

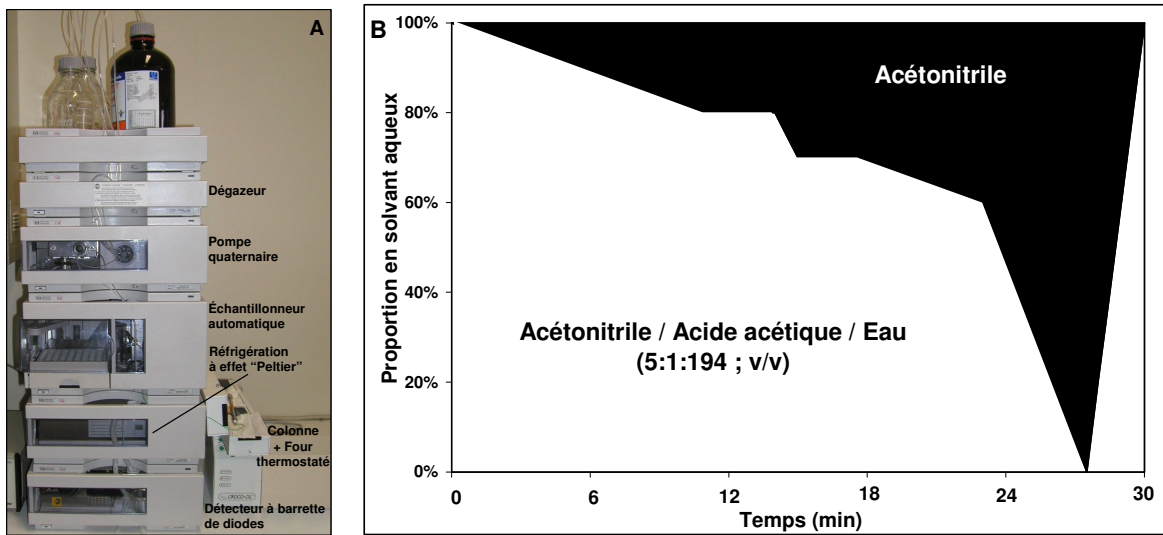


Figure 1.18. A : Dispositif HPLC (Hewlett-Packard® Séries HP 1100) ; B : gradient d'élution des composés phénoliques présents dans les extraits de feuilles de 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' (B). Les proportions en solvants organohydrophile (blanc : acétonitrile / acide acétique / eau 5:1:194 ; v/v) et organique (noir : acétonitrile) sont représentées en fonction du temps d'analyse.

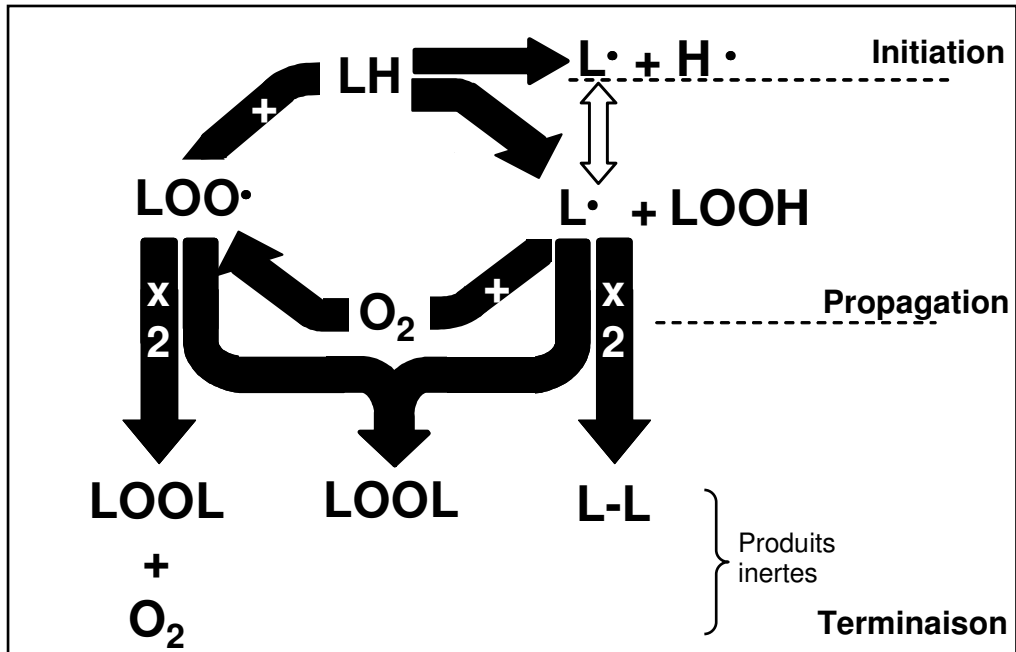


Figure 1.19. Schéma simplifié du processus d'auto-oxydation de l'acide linoléique (LH) intervenant lors du dosage du pouvoir antioxydant. D'après Torel *et al.* 1986.

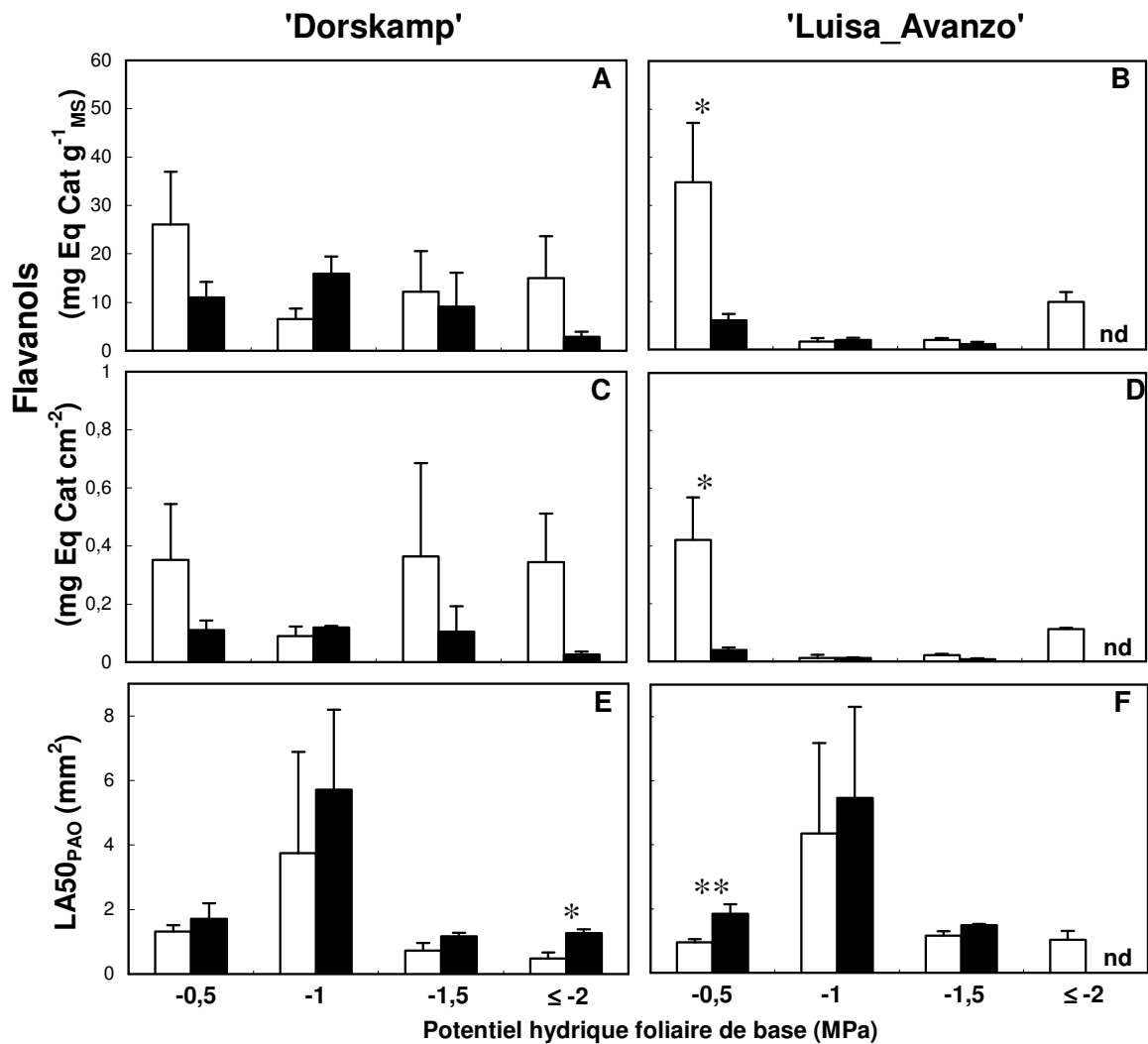


Figure 1.20. Teneurs en flavanols (A à D) et pouvoir antioxydant (E et F) des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Le pouvoir antioxydant est exprimé par la LA50_{PAO} qui correspond à la surface foliaire permettant la protection de 50 % du β -carotène lors du dosage. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (**) pour $P \leq 0,01$. Les teneurs en flavanols et la LA50_{PAO} des jeunes feuilles adultes de 'Luisa_Avanzo' pour $\Psi_{wp} \leq -2$ MPa n'ont pas été déterminées (nd).

Dans un tube bouché, 750 μL de β -carotène⁹ en solution dans du chloroforme⁸ (0,2 mg mL⁻¹) ont été ajoutés à 10 mg d'acide linoléique⁸ et 100 mg de Tween 40⁸ [polyoxyéthylène(20) sorbitan monopalmitate] complétaient le mélange. Le chloroforme a ensuite été évaporé en le plaçant 10 minutes sous flux d'azote. Le mélange a été complété à 25 mL avec de l'eau distillée et vivement agité 10 secondes. Dans les puits à fonds plats de plaques de microtitration, des volumes de 10 μL d'extrait méthanolique ont été ajustés à 25 μL avec du méthanol 80 % puis à 250 μL avec l'émulsion d'acide linoléique / β -carotène. Le témoin blanc était constitué d'une solution dépourvue d'extrait et de β -carotène. Les absorbances des solutions, thermostatées à 50°C, ont été mesurées à 470 nm toutes les 15 minutes pendant 45 minutes avec un spectrophotomètre à microplaque (*μ Quant*) et le logiciel d'analyse de données KC4 (BIOTEK). Le pouvoir antioxydant correspondait au ralentissement de la décoloration liée à l'extrait par rapport à un témoin méthanol 80 % seul (Figure 1.13, page 69). Les résultats ont été exprimés par unité de surface foliaire permettant la protection de 50 % du β -carotène lors du dosage (LA50_{PAO}).

5.2.2. Résultats

5.2.2.1. Teneurs en flavanols

En conditions témoin, les teneurs en flavanols des feuilles en croissance des deux clones étaient supérieures ou égales à celles des jeunes feuilles adultes (Figure 1.20, A à D). Les teneurs ne différaient pas entre clones. En réponse à une sécheresse d'intensité modérée ($\Psi_{\text{wp}} = -1$ MPa), les teneurs en flavanols des feuilles en croissance des deux clones étaient réduites. À ce niveau, les teneurs étaient significativement inférieures pour le clone 'Luisa_Avanzo' par rapport au clone 'Dorskamp'. Au-delà de -1 MPa, seules les teneurs en flavanols des feuilles en croissance du clone 'Dorskamp' augmentaient.

5.2.2.2. Composition phénolique par HPLC

Tous chromatogrammes confondus, 27 pics ont été retenus et analysés en fonction du traitement (4 classes de potentiels hydriques foliaires de base, Ψ_{wp}), de l'âge de feuilles (en croissance/jeunes adultes) et du clone ('Luisa_Avanzo'/'Dorskamp') (Figures 1.21 et 1.22, A). Ne connaissant pas les coefficients d'absorption molaire de ces composés, les

⁹ Réactifs et produits chimiques fournis par Sigma-Aldrich (*trans*- β -carotène, acide linoléique, Tween 40) et Labosi (chloroforme).

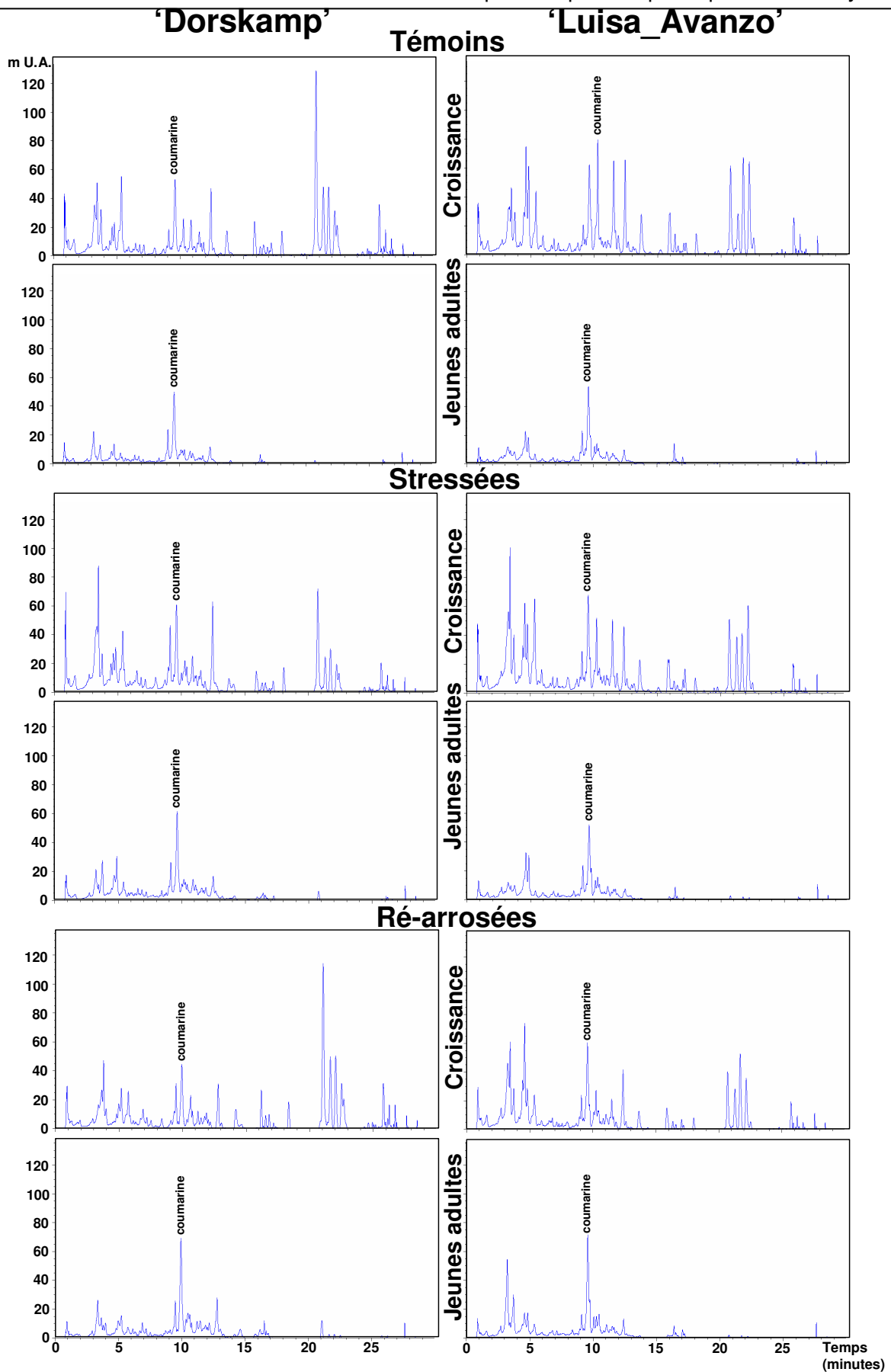


Figure 1.21. Profils d'éluion (HPLC – RP-18e) avec détection par absorption à 280 nm, d'extraits de feuilles en croissance et de jeunes feuilles adultes issues de boutures témoin, stressées et ré-arrosées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. Le pic du standard interne (coumarine) est indiqué.

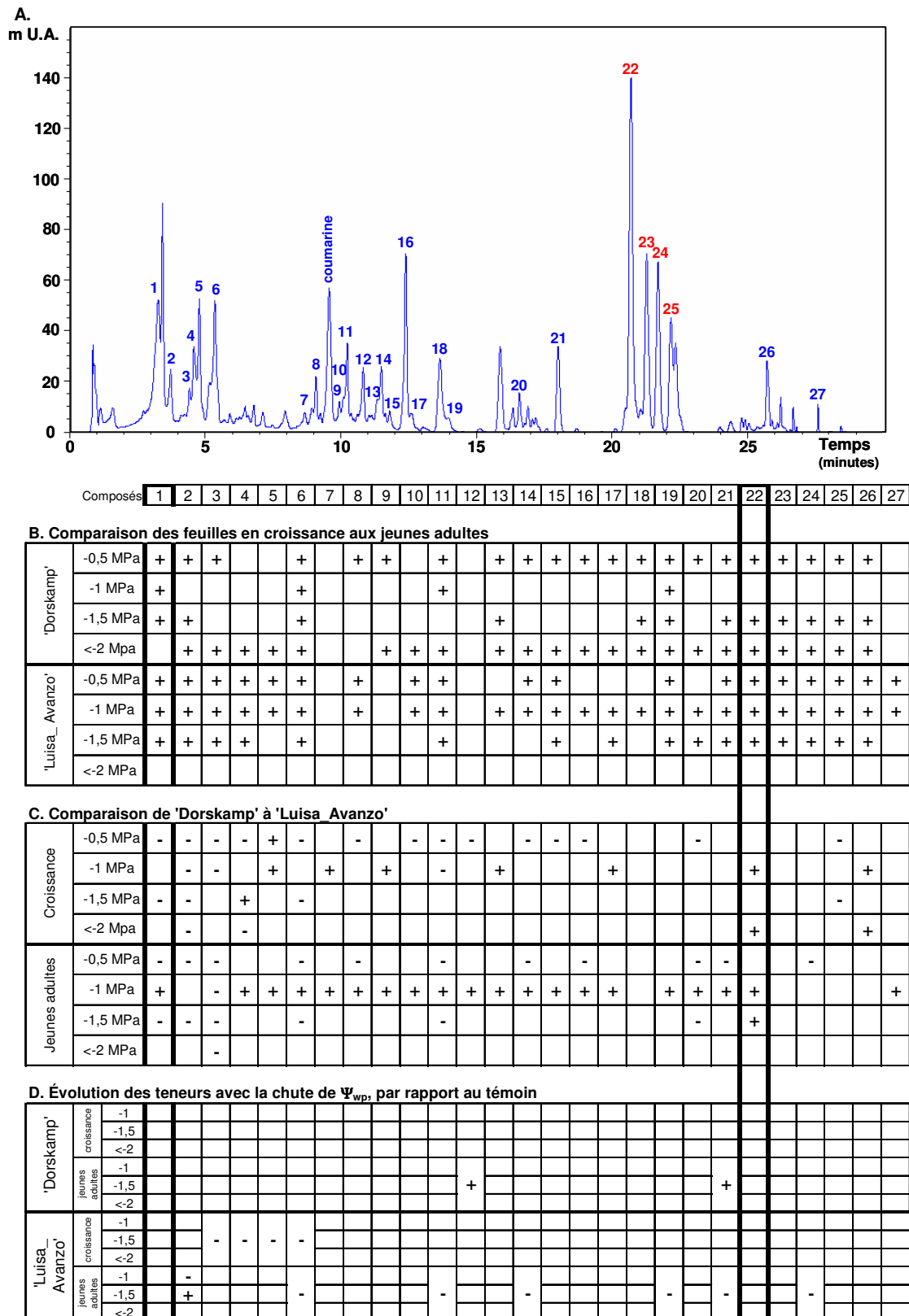


Figure 1.22. Les 27 pics quantifiés à partir des chromatogrammes HPLC (A) et les différences significatives ($P \leq 0,05$) entre âges de feuilles (B), entre clones (C) et entre traitements (D) pour chacun des pics. Les signes « + » indiquent des teneurs plus élevées pour les feuilles en croissance par rapport aux jeunes adultes (dans le Tableau B), des teneurs plus importantes pour le clone 'Dorskamp' par rapport au clone 'Luisa_Avanzo' (dans le Tableau C) et une augmentation durant la sécheresse par rapport au témoin (dans le Tableau D) ; inversement pour les signes « - » ; une absence de signe correspond à une absence de différence significative.

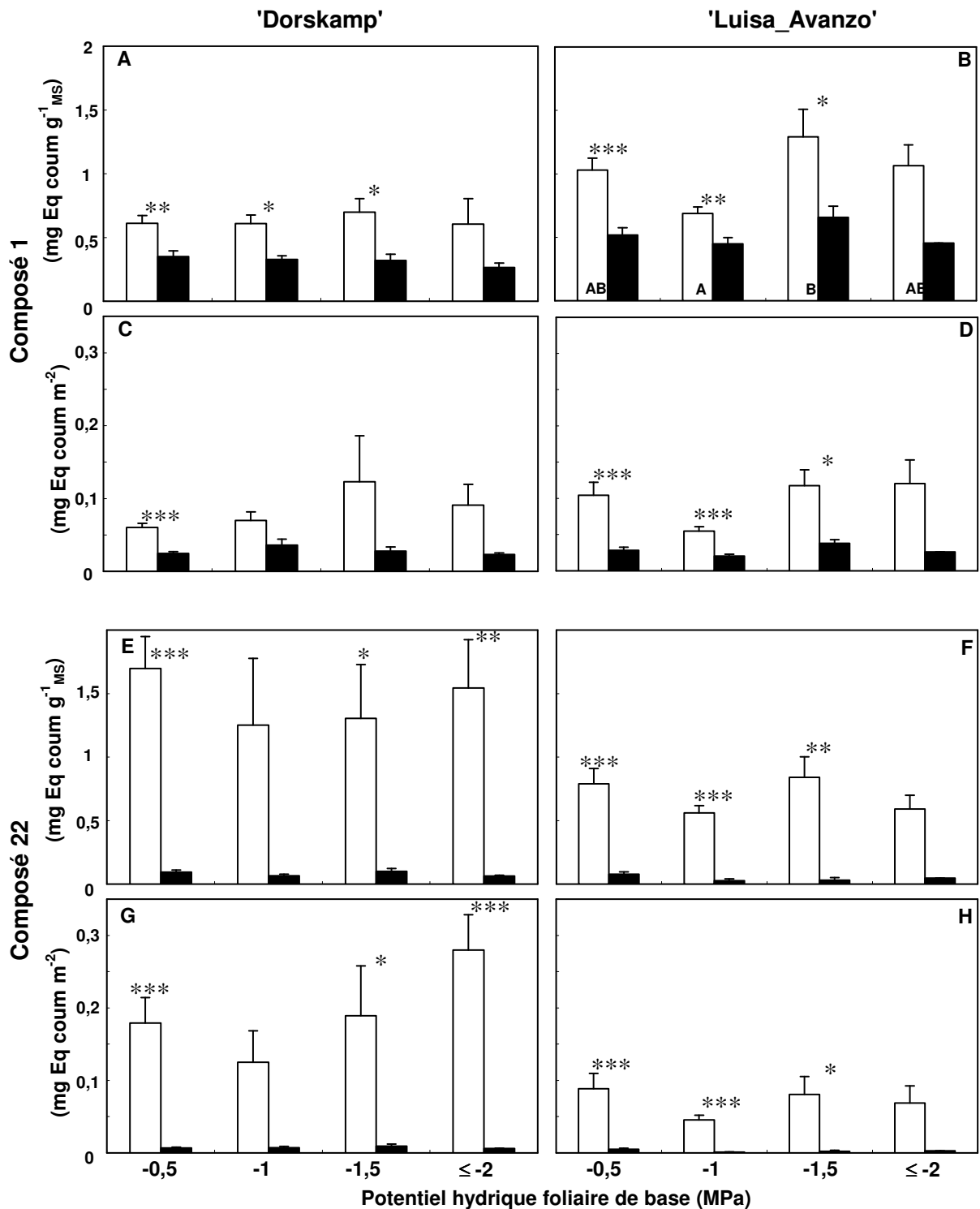


Figure 1.23. Teneurs massiques (A, B, E et F) et surfaciques (C, D, G et H) en composés correspondant aux pics 1 (A à D) et 22 (E à H) détectés par HPLC – RP-18e, des feuilles en croissance (blanc) et jeunes adultes (noir) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo', en fonction du potentiel hydrique foliaire de base. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre âges de feuilles sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les différences significatives entre classes de potentiels hydriques foliaires de base pour les feuilles en croissance sont indiquées par des lettres différentes.

comparaisons entre pics n'ont pas pu être abordées. Globalement, le passage des feuilles du stade 'en croissance' au stade 'adulte' entraînait une réduction drastique de leurs teneurs en composés phénoliques quel que soit le clone et le traitement (Figures 1.21 et 1.22, B). Les pics 22 à 25 étaient notamment les seuls à n'être présents que pour les feuilles en croissance. En conditions témoin ($\Psi_{wp} \approx -0,5$ MPa), les feuilles en croissance et les jeunes feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo' présentaient des teneurs significativement supérieures à celles du clone 'Dorskamp' (Figure 1.22, C). Néanmoins, seul le clone 'Luisa_Avanzo' montrait une réduction significative de sa composition phénolique globale en réponse à un abaissement de Ψ_{wp} (Figure 1.22, D). De ce fait, pour les Ψ_{wp} proches de -1 MPa, les teneurs en composés phénoliques du clone 'Dorskamp' devenaient significativement supérieures à celles du clone 'Luisa_Avanzo' (Figure 1.22, C).

Quantitativement, seuls les pics numérotés 1 et 22 ont été détaillés. Le choix de ces composés a été conditionné par le fait que leurs teneurs différaient significativement entre les deux clones et entre les deux étages de feuilles, le composé correspondant au pic 22 étant totalement absent pour les jeunes feuilles adultes (Figures 1.21 et 1.22). Les teneurs du composé 1 variaient également en fonction du Ψ_{wp} . Les résultats sont représentés par unité de surface foliaire et par unité de masse sèche de feuille (Figure 1.23). Le composé correspondant au pic 22 était jusqu'à 4 fois plus concentré pour le clone 'Dorskamp' par rapport au clone 'Luisa_Avanzo'. Pour les feuilles en croissance du clone 'Luisa_Avanzo', la teneur du composé 1 exprimée par unité de masse sèche de feuille augmentait significativement lorsque le Ψ_{wp} chutait de -1 MPa à -1,5 MPa (Figure 1.22, D).

5.2.2.3. Pouvoir antioxydant

En conditions témoin, le pouvoir antioxydant ne différait ni entre clones, ni entre feuilles en croissance et jeunes feuilles adultes (Figure 1.20, E et F). Pour les deux clones, les deux catégories de feuille et les Ψ_{wp} proches de -1 MPa, une surface foliaire deux fois supérieure était nécessaire pour procurer une protection antioxydante équivalente aux conditions témoin ou aux Ψ_{wp} plus faibles.

5.2.3. Discussion

Les composés phénoliques sont des molécules à structure aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles pouvant être glycosylés ou méthylés dans le cas des polyphénols. Parmi eux, les flavonoïdes constituent la famille la plus importante avec près de 4 000 structures, soit près de la moitié des composés phénoliques connus actuellement (Bors *et al.* 1990, Harbone 1991). Toutes ces molécules découlent d'une même voie de biosynthèse contrôlée par la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) (Figure 1.24). Les composés phénoliques semblent associés à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la différenciation organogène, la lignification, la dormance des bourgeons, la floraison ou la tubérisation (Nitsch et Nitsch 1961, Alibert *et al.* 1977). De plus, la structure chimique et la localisation cellulaire (vacuolaire, chloroplastique et périplasmique) des composés phénoliques leur confèrent des propriétés protectrices contre les dommages oxydatifs. Ils peuvent, d'une part, chélater les ions Fe^{2+} et Cu^{2+} et ainsi empêcher la réaction de Fenton (Figure 1.2, page 30), et, d'autre part, agir directement comme antioxydants (Bors *et al.* 1990, Rice-Evans *et al.* 1995 et 1997). Il a été montré que l'activité de la PAL et la synthèse de certains composés tels que l'acide chlorogénique ou la quercitrine étaient stimulées en réponse à des stress à l'ozone ou aux UV-B (Biagioni *et al.* 1997, Dawar *et al.* 1998). Pour le peuplier, une évolution conjointe de la composition phénolique des feuilles et de leur pouvoir antioxydant a été observée en conditions de sécheresse, suggérant que les composés phénoliques pourraient être partiellement responsables des variations de capacités antioxydantes des feuilles durant la sécheresse (Marron *et al.* 2002).

5.2.3.1. Intervention des composés phénoliques dans le développement de la feuille

En atteignant leur taille adulte, les feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' subissent un véritable remaniement phénolique se traduisant essentiellement par une réduction drastique de tous les composés séparés par HPLC et par la disparition complète de certaines molécules telles que celles correspondant aux pics numérotés de 22 à 25 (Figure 1.22, A). Les composés phénoliques regroupent des milliers de molécules. Néanmoins, la position relative des pics des chromatogrammes et les spectres d'absorption nous permettent d'émettre des hypothèses quant à la nature des molécules. Les composés élués de façon précoce lors de l'analyse présentaient des spectres d'absorption dont le maximum était situé aux alentours de 280 nm, longueur d'onde caractéristique de la

famille des flavonoïdes (Ribéreau-Gayon 1968). Les composés élués tardivement, parmi lesquels les composés 22 à 25, montraient un maximum d'absorption situé entre 290 et 330 nm (Figure 1.25), révélateur d'acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxycinnamiques étant des précurseurs des lignines, leur polymérisation pourrait expliquer leur disparition entre le stade de croissance et le stade adulte. En effet, le passage des feuilles à l'état adulte s'accompagne de l'apparition d'éléments de xylème différenciés qui constituent le métaxylème. Ces éléments se distinguent de ceux présents au cours de la phase de croissance par une lignification beaucoup plus importante de leur paroi qui n'autorise plus la croissance de l'organe. Pour *P. deltoides*, Meyer et Montgomery ont observé en 1987 des teneurs en phénols totaux jusqu'à trois fois supérieures pour les feuilles d'index foliaire égal à 1 par rapport à celles indexées 9. Parmi ces composés phénoliques, les flavonoïdes étaient faiblement représentés. Les auteurs concluaient que l'arbre concentrait ses défenses contre les herbivores dans ses feuilles en expansion. Pour le saule (*Salix babylonica*) au contraire, les teneurs en phénols totaux ont tendance à augmenter avec le vieillissement des feuilles (Sharma et Vaid 1997). Il a, de plus, été montré chez le tabac que, en plus de participer à la différenciation, les acides hydroxycinnamiques contribuaient à la protection des cellules contre les attaques radicalaires (Tamagnone *et al.* 1998).

5.2.3.2. Intervention des composés phénoliques durant la sécheresse

Les deux clones et les deux stades de développement des feuilles, en croissance et jeunes adultes, présentaient un pouvoir antioxydant relativement équivalent qui n'évoluait pour ainsi dire pas avec la contrainte hydrique (Figure 1.20). La sécheresse entraînait principalement une réduction des teneurs en composés phénoliques des feuilles de 'Luisa_Avanzo' (Figures 1.20 et 1.22). Il s'avère donc difficile de justifier de l'intervention des composés phénoliques dans le pouvoir antioxydant des extraits. En revanche, la réduction des teneurs de certains des composés détectés par HPLC et des flavanols en réponse à une contrainte modérée ($\Psi_{wp} \approx -1$ MPa), essentiellement pour le clone 'Luisa_Avanzo', peut laisser supposer que la sécheresse pourrait accélérer le processus de lignification. Cette hypothèse est à rapprocher de l'importante diminution des SLA de ce clone durant la sécheresse, révélatrice d'une densification des feuilles pouvant être due, au moins en partie, à un épaississement des parois cellulaires auquel pourrait participer les acides hydroxycinnamiques. En réponse à la sécheresse, l'épaississement des parois cellulaires est un phénomène couramment observé (Niinemets 2001). Il a également

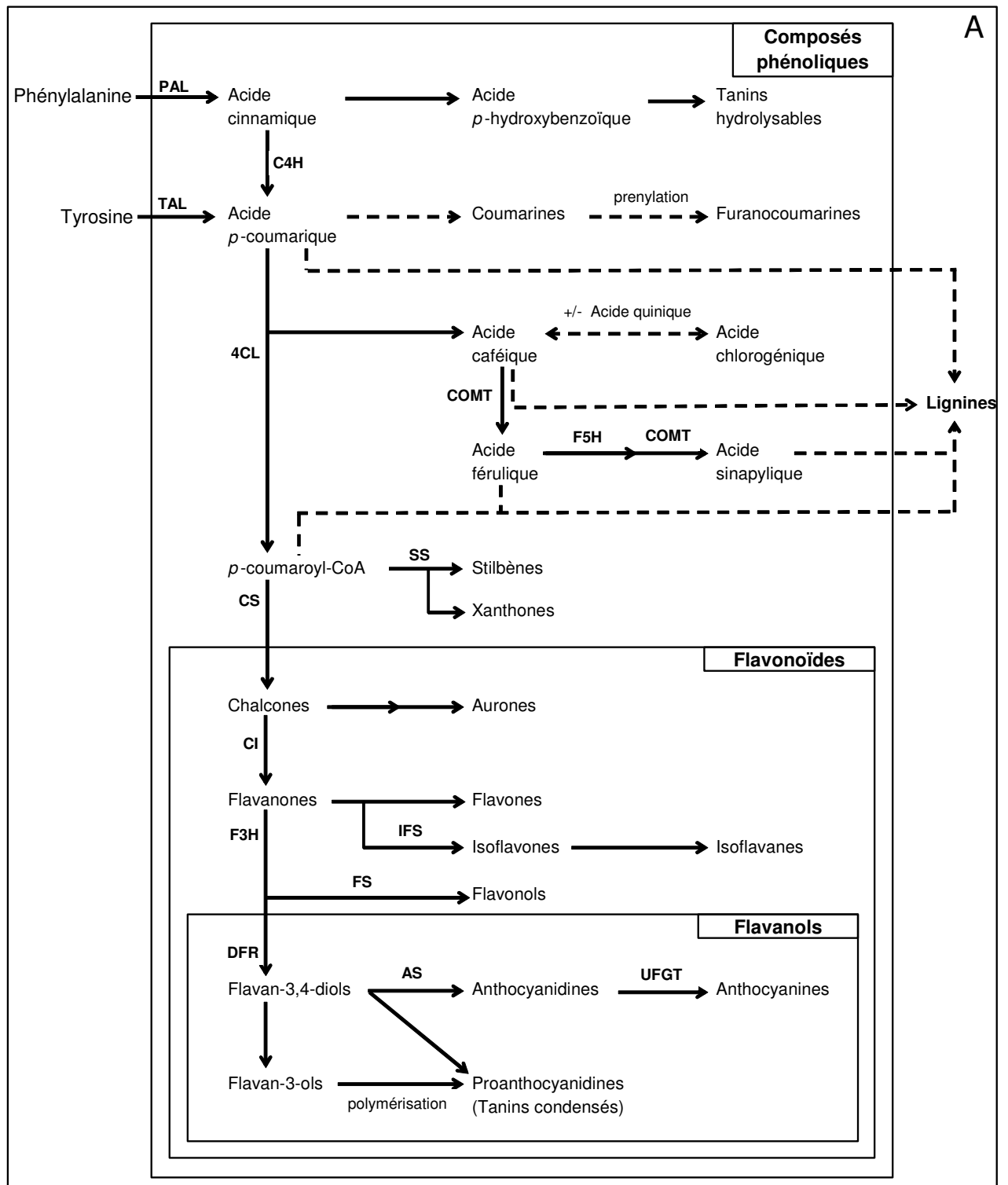
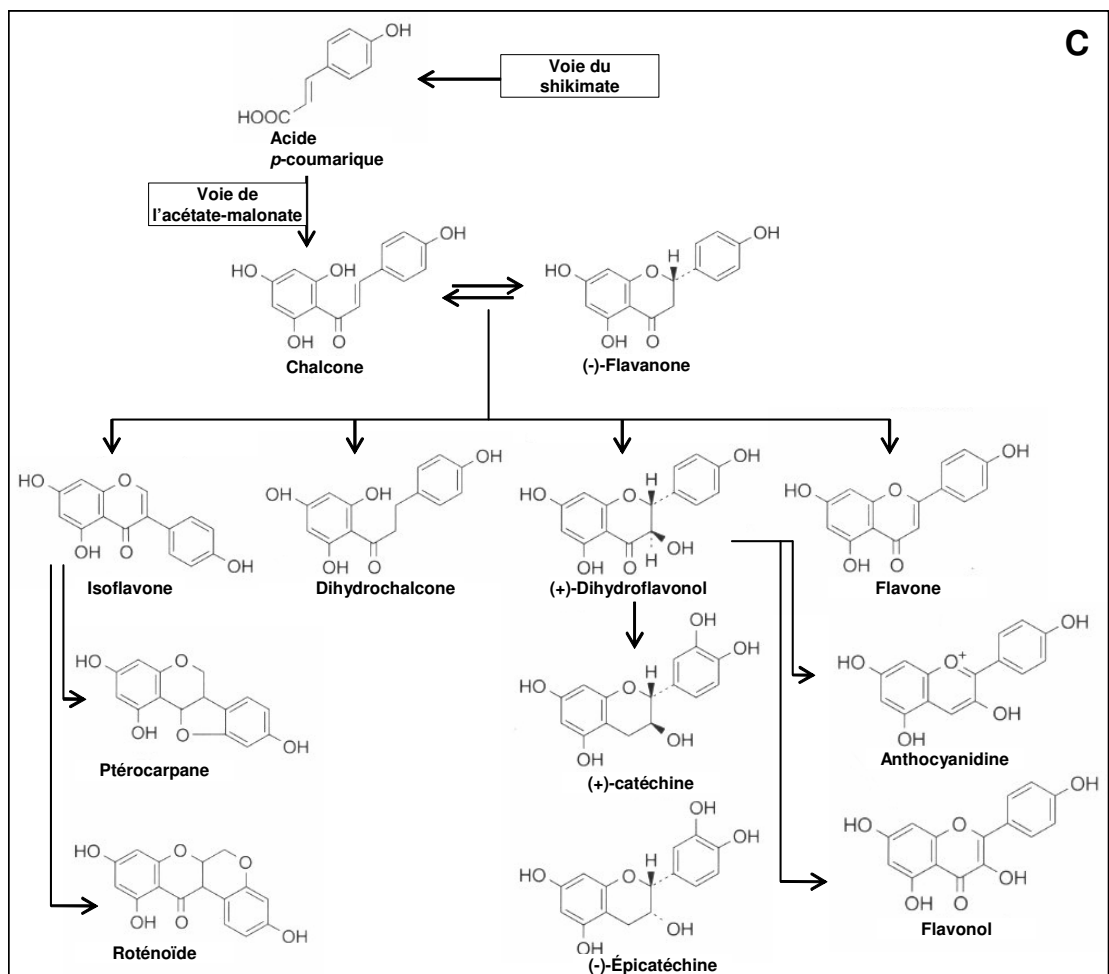
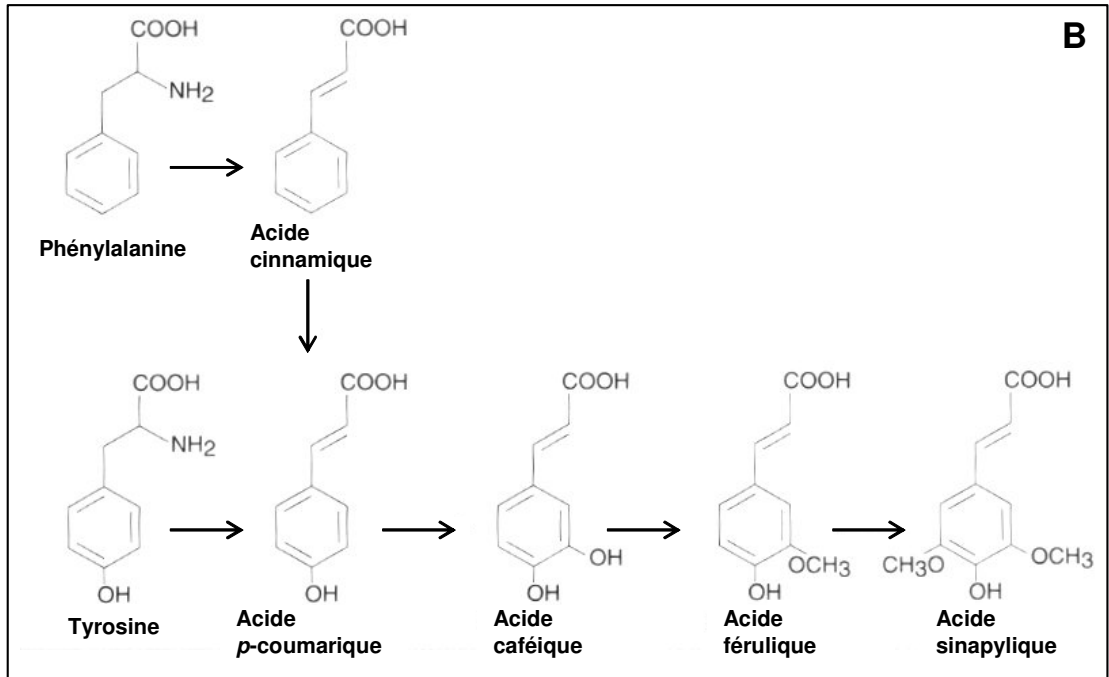


Figure 1.24. A : Schéma simplifié de la biosynthèse des composés phénoliques (d'après Harbone 1991, Dixon Paiva 1995 et Cooper-Driver *et al.* 1998) ; B : Intermédiaires de la biosynthèse des phénylpropanoïdes (d'après Rice-Evans *et al.* 1997) ; C : Relations entre les classes de flavonoïdes (d'après Rice-Evans *et al.* 1997). Les flèches indiquent les voies de biosynthèse principales. **PAL** : Phénylalanine Ammonia Lyase ; **TAL** : Tyrosine Ammonia Lyase ; **C4H** : Cinnamate 4-Hydroxylase ; **4CL** : Coumarate:Coenzyme A Ligase ; **COMT** : Acide



Caféique *O*-MéthylTransférase ; **F5H** : Acide Férulique 5-Hydroxylase ; **SS** : Stilbène Synthase ; **CS** : Chalcone Synthase ; **CI** : Chalcone Isomérase ; **IFS** : Isoflavone Synthase ; **F3H** : Flavone 3-Hydroxylase ; **FS** : Flavonol Synthase ; **DFR** : Déshydroflavonol réductase ; **AS** : Anthocyanine Synthase ; **UFGT** : UDP-glucose Flavanol 3-*O*-Glucosyl Transférase.

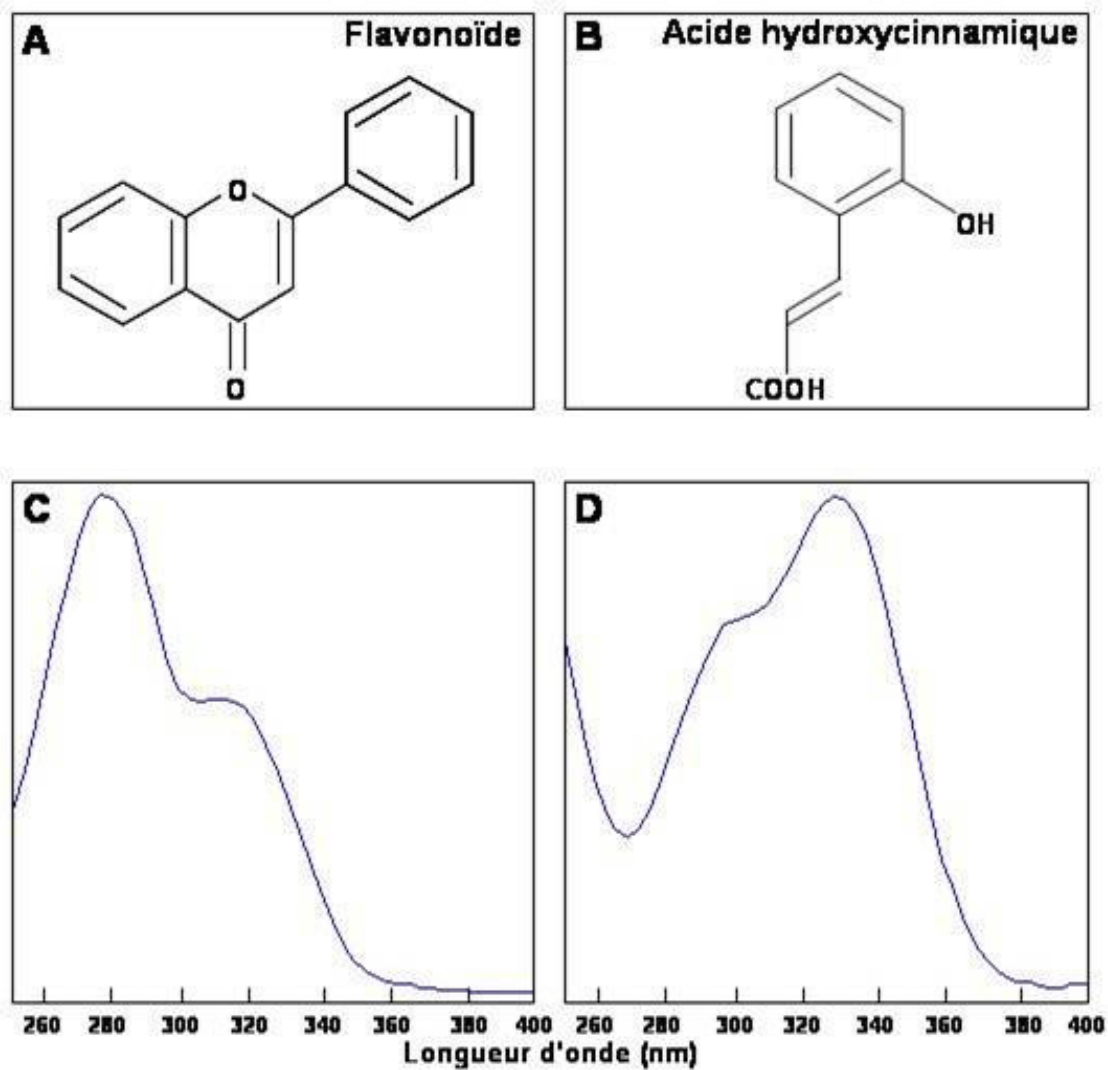


Figure 1.25. Formules développées de flavonoïde (A) et d'acide hydroxycinnamique (B) ; exemples de spectres d'absorption type de flavonoïde (C) et d'acide hydroxycinnamique (D).

été montré que de faibles SLA en conditions de sécheresse permettent le maintien plus efficace des RWC foliaires, mais les bases physiologiques de cette observation ne sont pas connues (Nautiyal *et al.* 2002). Une lignification accrue, frein à la croissance, pourrait également expliquer le fait que les feuilles mises en place par le clone 'Luisa_Avanzo' durant la sécheresse aient une taille inférieure à celle des boutures témoin, alors que la taille de celles du clone 'Dorskamp' n'étaient quasiment pas réduite par la sécheresse (Marron *et al.* 2003).

5.2.4. Conclusion

Les teneurs en composés phénoliques et en protéines ainsi que les activités enzymatiques sont intimement liées au stade de développement des feuilles (Figure 1.26). Qualitativement, l'activité de la peroxydase est favorisée dans les feuilles en croissance, alors que les activités de la SOD et de la catalase s'expriment préférentiellement dans les jeunes feuilles adultes. Quantitativement, les feuilles en croissance présentent des teneurs en composés phénoliques beaucoup plus importantes que les jeunes feuilles adultes alors que ces dernières sont nettement plus riches en protéines que les feuilles en croissance. Les activités plus importantes de la SOD et de la catalase observées pour les jeunes feuilles adultes sont peut-être dues à une quantité d'enzyme plus importante que pour les feuilles en croissance plutôt qu'à l'activité spécifique de l'enzyme.

Les compositions phénoliques et protéiques, et les activités enzymatiques (SOD, peroxydase et catalase) des feuilles des deux clones différaient non seulement constitutivement, mais aussi dans leur façon d'évoluer en réponse à la sécheresse. En l'absence de contrainte, les jeunes feuilles adultes du clone 'Luisa_Avanzo' présentaient des teneurs en protéines et en composés phénoliques significativement plus élevées que celles du clone 'Dorskamp'. Alors que les feuilles en croissance des deux clones stimulent l'activité de la peroxydase en réponse à la sécheresse, seules les jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp' voient leurs activités de la SOD et de la catalase augmenter. Néanmoins, pour les Ψ_{wp} proches de -1 MPa, les teneurs de l'ensemble des composés du clone 'Dorskamp' devenaient significativement supérieures à celles du clone 'Luisa_Avanzo' pour les deux catégories de feuilles.

Ainsi, la sécheresse affecte l'activité de la peroxydase des feuilles en croissance des deux clones. Dans le cas des jeunes feuilles adultes, le clone 'Luisa_Avanzo' présente des teneurs foliaires en protéines et en phénols plus élevées que celles du clone 'Dorskamp' en

l'absence de contrainte. Néanmoins, dès les contraintes d'intensités modérées ($\Psi_{wp} \approx -1$ MPa), les teneurs sont réduites à un niveau inférieur à celui du clone 'Dorskamp' et les activités enzymatiques n'évoluent plus. En conditions de sécheresse plus poussée, le clone 'Dorskamp' uniquement est capable de stimuler l'activité de la SOD et de la catalase.

Pour le clone 'Luisa_Avanzo' et essentiellement pour ses jeunes feuilles adultes, une sécheresse poussée ($\Psi_{wp} \leq -2$ MPa) n'entraîne que peu de stimulation de ces défenses antioxydantes, du moins en ce qui concerne les molécules étudiées ici. Ces résultats sont à rapprocher de la plus grande sensibilité à la sécheresse de ce clone (Terrasson 1988, Soulères 1992, Brignolas *et al.* 2000, Marron *et al.* 2002 et 2003). Néanmoins, dans cette expérience, le pouvoir antioxydant des deux cultivars et des deux étages de feuilles était équivalent. Il serait intéressant d'aborder l'étude d'autres molécules connues pour intervenir dans la voie enzymatique (déshydroascorbate réductase, mono déshydroascorbate réductase, glutathion réductase) et non enzymatique (proline, ascorbate, glutathion, α -tocophérol...) de détoxification des formes activées de l'oxygène. De plus, et bien que l'intensité de la contrainte subie par les boutures (estimée par la chute de Ψ_{wp}) et par les feuilles (estimée par la chute de RWC) des deux clones ait été équivalente durant la sécheresse, il demeure l'incertitude de savoir si, au niveau de la feuille, l'intensité de la contrainte oxydative a été similaire pour les deux clones et pour toutes les feuilles du plant.

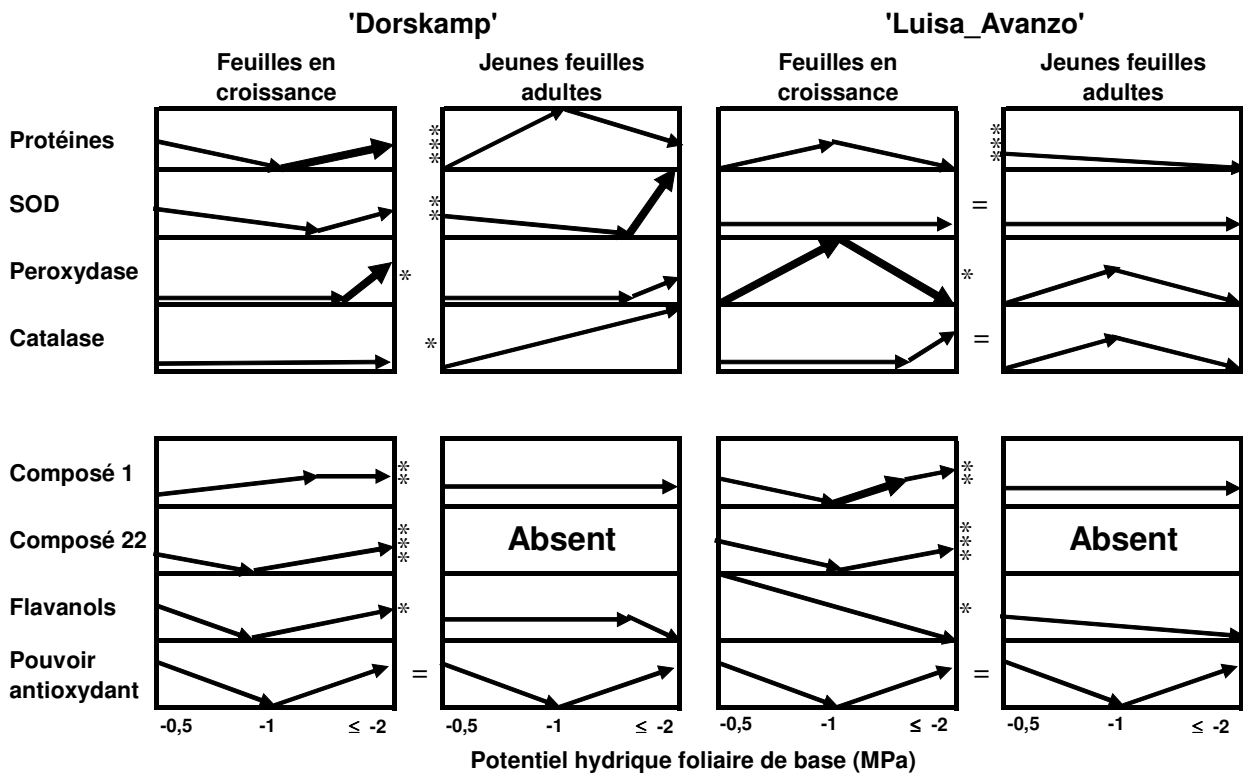


Figure 1.26. Tendances de l'évolution des teneurs en protéines, des activités de la SOD, de la peroxydase et de la catalase, des teneurs en composés 1 et 22 des profils HPLC, en flavanols et du pouvoir antioxydant des feuilles en croissance et jeunes adultes des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en réponse à un abaissement du potentiel hydrique foliaire de base. Les astérisques (* pour $P \leq 0,05$, ** pour $P \leq 0,01$ et *** pour $P \leq 0,001$) indiquent les différences significatives entre stades de développement. Les signes « = » indiquent l'absence de différence significative entre étages de feuilles. Les variations en fonction de la sécheresse sont significatives uniquement lorsqu'elles sont symbolisées par des flèches épaisses.



Figure 1.27. Disposition des boutures des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' à la serre du centre INRA de Champenoux (A) ; disques foliaires des deux clones flottant sur des solutions de Paraquat ou de l'eau distillée (B) ; le fluorimètre PAM 101 (Walz, Allemagne) (C).

6. Tolérance à un stress oxydatif généré artificiellement par du Paraquat

6.1. Matériel et méthodes

6.1.1. Matériel végétal

L'expérience a été réalisée au sein du centre INRA de Nancy. Seize boutures ligneuses de 2 mois des clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' ont été utilisées. En février 2001, les boutures racinées âgées de 1 mois ont été rempotées en pots de 4 litres avec un mélange de tourbe blonde et de sable (3/7, v/v) et fertilisées avec un fertilisant à diffusion lente (N/P/K, 1/1/1) (Nutricote, Puteaux SA, Les Clayes sous Bois). Toutes les boutures ont été placées dans une serre exposée à la lumière naturelle et ont été arrosées manuellement tous les 2 jours (Figure 1.27, A). En mars 2001, les feuilles de chaque bouture ont été numérotées de l'apex (Index Foliaire, FI = 0) vers la base (FI = n) de la tige. Les boutures ont été réparties en 2 lots pour chaque clone :

- Quatre boutures ont été utilisées pour étudier l'effet de la concentration en Paraquat sur la tolérance aux photo-oxydations. Pour ces boutures, les LPI ont été calculés à partir de la formule d'Erickson et Michelini (1957).

- Douze boutures ont servi pour les estimations de l'impact de la sécheresse sur la tolérance aux photo-oxydations. Au jour J_0 (septembre 2001), la sécheresse a été induite par arrêt d'arrosage pour 6 boutures de chaque clone. Les 6 boutures restantes ont été maintenues en conditions hydriques non limitantes et ont constitué les témoins. Tous les 3 jours et pour chaque clone, le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) de 3 boutures témoin et 3 boutures stressées était mesuré. Tous les jours les pots étaient pesés. Au jour J_4 , 3 boutures témoin et 3 boutures stressées des deux clones ont été utilisées pour les estimations de tolérance au Paraquat (stress 1). Pour les boutures stressées restantes, le potentiel hydrique foliaire de base Ψ_{wp} a été maintenu à environ -1 MPa pendant une semaine par ajouts d'eau contrôlés par la pesée des pots. Au jour J_{11} , les 3 boutures témoin et les 3 boutures stressées restantes de chaque clone ont été utilisées pour de nouvelles estimations de tolérance au Paraquat (stress 2).

La teneur relative en chlorophylles de chaque feuille utilisée dans les expériences a été évaluée avec un SPAD-502 (Chlorophyll meter SPAD-502, Minolta).

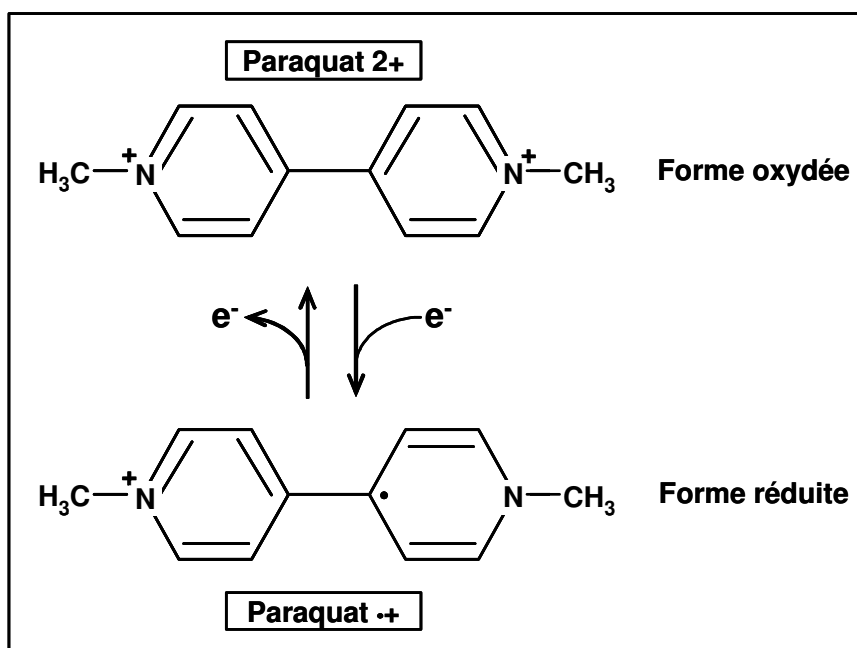


Figure 1.28. Changement d'état d'oxydoréduction du Paraquat par acceptation d'un électron qui est ensuite cédé à l'oxygène, ainsi transformé en anion superoxyde. D'après Allain 2000.

6.1.2. Induction du stress oxydatif

Des disques foliaires des clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' ont été soumis à une gamme d'intensité de contrainte oxydative générée artificiellement par du Paraquat (méthyl viologène). Le Paraquat, ion bipyridinium, est un composé redox-actif photoréduit par le photosystème I puis ré-oxydé par le dioxygène O₂, formant l'anion O₂⁻ par transfert d'électron (Figure 1.2, page 30 et Figure 1.28). La toxicité du Paraquat résulte de réactions délétères des formes activées de l'oxygène sur les composants cellulaires (Babbs *et al.* 1989, Smirnoff 1993, Lascano *et al.* 1998).

6.1.2.1. Effet de la concentration en Paraquat

Trois catégories de feuilles ont été utilisées dans l'expérience, des feuilles en croissance (LPI = 1,93 ± 0,20 pour le clone 'Dorskamp' et 1,75 ± 0,07 pour le clone 'Luisa_Avanzo'), des jeunes feuilles adultes (LPI = 5,56 ± 0,30 pour le clone 'Dorskamp' et 5,25 ± 0,07 pour le clone 'Luisa_Avanzo') et des feuilles adultes âgées (LPI = 11,06 ± 0,50 pour le clone 'Dorskamp' et 11,38 ± 0,40 pour le clone 'Luisa_Avanzo'). Quatre disques foliaires (14 mm de diamètre) ont été découpés à l'emporte-pièce pour chaque feuille, pour chaque bouture et pour chacun des stades de développement précédemment décrits. Les disques ont été incubés 12 heures dans des boîtes de Pétri à l'obscurité et à température ambiante dans 3 concentrations différentes de solutions aqueuses de Paraquat (Sigma-Aldrich) (eau, 5 µM, 20 µM ou 50 µM) (Figure 1.27, B). Ils ont ensuite été transférés dans de l'eau distillée et exposés 2 heures à une source de lumière actinique, induisant la photosynthèse. Les disques ont enfin été remis à l'obscurité pendant 2 heures. Les paramètres de fluorescence ont été mesurés 6 fois à l'obscurité : après 12 heures d'incubation, après 2 heures d'exposition à la lumière et toutes les demi-heures durant la récupération à l'obscurité (Figure 1.29).

6.1.2.2. Effet de la sécheresse

La croissance des plants stressés, réduite par la contrainte hydrique, nous a amené à abandonner l'utilisation du LPI comme indicateur d'âge des feuilles au profit du FI (Index Foliaire). À chacune des deux dates de mesures, des feuilles en croissance (FI = 3,20 ± 0,15), des jeunes feuilles adultes (FI = 8,05 ± 0,13) et des feuilles adultes âgées (FI = 19,58 ± 0,22) ont été utilisées. Pour chacun des stades de développement et chacune des boutures, 2 disques ont été découpés par feuille. Chaque disque a été incubé à l'obscurité

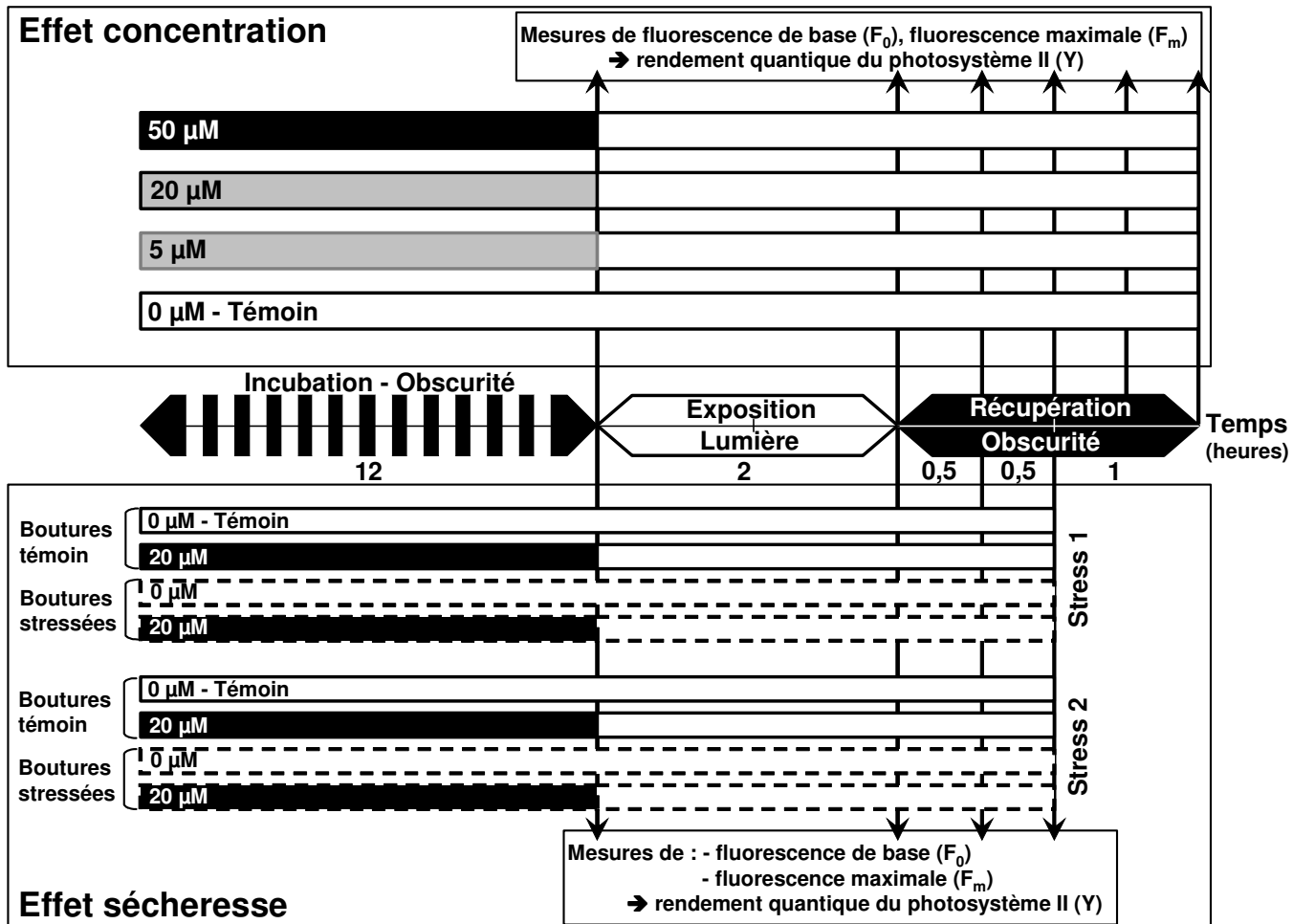


Figure 1.29. Diagramme résumant les protocoles des expériences visant à juger de l'impact de la concentration en Paraquat (en haut) et de l'effet d'une sécheresse préalable (en bas) sur les feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. Le devenir des disques foliaires est indiqué en fonction du temps. Les barres blanches correspondent à l'incubation des disques foliaires dans l'eau distillée et les barres noires et grises, à l'incubation dans le Paraquat. Les barres en pointillés correspondent aux disques foliaires issus de boutures ayant subi la sécheresse. Le stress 1 correspond à un arrêt d'arrosage de 4 jours et le stress 2 correspond au maintien de ce stress une semaine supplémentaire (voir page 50). Les symboles utilisés sont les mêmes que pour les figures 1.31 à 1.34 (en haut) et 1.36 à 1.38 (en bas).

pendant 12 heures dans de l'eau distillée ou une solution aqueuse de Paraquat 20 μM (Figure 1.27, B). Les disques ont ensuite été transférés dans de l'eau distillée et exposés 2 heures à une source de lumière actinique avant d'être replacés à l'obscurité pendant 1 heure. Les paramètres de fluorescence ont été mesurés 4 fois dans les conditions de lumière où se trouvaient les disques au moment de la mesure : après 12 heures d'incubation, après 2 heures d'exposition à la lumière et toutes les 30 minutes durant la récupération à l'obscurité (Figure 1.29).

6.1.3. Détection des effets du stress oxydatif

6.1.3.1. Principe expérimental

Pour l'étude de la tolérance de l'appareil photosynthétique à la contrainte oxydative, l'utilisation de la fluorescence de la chlorophylle *a* s'est avérée un outil particulièrement approprié (Greer *et al.* 1986, Demmig et Björkman 1987, Björkman 1987, Ögren 1988). Des mesures de la fluorescence de base (F_0), de la fluorescence maximale (F_m) et le calcul du rendement quantique du photosystème II (Y) sont couramment utilisés comme indicateur de photoinhibition. Une molécule de chlorophylle recevant soit un photon, soit l'énergie d'excitation transmise par une molécule voisine, se trouve dans un état excité instable et retourne à l'état stable, soit en transférant l'énergie d'excitation à une molécule voisine, soit en dissipant cette énergie par émission de chaleur ou en émettant un photon (fluorescence), soit enfin en cédant un électron à une molécule de phéophytine. La fluorescence chlorophyllienne émise par une feuille provient très majoritairement, à température ambiante, du PS II. Elle dépend de l'activité des processus susceptibles de participer à la dé-excitation de la chlorophylle (Krause et Weis 1991). La fluorescence émise par le PS II est, en effet, proportionnelle à l'énergie absorbée par le PS II (J) et au rapport de la constante de vitesse de la voie de fluorescence (k_F), qui est invariable, sur la somme des constantes de vitesse de l'ensemble des processus impliqués dans la dé-excitation des molécules de chlorophylle (k_F , fluorescence ; k_P , voie photochimique ; k_D , dissipation thermique ; k_T , transfert de l'énergie d'excitation au PS I). L'intensité de la fluorescence varie entre un niveau de base, F_0 , et un niveau maximal, F_m . Lorsque tous les centres réactionnels du PS II sont ouverts, c'est-à-dire susceptibles de recevoir une excitation en provenance des antennes chlorophylliennes, la fluorescence est minimale [$F_0 = J k_F / (k_F + k_D + k_T + k_P)$]. Cet état est observé lorsque la feuille est illuminée par une lumière de très faible intensité. Au contraire, lorsque la feuille est violemment éclairée par

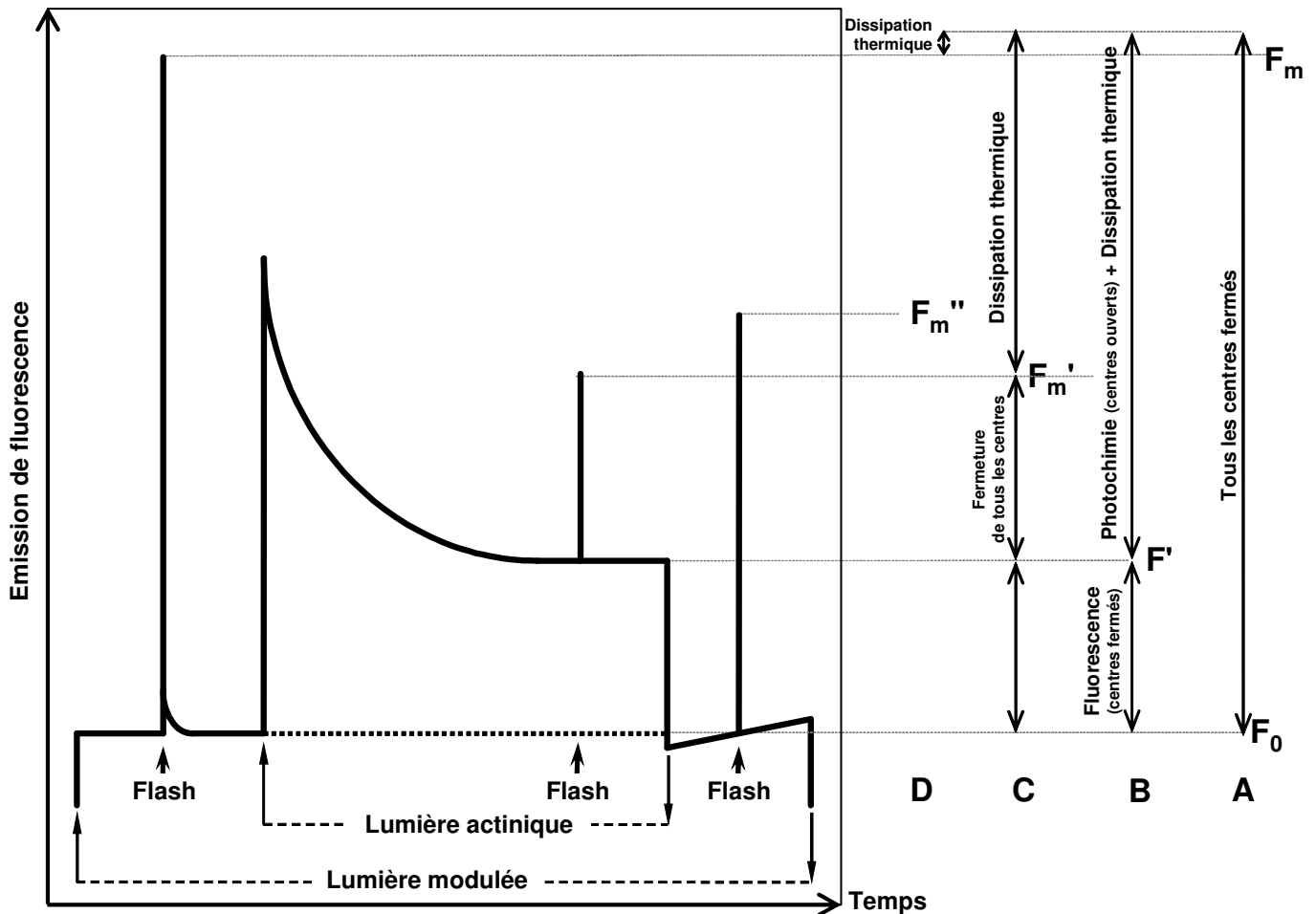


Figure 1.30. Représentation schématique d'une cinétique d'induction de fluorescence.

A : Un disque foliaire adapté à l'obscurité est illuminé avec une lumière modulée de très faible intensité afin de mesurer la fluorescence minimale, F_0 . À ce stade, tous les centres du PS II sont ouverts, susceptibles de transmettre l'énergie d'excitation. Un flash de lumière saturante est surimposé afin de mesurer la fluorescence maximale, F_m . Tous les centres sont saturés, fermés ; le transfert de l'énergie est limité au niveau du passage de charge de l'accepteur primaire (Q_A) à l'accepteur secondaire (Q_B). La différence entre F_m et F_0 correspond donc à l'ensemble des centres susceptibles d'être ouverts. Le rendement quantique du photosystème II est alors égal à $Y = (F_m - F_0) / F_m$.

B : Une lumière blanche actinique est allumée pour induire la cinétique de fluorescence. Quelques minutes sont nécessaires à la stabilisation de la fluorescence (steady state), le temps que les enzymes photosynthétiques soient induites. L'énergie non dissipée par fluorescence, F' , est utilisée pour la photochimie ou dissipée sous forme de chaleur.

C : L'addition d'un flash saturant à l'équilibre, F' , permet de mesurer la fluorescence maximale, F_m' . La différence $F_m' - F'$ correspond à la part d'énergie transmise à la voie photochimique. Après extinction de la lumière actinique, la dissipation thermique ne décroît pas instantanément et le niveau de base de fluorescence atteint est légèrement inférieur à F_0 .

D : À l'obscurité, un nouveau flash saturant est administré pour déterminer la fluorescence maximale, F_m'' . F_m'' est supérieure à F_m' mais inférieure à F_m puisque les enzymes sont encore partiellement induites.

D'après Maxwell et Johnson 2000.

un flash de lumière saturante, les centres du PS II sont tous fermés (le pool d'accepteurs primaires d'électrons, Q_A , est complètement réduit), k_P devient nulle et la fluorescence atteint alors une valeur maximale [$F_m = J k_F / (k_F + k_D + k_T)$]. La différence entre F_m et F_0 est la fluorescence variable, F_v , qui correspond à la fluorescence de l'ensemble des centres du PS II potentiellement ouvrables. Le rapport de F_v à F_m donne alors accès à l'efficacité photochimique des centres du photosystème II, appelé également rendement quantique du PS II [$Y = k_P / (k_F + k_D + k_T + k_P)$]. Une diminution du rendement est associée soit à une augmentation de F_0 (principalement liée à une diminution de la constante de vitesse de la photochimie, k_P), soit à une réduction de F_m (principalement liée à une augmentation de la constante de vitesse de la dissipation thermique, k_D) (Figure 1.30).

6.1.3.2. Mesure des paramètres de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à température et CO_2 ambiants sur les disques foliaires avec un fluorimètre PAM 101 (Walz, Allemagne) (Figure 1.27, C). La fluorescence de base (F_0) a été déterminée en appliquant une lumière rouge pulsée ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à une fréquence de 1,6 kHz. La fluorescence maximale (F_m) était induite par un flash saturant additionnel de lumière blanche (0,7 s ; $4\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fourni par une source de lumière froide (Schott KL 1500, Allemagne). Le rapport de la variation de fluorescence, $F_v = F_m - F_0$, à la fluorescence maximale F_m représente l'efficacité photochimique maximale du photosystème II (Y). Cette efficacité photochimique a été calculée selon l'équation suivante : $F_v/F_m = 1 - F_0/F_m$ (Genty *et al.* 1987).

6.2. Résultats

6.2.1. Effet de la concentration en Paraquat sur le rendement quantique du photosystème II

Douze heures d'incubation à l'obscurité, dans de l'eau ou du Paraquat, n'affectaient pas la teneur en chlorophylles des différentes catégories de feuilles (Figure 1.31). Ainsi, les variations d'efficacité de photosystème II dans cette expérience ne pouvaient pas être imputées à une chute significative de la quantité de pigments photorécepteurs disponibles.

Après 12 heures d'incubation à l'obscurité, l'efficacité du photosystème II (Y) des différents lots de feuilles n'était pas affectée par le milieu d'incubation (Figure 1.32). Ce résultat démontre que l'action oxydative du Paraquat n'est exprimée qu'en présence de

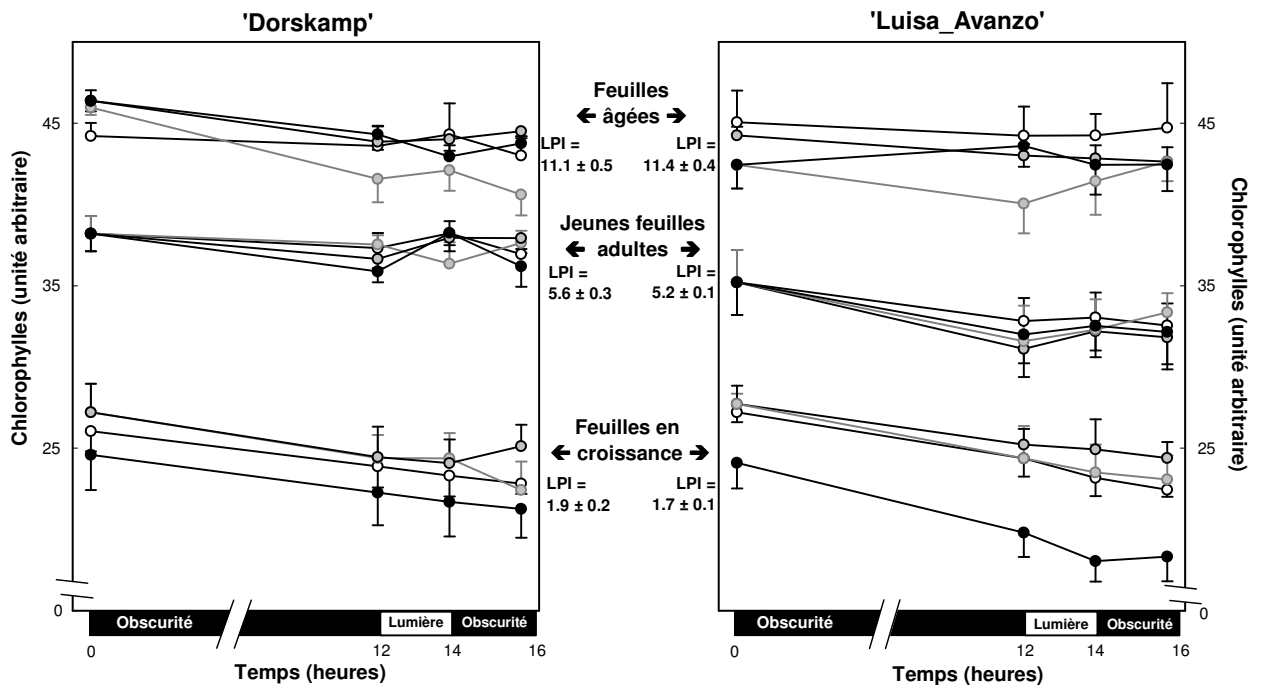


Figure 1.31. Variations au cours du temps des teneurs relatives en chlorophylles des feuilles en croissance, jeunes adultes et adultes âgées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en fonction du milieu d'incubation : eau distillée (blanc), Paraquat 5 μ M (gris), Paraquat 20 μ M (gris cerclé de noir) et 50 μ M (noir). L'âge des feuilles est indiqué par leur LPI. À chaque temps d'expérience, les valeurs représentées correspondent à la moyenne (\pm erreur standard) des mesures effectuées à partir de 4 disques foliaires issus de 4 boutures différentes. Les conditions lumineuses d'incubation sont indiquées sur l'axe des abscisses.

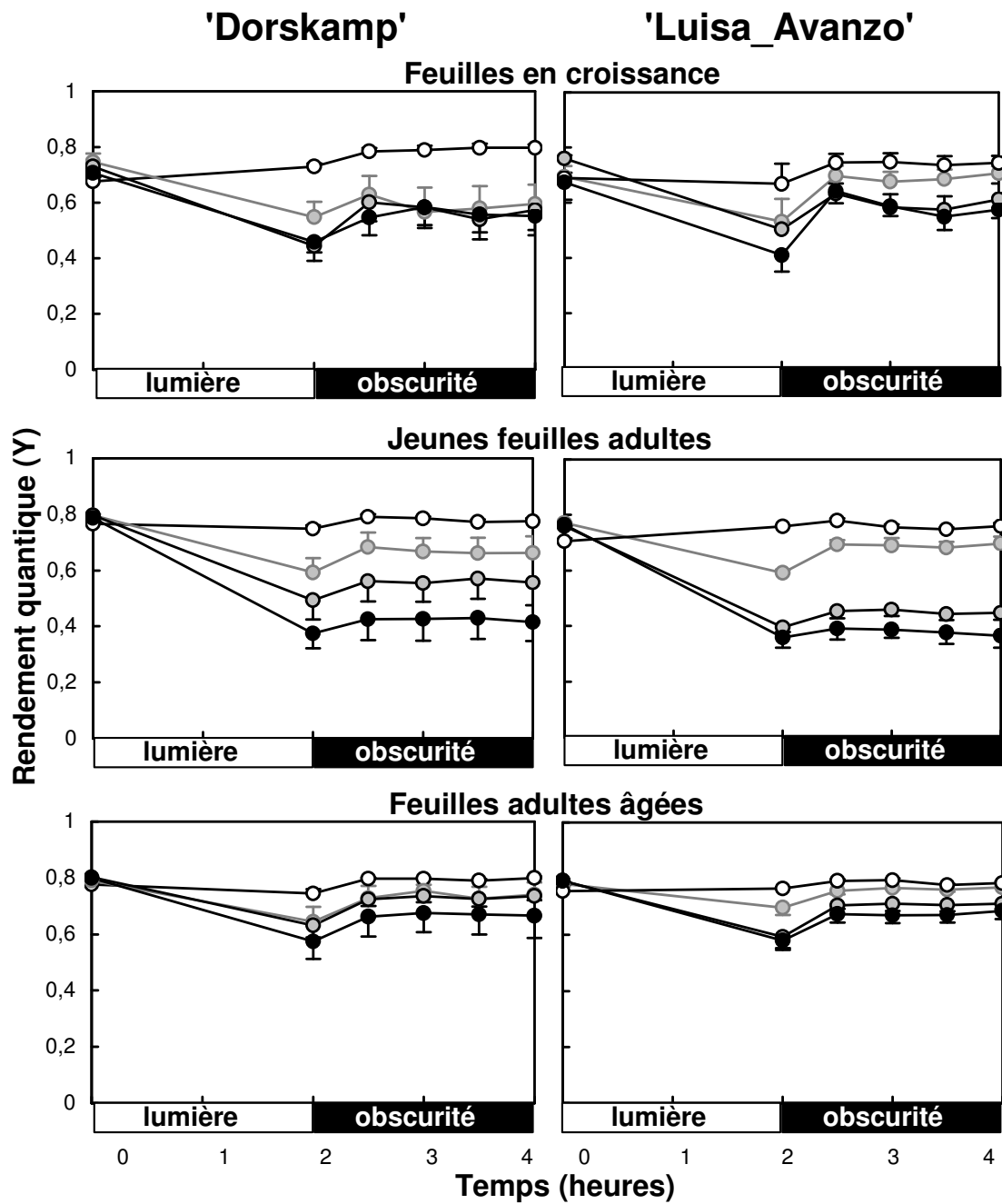


Figure 1.32. Variations au cours du temps du rendement quantique du photosystème II (Y) de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' soumises à 3 concentrations de Paraquat : eau/témoin (blanc), 5 µM (gris), 20 µM (gris cerclé de noir) ou 50 µM (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 4 mesures.

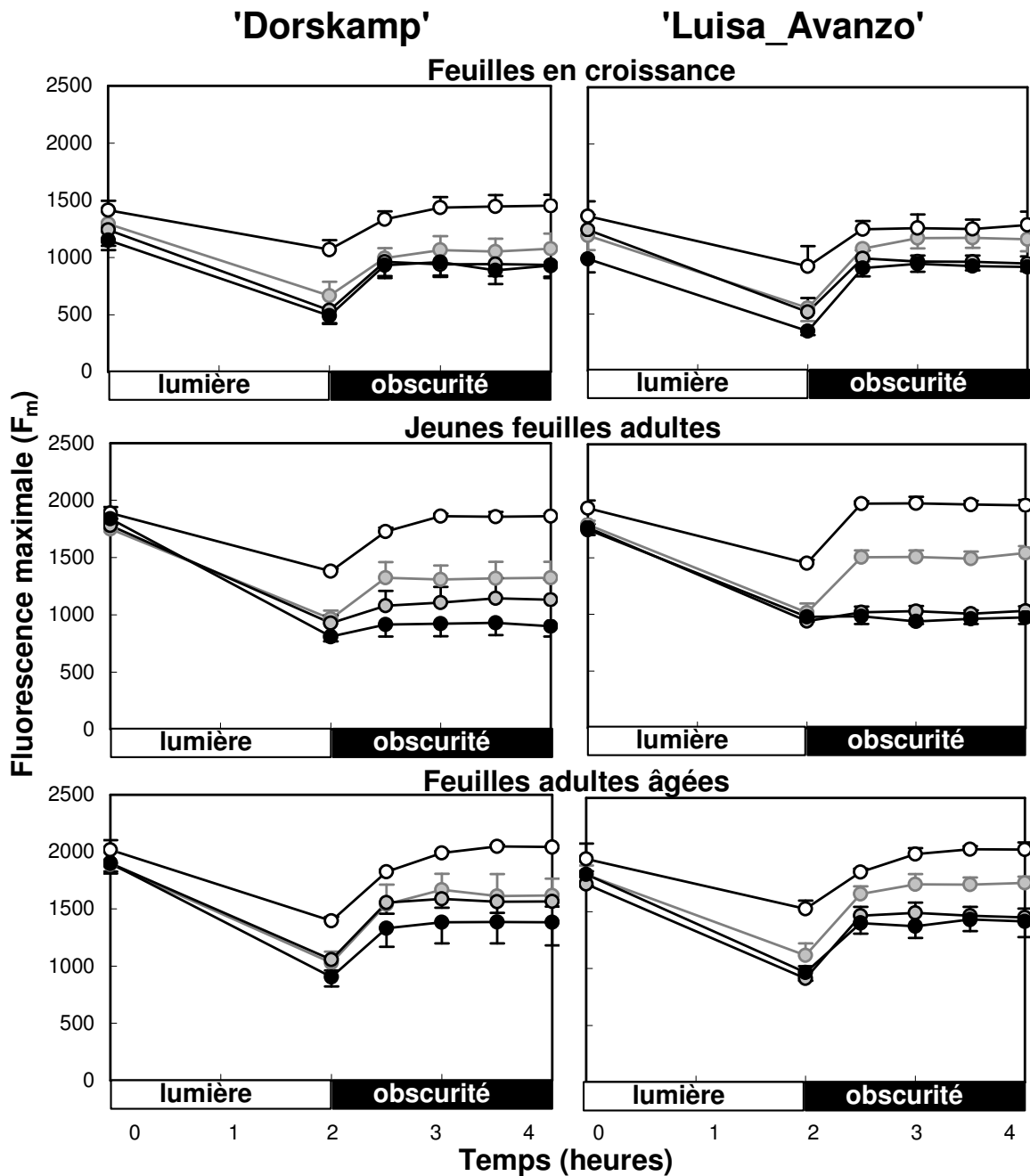


Figure 1.33. Variations au cours du temps de la fluorescence maximale (F_m) de la chlorophylle *a* de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' soumises à 3 concentrations de Paraquat : eau/témoin (blanc), 5 μ M (gris), 20 μ M (gris cerclé de noir) ou 50 μ M (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 4 mesures.

lumière. Le rendement quantique du photosystème II des feuilles en croissance était significativement inférieur à celui des feuilles adultes, jeunes et âgées. Cette différence d'efficacité était essentiellement due à des valeurs de F_m deux fois plus faibles pour les feuilles en croissance que pour les adultes (Figure 1.33). Après 2 heures d'exposition à une source de lumière actinique, une chute significative du rendement quantique du photosystème II (Y) était observée pour toutes les feuilles des deux clones ayant incubé en présence de Paraquat. La chute était d'autant plus accentuée que la concentration en Paraquat dans le milieu d'incubation était élevée. Les feuilles en croissance et les jeunes feuilles adultes présentaient alors des valeurs de Y plus basses que les feuilles adultes plus âgées. Dans le cas des jeunes feuilles adultes, la diminution d'efficacité associée à la présence de Paraquat s'accompagnait d'une part d'une diminution significative de F_m et d'autre part d'une augmentation significative de F_0 (Figure 1.34). En revanche, dans le cas des deux autres catégories de feuilles, une diminution de Y s'accompagnait seulement d'une diminution marquée de F_m , F_0 ne variant pas. Après 2 heures de récupération à l'obscurité, le rendement quantique du photosystème II des jeunes feuilles adultes ayant préalablement incubé dans du Paraquat 20 ou 50 μM demeurait équivalent à celui détecté après 2 heures d'exposition à la lumière. En revanche, le rendement quantique du photosystème II des feuilles en croissance et des feuilles adultes plus âgées atteignait des valeurs intermédiaires, entre celles mesurées après 2 heures d'exposition à la lumière et celles mesurées à partir des disques foliaires témoin.

6.2.2. Effet d'un stress hydrique préalable

Les effets de 2 types de sécheresse ont été testés sur la tolérance au Paraquat des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' : (1) le stress 1 durant lequel des valeurs de potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{wp}) de $-0,73 \pm 0,03$ MPa pour le clone 'Dorskamp' et $-0,70 \pm 0,06$ MPa pour le clone 'Luisa_Avanzo' étaient atteintes en 4 jours et (2) le stress 2 au cours duquel des valeurs de Ψ_{wp} de $-1,03 \pm 0,03$ MPa pour le clone 'Dorskamp' et $-0,83 \pm 0,09$ MPa pour le clone 'Luisa_Avanzo' étaient maintenues pendant 11 jours. Les masses des pots des boutures stressées, exprimées en pourcentage de celles des témoins, n'étaient jamais significativement différentes entre clones tout au long de l'expérience (Figure 1.35, A). Pour les deux clones, les Ψ_{wp} des boutures stressées étaient significativement inférieurs à ceux des témoins quel que soit le type de sécheresse (Figure 1.35, B et C). Les SLA et les teneurs en chlorophylles des feuilles des deux clones étaient

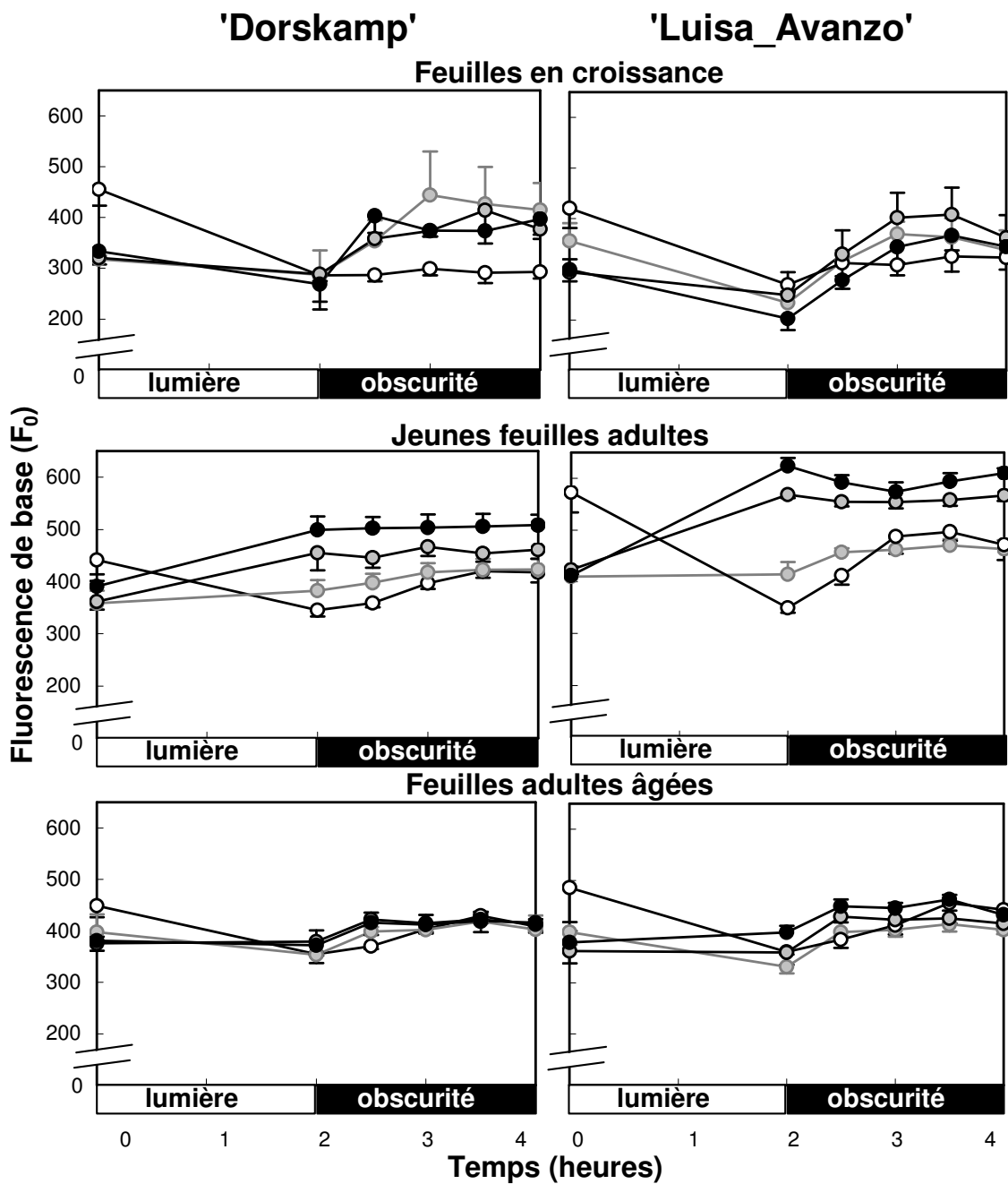


Figure 1.34. Variations au cours du temps de la fluorescence de base (F_0) de la chlorophylle a de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' soumises à 3 concentrations de Paraquat : eau/témoin (blanc), 5 μ M (gris), 20 μ M (gris cerclé de noir) ou 50 μ M (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 4 mesures.

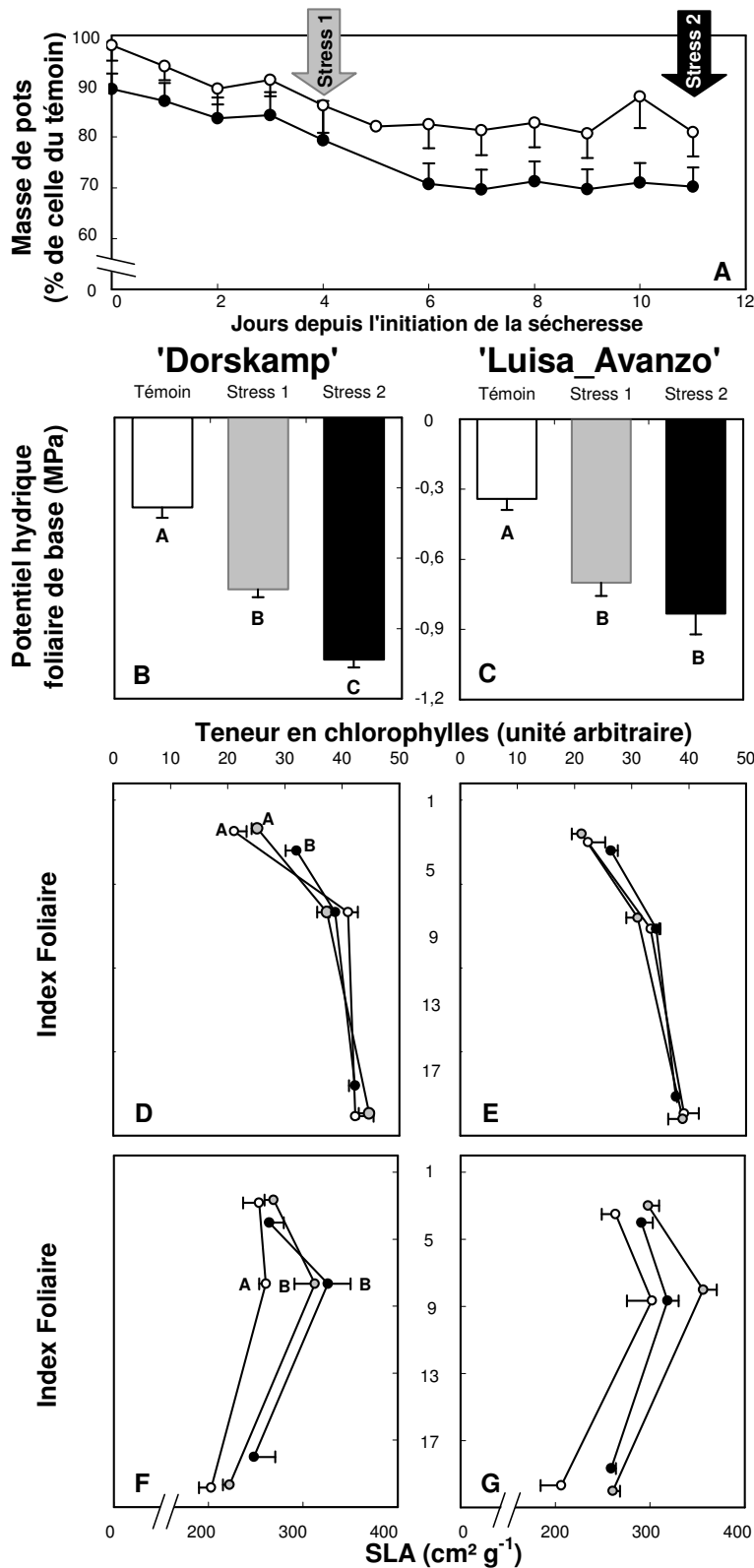


Figure 1.35. Depuis l'initiation de la sécheresse, évolution au cours du temps de la masse des pots (A) de boutures des clones 'Dorskamp' (blanc) et 'Luisa_Avanzo' (noir). Impact de 2 types de sécheresse sur les potentiels hydriques foliaires de base (B et C), sur les teneurs en chlorophylles des feuilles (D et E) et sur les SLA (F et G) de boutures témoin (blanc) et stressées (gris pour sécheresse 1 et noir pour sécheresse 2) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives ($P \leq 0,05$) entre traitements sont indiquées par des lettres différentes.

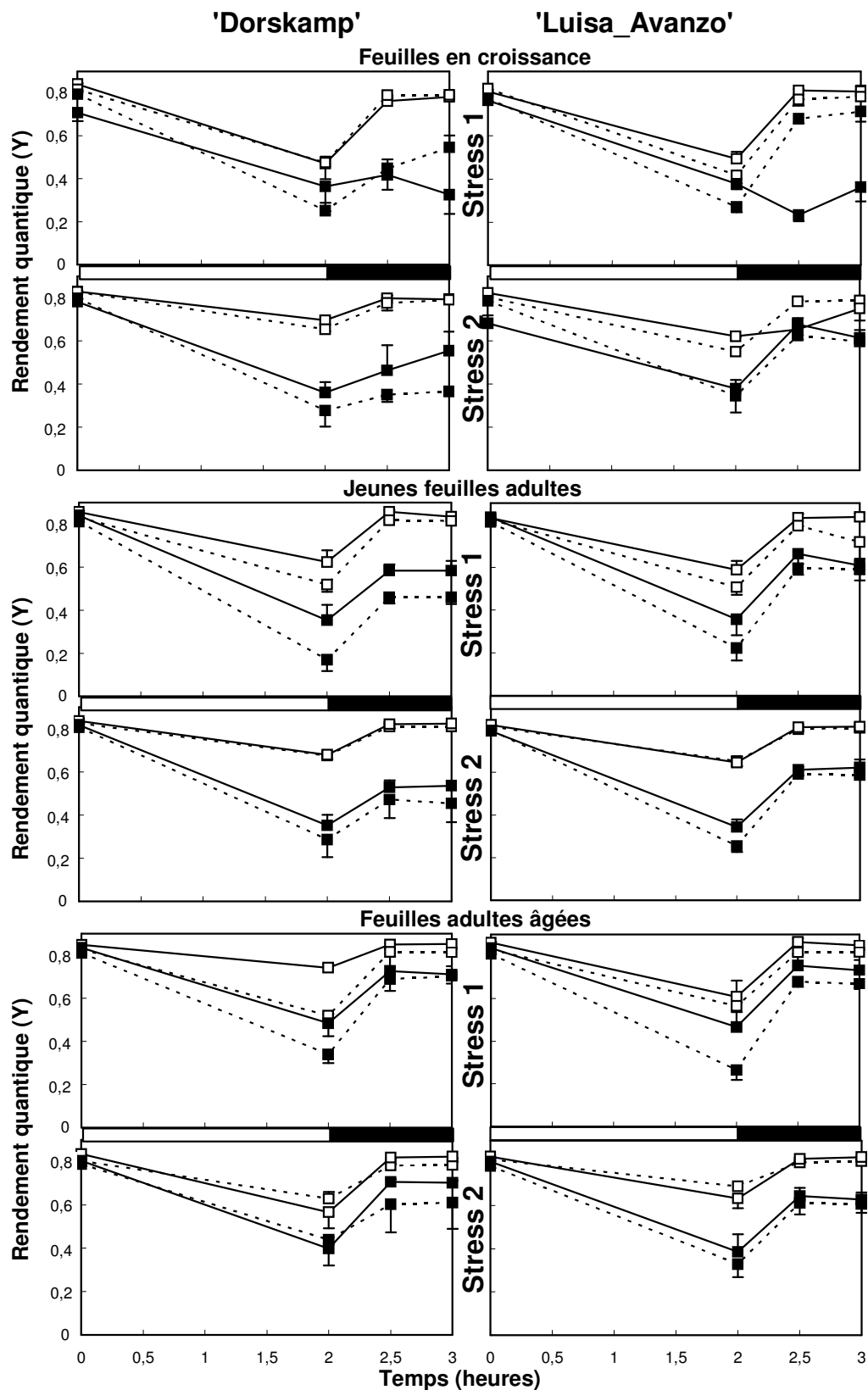


Figure 1.36. Variations au cours du temps du rendement quantique du photosystème II (Y) de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées issues de boutures témoin (traits pleins) et stressées (pointillés) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ayant incubé dans de l'eau (blanc) ou dans une solution de Paraquat 20 μ M (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 mesures.

équivalentes entre traitements (Figure 1.35, D à G). Cependant, pour les deux clones, les feuilles en croissance présentaient les teneurs en chlorophylles les plus faibles et les feuilles adultes âgées, des SLA inférieures à celles des autres étages.

Après 12 heures d'incubation, le rendement quantique du photosystème II (Y), la fluorescence de base (F_0) et la fluorescence maximale (F_m) n'étaient pas significativement différents entre les traitements (sécheresses et Paraquat), entre les clones et entre les âges de feuilles (Figures 1.36, 1.37 et 1.38). Quel que soit le traitement administré aux boutures (témoin/stressées) et aux disques foliaires (eau/Paraquat), 2 heures d'exposition à la lumière entraînaient pour les deux clones et pour les trois stades de développement des feuilles une chute significative de Y et de F_m . La chute de Y en présence de Paraquat était plus prononcée pour les jeunes feuilles adultes que pour les feuilles en croissance et les feuilles adultes plus âgées. Pour les feuilles adultes ayant incubé en présence de Paraquat, une augmentation de F_0 était observée pendant l'exposition à la lumière. En présence de Paraquat, les jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp' et les feuilles en croissance et adultes âgées du clone 'Luisa_Avanzo' provenant de boutures ayant subi la première sécheresse (stress 1) subissaient une réduction de Y significativement plus marquée que celle des feuilles provenant de boutures non stressées. Dans le cas du stress 2, la sécheresse n'entraînait pas d'accentuation de la chute de Y durant l'exposition à la lumière en présence de Paraquat. La récupération à l'obscurité des disques ayant incubé dans de l'eau, boutures témoin et stressées confondues, était totale. Qu'elles proviennent de boutures ayant ou non subi la sécheresse, les feuilles adultes des deux clones ayant incubé dans le Paraquat ne récupéraient que partiellement. Pour les jeunes feuilles adultes du clone 'Dorskamp' incubées en présence de Paraquat, la récupération était significativement plus faible pour les feuilles provenant de boutures stressées. En revanche, l'absence de récupération des feuilles en croissance ayant incubé en présence de Paraquat et provenant de boutures bien irriguées paraît suspecte et limitera nos interprétations. D'abord, les rendements quantiques du photosystème II des disques foliaires incubés en présence de Paraquat et issus de plants bien irrigués évoluaient différemment entre les expériences correspondant aux stress 1 et 2 : dans le cas de l'expérience correspondant au stress 1, la récupération à l'obscurité était nulle, alors qu'elle était partielle dans le cas du stress 2. Ensuite, les disques foliaires incubés en présence de Paraquat et provenant de plants stressés récupéraient au moins en partie. Enfin, ces résultats ne sont pas conformes à ceux

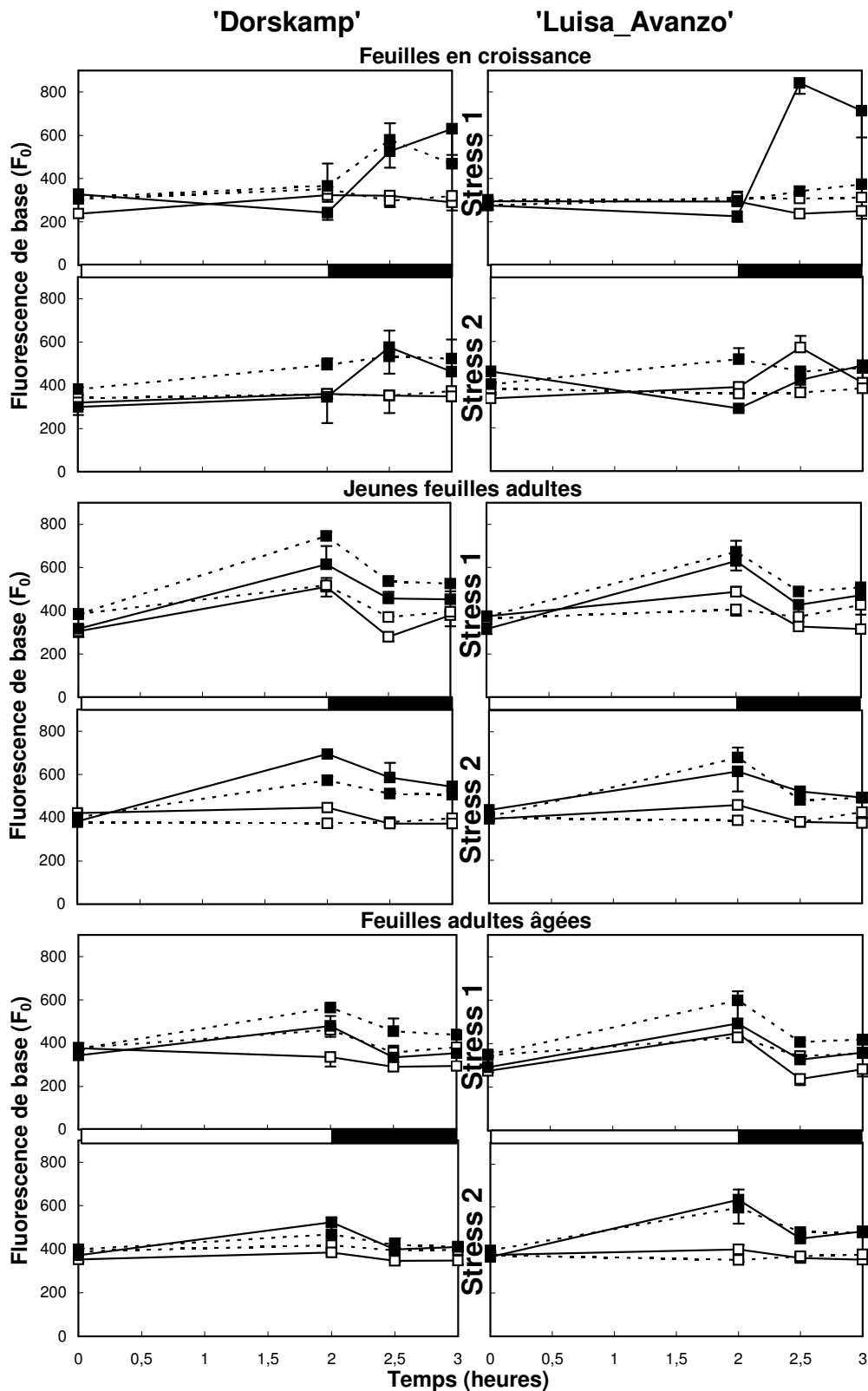


Figure 1.37. Variations au cours du temps de la fluorescence de base (F_0) de la chlorophylle a de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées issues de boutures témoin (traits pleins) et stressées (pointillés) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ayant incubé dans de l'eau (blanc) ou dans une solution de Paraquat $20 \mu\text{M}$ (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 mesures.

de l'expérience précédente, dans laquelle les feuilles en croissance récupéraient partiellement à l'obscurité (paragraphe 6.2.1, Figure 1.32).

6.3. Discussion

La réponse des feuilles à la contrainte oxydative générée par Paraquat n'était pas différente entre les clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. En revanche, les trois étages de feuilles (en croissance, jeunes adultes et adultes âgées) présentaient des comportements tranchés. De plus, l'ajout d'une sécheresse influençait la réponse des feuilles et cela de façon différente en fonction de sa durée.

Les feuilles en croissance des deux clones présentaient des valeurs de rendement du photosystème II (Y) inférieures à celles des feuilles adultes. Ces différences sont dues à des valeurs de fluorescence maximale (F_m) plus faibles pour les feuilles en croissance. Ces feuilles n'affichent donc pas des capacités d'interception de la lumière optimales.

En l'absence de sécheresse et toutes expériences confondues, la tolérance des feuilles des deux clones aux oxydations générées par du Paraquat s'est avérée très dépendante de l'âge. La diminution du rendement quantique du photosystème II était modérée pour les feuilles adultes âgées et pour les feuilles en croissance. La chute était, en revanche, d'un facteur deux pour les jeunes feuilles adultes et était associée à une forte augmentation de la fluorescence de base (F_0). Cette exaltation de la fluorescence de base est indicatrice des dégâts irréversibles subis par le photosystème consécutivement aux oxydations générées par le Paraquat. Le caractère définitif de cette chute de Y est démontré par l'absence totale de récupération à l'obscurité pour cette catégorie de feuilles. Les feuilles en croissance et les feuilles adultes âgées retrouvaient à l'obscurité des valeurs de Y proches de celles des témoins, les variations étant dues principalement à une diminution de F_m (augmentation de la dissipation thermique) (Maxwell et Johnson 2000). Les jeunes feuilles adultes semblent donc les plus sensibles aux oxydations et les feuilles adultes âgées, les plus résistantes le long de la tige. Cette conclusion s'appuie néanmoins sur l'hypothèse que les trois catégories de feuilles ont absorbées la même quantité de Paraquat. Les différences observées entre les trois étages de feuilles peuvent, en effet, être liées à des différences quant à leur capacité à protéger leurs photosystèmes des oxydations, mais également à des différences de structure impliquant des variations dans la quantité de Paraquat absorbée

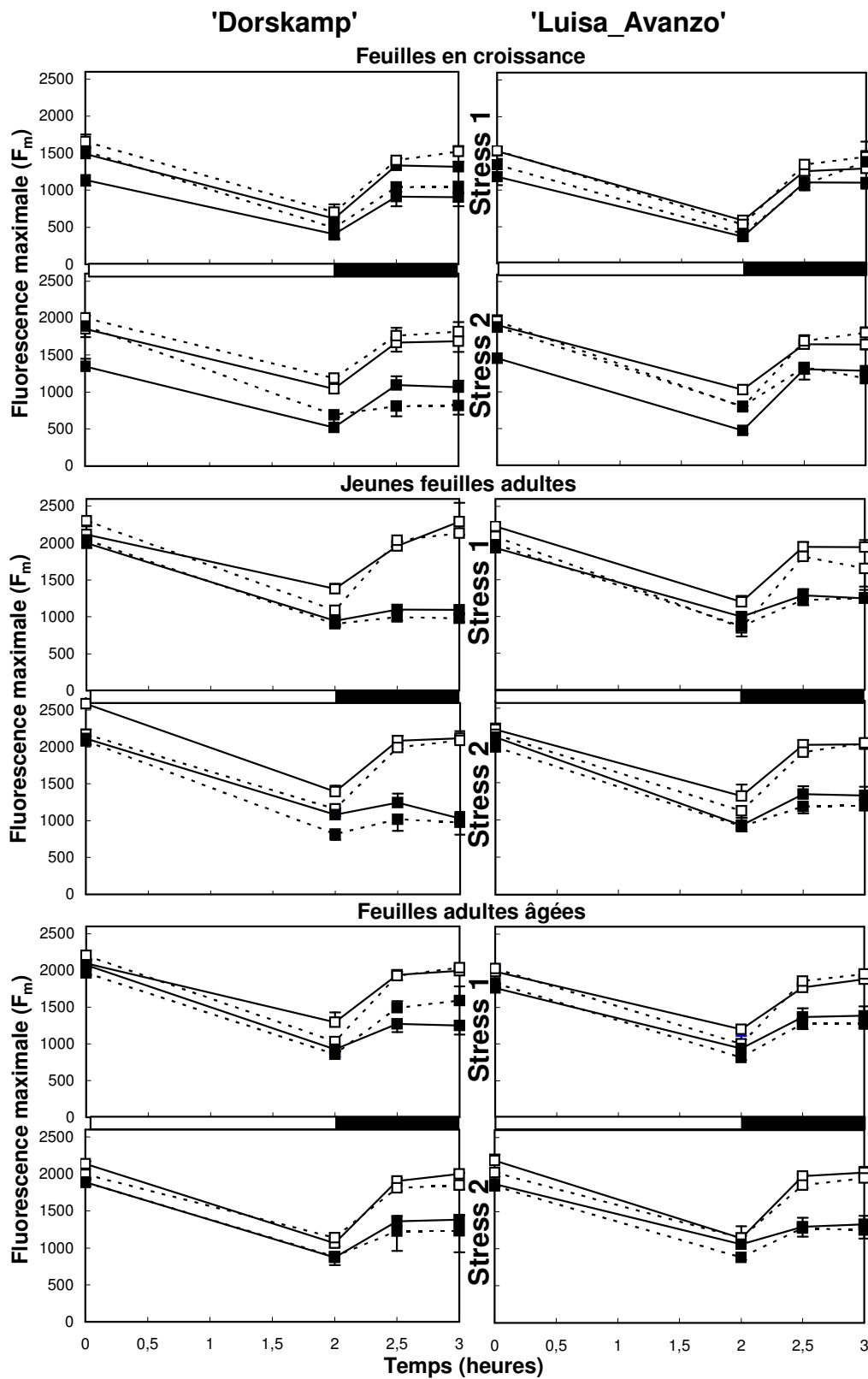


Figure 1.38. Variations au cours du temps de la fluorescence maximale (F_m) de la chlorophylle a de feuilles en croissance, de jeunes feuilles adultes et de feuilles adultes âgées issues de boutures témoin (traits pleins) et stressées (pointillés) des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ayant incubé dans de l'eau (blanc) ou dans une solution de Paraquat 20 μ M (noir). Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 mesures.

pendant l'incubation. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les jeunes feuilles adultes des deux clones présentent les plus fortes valeurs de SLA le long de la tige (Marron *et al.* 2003). Les feuilles en croissance ont une structure cellulaire plus compacte, les méats et lacunes apparaissant progressivement par gélification de la lamelle moyenne au cours de l'étalement de la feuille. Les vieilles feuilles adultes, quant à elles, présentent une cuticule importante et une lignification accrue. Ces différences de structure pourraient expliquer, au moins en partie, les différences observées entre les trois catégories de feuilles.

La soumission des deux cultivars à une sécheresse préalable module la réponse de leurs feuilles aux oxydations générées par le Paraquat. La perte en eau des boutures stressées par rapport aux témoins n'était pas significativement différente entre clones ; l'intensité de la contrainte hydrique peut donc être considérée équivalente pour les deux cultivars. Pour les trois catégories de feuilles des deux clones et même en l'absence de Paraquat, les feuilles des boutures ayant subi la sécheresse de courte durée (stress 1) présentaient, durant l'exposition à la lumière, un rendement du photosystème II presque toujours inférieur à celui des boutures témoin. En revanche, pour les deux clones, une sécheresse entretenue (stress 2) n'occasionnait plus d'accentuation des effets du Paraquat. Les feuilles semblent donc s'acclimater à une sécheresse entretenue. Comme dans le cas de la comparaison des trois stades de développement des feuilles, cette conclusion s'appuie sur l'hypothèse que la quantité de Paraquat absorbée par les feuilles était identique qu'elles proviennent de boutures ayant subi ou non la sécheresse. La fermeture des stomates en réponse au déficit hydrique pourrait représenter une barrière supplémentaire à la pénétration du Paraquat. Néanmoins, il a été montré, à l'aide d'une méthode spectrophotométrique, qu'un état d'équilibre entre le disque foliaire et la solution de Paraquat d'incubation était atteint en seulement quelques heures (résultats non présentés). Les 12 heures d'incubation sont donc sans doute suffisantes pour parvenir à l'équilibre quel que soit le degré d'ouverture des stomates.

La Figure 1.39 présente un bilan chiffré arbitraire des effets des différentes concentrations en Paraquat sur les feuilles en croissance, jeunes adultes et adultes âgées issues de boutures des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' ayant été soumises à la sécheresse ou non. En conditions hydriques non limitantes, les jeunes feuilles adultes des deux cultivars sont nettement plus sensibles à la contrainte oxydative que les deux autres

Clone Feuilles Conditions	'Dorskamp'						'Luisa_Avanzo'						
	Croissance		Jeunes adultes		Adultes âgées		Croissance		Jeunes adultes		Adultes âgées		
	Exposition lumière	Récupération	Exposition lumière	Récupération	Exposition lumière	Récupération	Exposition lumière	Récupération	Exposition lumière	Récupération	Exposition lumière	Récupération	
5 μ M	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	
20 μ M	2	1	1	2	1	0	1	1	2	2	1	1	
50 μ M	2	1	2	2	1	0	2	1	2	2	1	1	
Bilan concentrations	8		9		3		6		10		5		
20						21						Effet concentrations	
Sécheresse 1	0	0	1	0	2	1	1	0	1	1	0		0
Sécheresse 1 + 20 μ M	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	2	1	
Bilan	2		4		4		2		3		3		
10						8						Effet sécheresses	
Sécheresse 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
Sécheresse 2 + 20 μ M	1	2	1	1	0	1	0	0	1	0	0		0
Bilan	3		2		1		0		1		0		
6						1							
Bilan sécheresse	5		6		5		2		4		3		
16						9							
Bilan	13		15		8		8		14		8		
36						30							

Figure 1.39. Bilan des effets de plusieurs concentrations et de deux types de sécheresses préalables sur la sensibilité au Paraquat des feuilles en croissance, jeunes adultes et adultes âgées des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo'. 0 = pas d'effet à la lumière par rapport au témoin / récupération complète, 1 = chute moyenne à la lumière / récupération partielle, 2 = chute importante par rapport au témoin / récupération nulle. Plus le nombre est élevé, plus la feuille s'est avérée sensible.

étages de feuilles, les feuilles les plus âgées étant les moins sensibles. Les deux clones ne sont que faiblement différents dans leur réponse. Une étape de sécheresse préalable accentue la sensibilité des feuilles des deux clones au stress oxydatif généré par le Paraquat. Néanmoins, une sécheresse entretenue n'a plus d'effet sur la tolérance aux oxydations des deux clones.

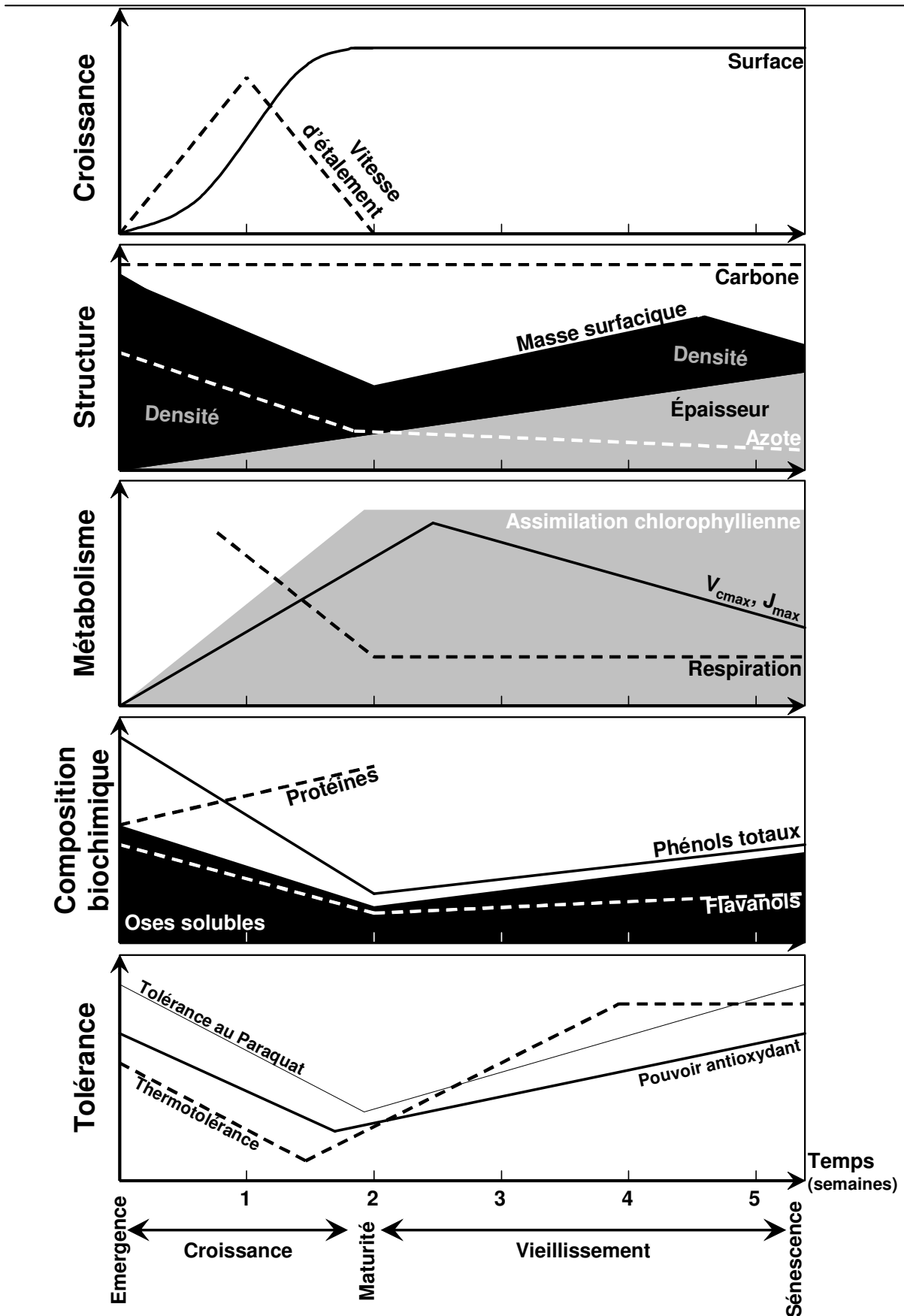


Figure 1.40. Schéma de l'évolution au cours du temps de la croissance, de la structure, du métabolisme, de la composition biochimique et de la tolérance aux contraintes d'une feuille de peuplier de son émergence à sa sénescence. V_{cmax} : vitesse maximale de carboxylation, J_{max} : flux maximal d'électrons.

7. Synthèse

7.1. Évolution anatomique et physiologique de la feuille de peuplier de son émergence à sa sénescence

Il existe le long de la tige des boutures des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' une importante variabilité dans les caractéristiques anatomiques et physiologiques des feuilles. Cette variabilité, du sommet de la bouture à sa base, observée à un instant donné, traduit l'évolution subie par la feuille de son émergence à sa sénescence (Figure 1.40), sous l'hypothèse incontournable que la vitesse d'apparition des feuilles soit constante et donc que les expériences soient réalisées en conditions environnementales optimales, au moins pour l'eau et les sels minéraux. L'index de plastochrone devient une co-variable pertinente si l'on prend soin de lui associer un facteur dont les variations traduisent des stades de développement différents. Il nous donne alors accès à la vitesse d'apparition des feuilles, paramètre dont l'obtention nécessite d'ordinaire des mesures répétées dans le temps.

Pendant la quinzaine de jours que dure la croissance foliaire (paragraphe 3 ; Marron *et al.* 2003), les cellules de la feuille n'ont pas atteint leur volume maximal et ne ménagent entre elles que peu d'espaces. Au cours de cette période de croissance, les teneurs en chlorophylles et les capacités photosynthétiques des feuilles ne sont pas optimales, alors qu'elles présentent en parallèle une respiration exacerbée et des teneurs en azote supérieures à celles des feuilles adultes (paragraphe 2). Cette poussée respiratoire, lorsque la feuille se déploie, a déjà été observée pour le peuplier (Reich 1983). Elle semble être maximale lorsque la feuille présente sa vitesse d'étalement la plus élevée, à peu près une semaine après son émergence (paragraphe 3 ; Marron *et al.* 2003). Les fortes teneurs en oses solubles détectées dans les feuilles en croissance ne résultent donc très probablement pas d'une synthèse *in situ*, mais plutôt d'une importation en provenance des feuilles adultes (paragraphe 4). Les feuilles en croissance se comportent donc comme des organes puits, importateurs nets des produits de la photosynthèse jusqu'à ce que leur croissance cesse (Turgeon et Webb 1975). En revanche, l'énergie libérée par la respiration cellulaire pourrait être investie en partie dans le métabolisme secondaire et notamment dans la synthèse de composés phénoliques, ce qui expliquerait les fortes teneurs détectées dans les feuilles en croissance (paragraphe 5.2). À ce stade, la feuille a d'importants besoins en solutés d'une part pour maintenir une osmolarité compatible avec la croissance cellulaire et d'autre part, pour mettre en place sa structure définitive. De ce fait, les fortes teneurs en

oses solubles détectées dans les feuilles en expansion pourraient contribuer à la croissance cellulaire et les fortes teneurs en composés phénoliques à la mise en place d'éléments plus lignifiés tels que ceux du métaxylème. Cette dernière interprétation est confortée par le fait que certains des composés phénoliques présents dans ces feuilles sont probablement des précurseurs des lignines, comme l'attestent leur spectre d'absorption et leur disparition dès que la feuille a atteint sa taille définitive. Les composés phénoliques interviennent, en effet, dans les processus impliqués dans la croissance. La voie des phénylpropanoïdes fournit des précurseurs de la biosynthèse des lignines et, en mimant les effets des cytokinines, certains acides phénoliques sont impliqués dans la régulation de la division et de l'expansion cellulaire (Tamagnone *et al.* 1998). À cette fonction s'ajoute leur rôle de protection de la cellule lors des stress abiotiques et biotiques. Au niveau des épidermes foliaires, la réponse la plus couramment décrite aux élévations de radiations UV-B est une augmentation de la production de composés phénoliques dont les propriétés d'absorption protègent les tissus mésophylliens sous-jacents (Meijkamp *et al.* 1999, Searles *et al.* 2001, Warren *et al.* 2003). Les composés phénoliques représentent également une barrière à la progression des pathogènes dans la plante, participent à la répulsion des herbivores grâce à la saveur astringente des tannins, et jouent sans doute le rôle d'antioxydants naturels lors des attaques radicalaires associées aux contraintes (McKey 1979, Ikegawa *et al.* 1996, Rice-Evans *et al.* 1997).

À mesure que la feuille gagne en surface, sa densité décroît graduellement, ses teneurs en chlorophylles augmentent et sa respiration de croissance laisse progressivement place à une respiration de maintenance nettement inférieure (paragraphe 2 et 3). Lorsque la feuille atteint sa taille définitive, sa densité est minimale et ses capacités photosynthétiques sont à leur paroxysme (paragraphe 2 ; Schumaker *et al.* 1997). Pour le peuplier, l'optimum des capacités photosynthétiques a été observé aux alentours de la troisième semaine de développement de la feuille (Reich 1983). Néanmoins, l'essentiel des produits de la photosynthèse est redistribué aux feuilles en croissance et aux feuilles adultes plus âgées (Turgeon et Webb 1975, Bialeski et Redgwell 1985, Dickson 1986). Malgré ce rôle d'organe source, la faible densité des jeunes feuilles adultes et, dans une moindre mesure, leurs faibles teneurs en composés phénoliques les rendent plus sensibles aux perturbations telles que la chaleur, les oxydations générées par le Paraquat, la sécheresse ou les pathogènes (paragraphe 2 et 6 ; Marron *et al.* 2002).

Au cours de son vieillissement, la feuille va gagner en épaisseur et en densité (paragraphe 3, Niinemets 2001, Marron *et al.* 2003). Les couches de parenchymes palissadique et lacuneux ainsi que les épidermes s'épaississent (Schumaker *et al.* 1997). La cellule accumule des solutés tels que les oses et osides, les composés phénoliques et des éléments minéraux comme le calcium (Zelawski et Walker 1976, Nelson et Isebrands 1983). Ce gain de densité, sans doute en partie lié à une augmentation de la lignification au cours du vieillissement de la feuille, a pour inconvénient de faire décliner les capacités photosynthétiques de la feuille mais par contre, il a l'avantage de rendre la feuille plus tolérante aux contraintes environnementales telles que la chaleur ou la sécheresse (paragraphe 2 et 6 ; Niinemets et Kull 1998, Evans et Poorter 2001, Nautiyal *et al.* 2002). L'approche de la sénescence entraîne à nouveau une diminution de la densité de la feuille et une réduction accrue de ses capacités photosynthétiques sous l'effet d'une destruction des pigments et d'une re-mobilisation des ions, des protéines et des oses vers la tige avant la chute des feuilles.

7.2. Impact de la sécheresse en fonction du stade de développement de la feuille

En conditions hydriques limitantes, réduire les pertes en eau liées à la transpiration devient prépondérant, et cela au détriment de l'assimilation de CO₂. La conductance stomatique ainsi que les vitesses d'étalement et d'apparition des feuilles sont précocement affectées par le déficit hydrique (paragraphe 3, Figure 1.41). La sécheresse entraîne également une augmentation de la durée d'étalement des feuilles et une diminution du nombre de feuilles en croissance portées par la tige. Les feuilles mises en place pendant la contrainte sont de plus petite taille et présentent une surface massique plus basse que celles étalées en conditions non limitantes en eau (paragraphe 3). La diminution de la taille individuelle des feuilles mises en place a pour conséquence de réduire la surface transpirante globale de la plante, alors que l'augmentation de la densité foliaire limite les sites de vaporisation de l'eau, c'est-à-dire les espaces intercellulaires. Une augmentation de la densité est également connue pour favoriser la rétention de l'eau dans les feuilles en augmentant probablement la résistance au transfert de l'eau à travers la feuille (Nautiyal *et al.* 2002). Lors d'une contrainte modérée, le nombre de feuilles ayant un profil phénolique

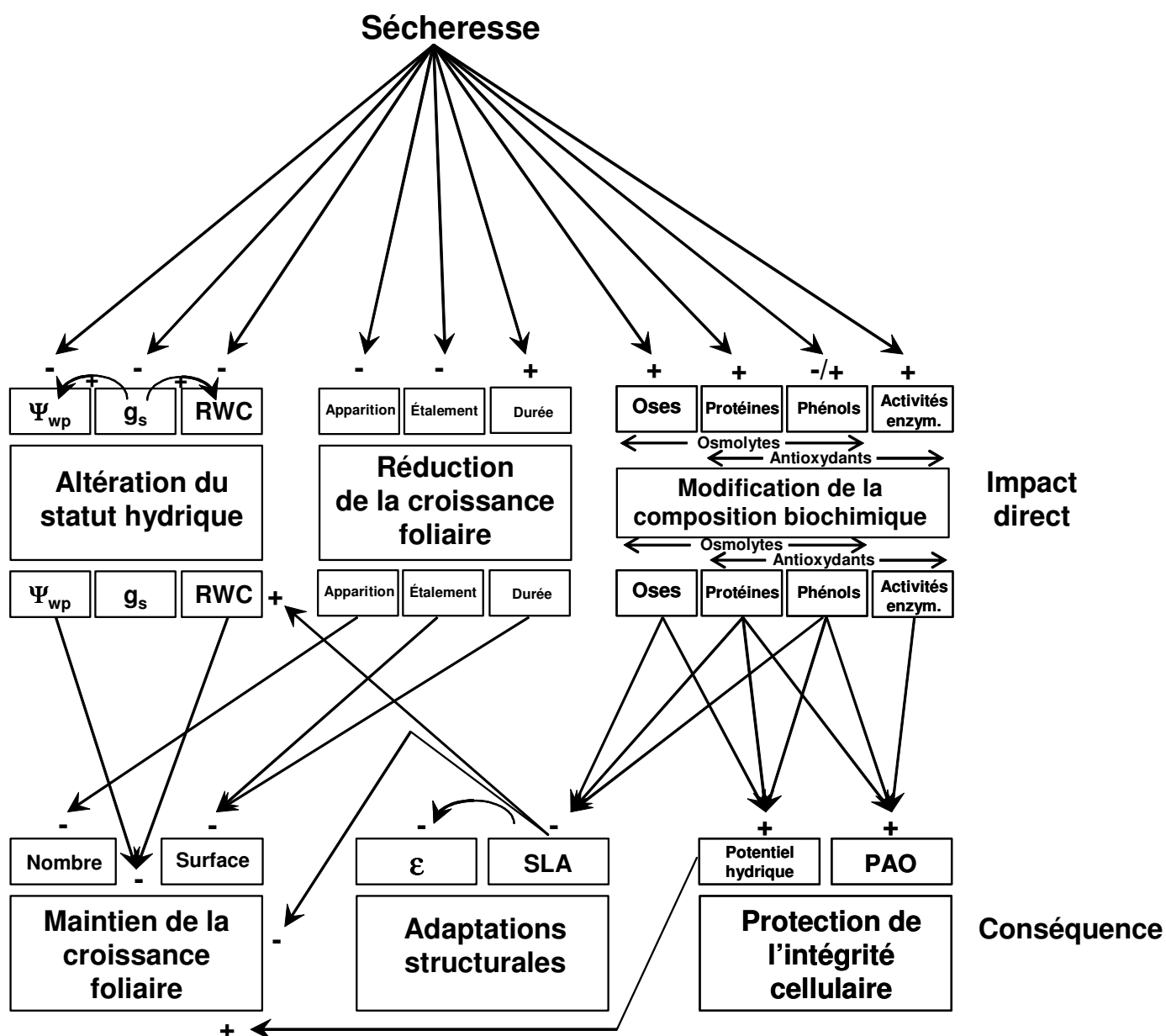


Figure 1.41. Schéma des impacts de la sécheresse sur le statut hydrique, la croissance et la composition biochimique de la feuille ; conséquences sur la tolérance de la plante au déficit hydrique. Le schéma est limité aux paramètres étudiés.

Statut hydrique : Ψ_{wp} : potentiel hydrique foliaire de base, g_s : conductance stomatique, RWC : Relative Water Content.

Croissance foliaire : **Apparition** : vitesse d'apparition des feuilles, **Étalement** : vitesse d'étalement des feuilles, **Durée** : durée de l'expansion des feuilles, **Nombre** : nombre de feuilles, **Surface** : surface foliaire.

Structure : ϵ : coefficient d'élasticité volumique, **SLA** : Specific Leaf Area.

Composition biochimique : **Oses** : teneurs en oses solubles, **Protéines** : teneurs en protéines, **Phénols** : teneurs en composés phénoliques, **Activités enzym.** : activités enzymatiques, **PAO** : Pouvoir AntiOxydant.

semblable à celui de feuilles en croissance provenant de plants bien irrigués diminue. Les variations phénoliques sont donc concomitantes avec l'acquisition de la taille définitive de la feuille. Cette observation conforte le fait que les composés phénoliques spécifiques aux feuilles en croissance étaient probablement des monomères de molécules plus complexes qui se polymériseront lors de l'acquisition de la taille définitive de la feuille. Cependant, à l'heure actuelle, nous ne savons pas si la polymérisation est déterminante dans l'acquisition de la surface définitive de la feuille, ou bien si elle lui est consécutive. La sécheresse entraîne également une augmentation des teneurs en oses solubles, aussi bien pour les feuilles étalées durant la contrainte que pour les feuilles déjà présentes avant l'initiation du stress (paragraphe 4). L'accumulation d'oses par la plante durant la sécheresse est connue pour participer au maintien d'un potentiel hydrique compatible avec un métabolisme fonctionnel (Hsiao *et al.* 1976, Clifford *et al.* 1998).

Au niveau des feuilles adultes les plus âgées, la sécheresse entraîne, au contraire, une réduction de la densité foliaire (paragraphe 3). Ce phénomène pourrait être dû à une remobilisation de matière avant la chute, la perte des feuilles correspondant à un autre moyen de réduire la surface du feuillage et de limiter les risques de cavitation durant la sécheresse (Cooper et Van Haverbeke 1990, DeBell 1990).

La fermeture des stomates a pour conséquence indirecte d'exposer le chloroplaste à un excès d'énergie d'excitation aboutissant à la formation de formes activées de l'oxygène, toxiques pour la cellule, telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Selon leur stade de développement, les feuilles présentent, d'une part, des degrés de tolérance différents à ces oxydations et, d'autre part, dans le cadre de la lutte contre les formes activées de l'oxygène, mettent en jeu des enzymes différentes de la voie de détoxification de Halliwell-Asada (paragraphe 5.1 et 6). Les jeunes feuilles adultes paraissent être les plus sensibles aux oxydations générées artificiellement par du Paraquat. La réponse au stress photo-oxydatif a déjà été montrée dépendante de l'état ontogénique de la feuille (Casano *et al.* 1994, Kurepa *et al.* 1997). En réponse à la sécheresse, les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase (SOD) sont stimulées pour les jeunes feuilles adultes alors que pour les feuilles en croissance, seule l'activité de la peroxydase est stimulée. De plus, les jeunes feuilles adultes présentent des teneurs en protéines nettement supérieures à celles des feuilles en croissance, que l'alimentation en eau soit optimale ou non. Dans le cas de fragments de feuilles d'orge soumis à des solutions de Paraquat,

Casano *et al.* ont montré (1999) que l'activité de la SOD était préférentiellement stimulée pour les jeunes feuilles en expansion alors que la peroxydase était surtout induite pour les feuilles sénescentes.

7.3. Différences de réponse à la sécheresse et au ré-arrosage entre clones

Les clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' présentent un comportement similaire en réponse à une sécheresse d'intensité et de durée contrôlées. La croissance est fortement ralentie, la fermeture des stomates est quasiment concomitante pour les deux clones, la surface massique des feuilles est réduite à un niveau équivalent (paragraphe 3), l'ajustement osmotique lié aux oses solubles est semblable entre clones (paragraphe 4), le pouvoir antioxydant est maintenu de façon similaire pour les deux cultivars (paragraphe 5.2) et les activités des enzymes de la voie de détoxification de Halliwell-Asada sont stimulées (paragraphe 5.1). Néanmoins, en réponse au ré-arrosage, les vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles étaient stimulées uniquement pour le clone 'Dorskamp' (Marron *et al.* 2003). Au terme des expériences d'arrêts d'arrosage/ré-arrosages, la surface foliaire des boutures du clone 'Luisa_Avanzo' était toujours significativement plus réduite que celle des boutures du clone 'Dorskamp' par rapport à leurs témoins respectifs (Brignolas *et al.* 2000, Marron *et al.* 2003). La plus grande plasticité du clone 'Dorskamp' en réponse aux variations d'alimentations en eau est donc clairement visible après ré-arrosage. Cette faculté du clone 'Dorskamp' à stimuler sa croissance foliaire lorsque les conditions hydriques redeviennent favorables est à rapprocher des observations des forestiers pour qui le clone 'Dorskamp' est un clone plus plastique que le clone 'Luisa_Avanzo', supportant mieux les variations d'alimentation en eau de la nappe phréatique (Terrasson 1988, Soulères 1992).

Les différences les plus marquées entre les deux clones ne sont pas induites par la sécheresse mais constitutives. Lorsque l'alimentation en eau n'est pas limitante, le clone 'Luisa_Avanzo' présente, en effet, une croissance foliaire plus importante que celle du clone 'Dorskamp' en termes de vitesses d'apparition des feuilles, de vitesses d'étalement foliaire totales et individuelles et de nombres de feuilles en croissance. Les feuilles étalées par le clone 'Luisa_Avanzo' présentent également une surface massique plus élevée que celles du clone 'Dorskamp' (Marron *et al.* 2003). Ces différences constitutives de structure

des feuilles et de mise en place de la surface foliaire entre les deux clones ne pourraient-elles pas contribuer à expliquer les différences de niveau de tolérance à la sécheresse observées entre clones ? En d'autres termes, la structure des feuilles et leurs paramètres de croissance ne pourraient-ils pas être utilisés comme déterminants (traits, caractères) de productivité et de tolérance à la sécheresse ?

Chapitre 2

Recherche de déterminants foliaires de productivité et d'efficacité d'utilisation de l'eau

1. État des connaissances

1.1. Définition et facteurs influençant la productivité

La productivité dite biologique, pour la distinguer de la productivité économique ou rendement, est le résultat d'interactions complexes entre l'environnement et la constitution génétique de la plante (Ceulemans 1990). Les facteurs génétiquement contrôlés déterminant la productivité sont en général classés en trois catégories : (1) les traits fonctionnels (tels que l'efficacité de la photosynthèse, les pertes respiratoires et l'assimilation nette de carbone par unité de surface foliaire), (2) les traits structuraux (taille, structure et durée de vie de la canopée, des branches et des racines) et (3) l'interaction entre les deux précédentes catégories de facteurs (processus d'allocation) (Farmer 1976). Classiquement, ces facteurs ont été résumés dans une simple équation (West *et al.* 1920, Lambers 1998) :

$$\mathbf{RGR} = \mathbf{NAR} \times \mathbf{LAR}$$

$$\text{avec } \mathbf{LAR} = \mathbf{SLA} \times \mathbf{LMR}$$

où **RGR** est la vitesse de croissance relative (Relative Growth Rate, $\text{mg g}^{-1}_{\text{MS}} \text{ jour}^{-1}$), **NAR**, la vitesse d'assimilation nette de CO_2 (Net Assimilation Rate, $\text{g cm}^{-2} \text{ jour}^{-1}$), **LAR**, la surface foliaire rapportée à la biomasse (Leaf Area Ratio, $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}_{\text{MS}}$), **SLA**, la surface massique des feuilles (Specific Leaf Area, $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}_{\text{MS}}$) et **LMR**, l'allocation de biomasse au feuillage (Leaf Mass Ratio, $\text{g g}^{-1}_{\text{MS}}$). Les sempiternelles interrogations sont de savoir lequel ou lesquels des trois termes de la relation sont les plus importants pour expliquer les variations de la RGR et comment intervient l'environnement dans l'équation. Les avis divergent et il semble que le poids relatif des trois facteurs soit modulé par les conditions de croissance de la plante (lumière, température, richesse du sol, alimentation en eau...) et dépende de l'espèce considérée. Les auteurs des nombreuses études menées sur le sujet (tels que Huante *et al.* 1995, Saverimuttu et Westoby 1996, Huante et Rincon 1998,

Poorter et Van der Werf 1998, McKenna et Shipley 1999, Poorter 1999, Ryser et Wahl 2001, Taub 2002, Veneklaas 2002) s'entendent néanmoins sur le fait que la LMR est souvent faiblement corrélée à la RGR, la productivité étant, dans certaines conditions, sous la dépendance de la NAR et, dans d'autres, sous celle de la SLA. De plus, bien qu'il soit facile, pour une espèce donnée et dans des conditions de croissance standardisées, d'établir le sens des corrélations entre les quatre termes de l'équation, il est néanmoins difficile de savoir si la NAR, la SLA et la LMR **occasionnent** des changements de la RGR ou **résultent** de changements de la RGR.

La surface massique des feuilles (SLA) et la vitesse d'assimilation nette de CO₂ (NAR) semblent donc revêtir une importance particulière dans la détermination de la productivité, mais eux-mêmes sont sous la dépendance de nombreux autres traits fonctionnels et structuraux clés qui affectent la croissance supérieure et la productivité du peuplier (Ceulemans 1990). Ces déterminants existent à plusieurs niveaux, (i) **au niveau foliaire** : les modalités de mise en place des feuilles (surface, durée de l'étalement, vitesses d'apparition et de croissance), les caractéristiques stomatiques, la structure interne (épaisseur et densité, estimables *via* la SLA, anatomie), les orientations, les performances photosynthétiques (capacité et rendement quantique), (ii) **au niveau des branches** : les orientations, la ramification, le nombre d'axes proleptiques et sylleptiques et la surface foliaire portée par chaque type d'axe, (iii) **au niveau de l'arbre entier** : le volume et le diamètre du tronc, la biomasse, les performances photosynthétiques, la surface foliaire totale, la phénologie (émergence, sénescence et abscission des feuilles, débourrement et entrée en dormance des bourgeons), l'efficacité d'interception de la lumière et de la conversion de l'énergie.

1.2. La feuille : liens avec la productivité

Le feuillage est considéré comme le facteur clé de la production primaire des forêts. L'indice foliaire et la biomasse foliaire comptent parmi les principaux paramètres à considérer dans l'analyse des capacités et des processus de production d'une communauté forestière (Tadaki et Karizumi 1977). La feuille représente l'interface entre la plante et l'atmosphère, à la fois siège de la photosynthèse, régulatrice des échanges gazeux, limitatrice des risques de cavitation du xylème et moteur du flux de sève dans la plante. L'étalement d'une importante surface foliaire présente donc à la fois les avantages de maximiser l'absorption de la lumière et l'assimilation et l'inconvénient d'augmenter la

surface évaporante et les risques subséquents d'embolisme. Si, comme de nombreux auteurs s'accordent à le dire, l'influence de la LMR dans l'équation $RGR = NAR \times LMR \times SLA$ est minime, alors la productivité devient directement dépendante de la surface des feuilles, de leur masse et de leur aptitude à l'assimilation de CO_2 .

1.2.1. Surface foliaire

La surface foliaire totale est généralement étroitement corrélée à la production de biomasse chez le peuplier et cette corrélation est considérée comme étant génétiquement contrôlée (Larson et Isebrands 1972, Gifford et Jenkins 1982). Deux des facteurs principaux limitant la productivité au cours d'une saison de croissance sont le temps nécessaire à la mise en place de la surface foliaire maximale et l'aptitude de la plante à conserver cette surface (Watson 1952, Loomis et Williams 1963). En conditions stables, les modalités de mise en place de la surface foliaire présentent des similitudes entre clones de peuplier : la vitesse d'étalement de la feuille est exponentielle, pour un clone donné les plastochrones successifs sont de durée constante et la croissance de feuilles consécutives se fera à la même vitesse. Parmi les composants physiologiques déterminant la surface, la vitesse d'étalement individuelle des feuilles, la vitesse d'apparition et la durée de l'étalement varient significativement entre les clones (Ridge *et al.* 1986). Dans le cadre d'études associant diverses espèces d'hybrides de peuplier en conditions contrôlées, il a été montré que la durée d'étalement d'une feuille pouvait varier de 10 à 22 jours, la vitesse d'apparition des feuilles, de 0,5 à 1 feuille par jour et la vitesse d'étalement, de 7 à 18 mm de long par jour. La taille individuelle des feuilles pouvait également varier d'un facteur 10 entre les cultivars (Ridge *et al.* 1986, Ceulemans *et al.* 1988). Les hybrides les plus productifs présentaient les feuilles les plus grandes mais pas forcément les plus importantes vitesses d'apparition. Cependant, ces hybrides ont généralement les plus fortes vitesses d'étalement, leurs feuilles atteignent leur maturité plus rapidement et ils présentent moins de feuilles en croissance que des clones moins vigoureux (Ceulemans *et al.* 1988).

1.2.2. Rapport Surface / Masse foliaire

L'utilisation du rapport entre la surface de la feuille et sa masse sèche, la SLA (Evans 1972), a été proposée comme indicateur de productivité (Thumma *et al.* 2001). La SLA est directement liée à la densité et à l'épaisseur des feuilles (Niinemets 2001). Les augmentations de densité de feuille sont liées à des parois cellulaires plus épaisses ou à des

cellules plus serrées (Cutler *et al.* 1977, Krause et Kummerow 1977, Goryshina *et al.* 1979, Schulz 1984, Jones 1985, Niinemets 1999), alors que l'épaisseur dépend du nombre de couches de cellules mésophylliennes ou de la taille des cellules de chaque couche (Pieters 1974, De Lillis et Valetta 1985, Körner *et al.* 1989, Niinemets 1999). L'épaisseur et la densité des feuilles peuvent être toutes les deux responsables des différences de SLA entre espèces (Abrams *et al.* 1994, Garnier et Laurent 1994). Les feuilles à faibles SLA sont des feuilles plus coriaces, à plus longue durée de vie, adaptées à la conservation des ressources, par opposition aux feuilles à fortes SLA plutôt adaptées à l'acquisition des ressources (Coley *et al.* 1985, Choong *et al.* 1992, Lambers et Poorter 1992, Ryser 1996, Reich 1998, Poorter et Garnier 1999). Néanmoins, les nombreuses études menées sur le sujet ont mis en évidence que le lien entre SLA et productivité était très variable en fonction du type d'espèce considéré et des conditions de culture. La productivité a été montrée positivement corrélée à la SLA pour de nombreuses espèces aussi bien herbacées que ligneuses (Reich *et al.* 1992, Cornelissen *et al.* 1998, Veneklaas et Poorter 1998, Poorter et Garnier 1999, Veneklaas *et al.* 2002). D'autres études, menées essentiellement sur des plantes herbacées, n'ont cependant trouvé aucun lien entre SLA et productivité malgré d'importantes différences de SLA entre espèces (Reich 1998, Poorter et De Jong 1999). Enfin, un lien négatif entre SLA et productivité a également été observé dans plusieurs cas, comme par exemple avec la cacahuète ou la légumineuse *Stylosanthes scabra* (Nelson 1988, Wright *et al.* 1994, Thumma *et al.* 2001).

Les observations contradictoires sur le sens de la corrélation entre SLA et productivité sont sans doute dues en grande partie à la grande variété de conditions expérimentales des études précédemment citées qui ne nous permettent pas forcément de les comparer entre elles. La SLA est, en effet, un paramètre extrêmement sensible aux conditions de culture. Il a été notamment montré que le déficit hydrique ou une augmentation de l'intensité lumineuse réduisaient de manière importante la SLA (Witkowski et Lamont 1991, Groom et Lamont 1997, Niinemets 2001, Marron *et al.* 2003). Il semble également que, en conditions de faible éclaircissement ou lorsque la température est supérieure à 20°C, la SLA soit le principal déterminant de la productivité, alors que lorsque la lumière n'est plus limitante ou que la température est plus faible, les différences interspécifiques de vitesse d'assimilation nette de CO₂ (NAR) deviennent le principal déterminant de la productivité (Poorter et Van der Werf 1998, Shipley 2002, Loveys *et al.* 2002). De plus, la SLA varie énormément durant le développement de la

feuille avec notamment une augmentation durant l'étalement puis une réduction après que la feuille ait atteint sa taille adulte (Sicher *et al.* 1984, Rawson *et al.* 1987, Gunn *et al.* 1999, Marron *et al.* 2003). Pour envisager la SLA en tant que déterminant de productivité, le sens de la corrélation SLA/productivité, en ce qui concerne le peuplier, devra donc être déterminé pour des conditions expérimentales stables et en tenant compte de l'âge des feuilles.

La SLA et la vitesse d'assimilation nette de CO₂ (NAR) sont étroitement liées dans la détermination de la productivité. Il a d'ailleurs été montré qu'une réduction de la NAR, par exemple dans le cas de plantes transgéniques présentant un niveau réduit de RuBisCO, n'entraîne pas forcément une diminution de la productivité car cette réduction de la NAR est compensée par une augmentation de la SLA (Stitt et Schulze 1994, Quick 1998). En raison de l'antagonisme, précédemment évoqué, entre eau et carbone au niveau de la feuille, il est judicieux de corriger l'assimilation de CO₂ par la quantité d'eau transpirée pendant le même laps de temps. Le rapport entre assimilation nette de CO₂ et eau transpirée est défini comme l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE).

1.2.3. Efficacité d'utilisation de l'eau

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) peut être exprimée par rapport à deux échelles temporelles, instantanée ou intégrée dans le temps. Dans le second cas, WUE peut être estimée grâce à la discrimination isotopique du carbone ($\Delta^{13}\text{C}$), ces deux grandeurs étant corrélées négativement (Guehl *et al.* 1994, Brendel *et al.* 2002). L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est fortement héritable et corrélée à la productivité (Thumma *et al.* 2001). Néanmoins, une fois encore, le lien entre $\Delta^{13}\text{C}$ et la productivité est variable. En effet, le sens de la corrélation entre $\Delta^{13}\text{C}$ et productivité varie selon que la WUE est principalement contrôlée par les capacités photosynthétiques ou par la conductance stomatique de la plante (Farquhar *et al.* 1989). Si les variations de $\Delta^{13}\text{C}$ sont principalement causées par des changements de conductance stomatique, la productivité sera positivement corrélée à $\Delta^{13}\text{C}$ et négativement à WUE, en raison de l'augmentation de l'assimilation de carbone en réponse à l'augmentation de conductance stomatique. La croissance sera accrue ainsi que la discrimination contre ^{13}C au cours des échanges gazeux photosynthétiques. En revanche, si les variations de $\Delta^{13}\text{C}$ sont le résultat de changements dans les capacités photosynthétiques, la productivité sera négativement corrélée à $\Delta^{13}\text{C}$ et positivement à WUE. Peu d'études tentant d'associer WUE à productivité ont été menées

sur les végétaux ligneux. Néanmoins, des relations positives ont été observées pour la tomate (Martin et Thorstenson 1988), pour la luzerne (Ray *et al.* 1999) et pour le haricot (Zacharisen *et al.* 1999) alors que des relations négatives ont été rapportées pour la cacahuète (Hubick *et al.* 1986, Wright *et al.* 1988), pour le froment (Ehdaie *et al.* 1993) et pour le tournesol (Virgona et Farquhar 1996).

L'expérience décrite dans ce chapitre présentait deux objectifs : (i) mettre en évidence les liens entre la structure des feuilles, la croissance foliaire, la productivité et la discrimination isotopique du carbone au sein de l'espèce *P. x canadensis*, et (ii) proposer un outil simple pour discriminer les hybrides en fonction de leur niveau de productivité et leur efficacité d'utilisation de l'eau. Les résultats relatifs à cette expérience ont été soumis pour publication à la revue *New Phytologist*.

2. Caractères foliaires associés à la productivité et la discrimination isotopique du carbone parmi 31 clones de *Populus x canadensis* (Moench)

Nicolas Marron, Marc Villar, Erwin Dreyer, Didier Delay, Éric Boudouresque, Jean-Michel Petit, Francis M. Delmotte, Jean-Marc Guehl et Franck Brignolas

New Phytologist, soumis

Résumé

L'utilisation des paramètres de structure et de croissance des feuilles comme indicateurs de productivité et d'efficacité d'utilisation de l'eau pour l'espèce *P. deltoides x nigra* a été testée. Les paramètres ont été estimés à partir de boutures ligneuses de 2 mois de 31 clones élevées en pots de 4 L, en serre chauffée (18-20°C) et éclairée (photopériode de 16 h, densité de flux de photons transmis dans le PAR de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et alimentées en eau de manière optimale. Les boutures ont été groupées au hasard, en 6 lots contenant chacun une répétition de chaque clone. Quatre catégories de variables ont été décrites : (i) vigueur (biomasse totale, surface foliaire totale, allocation de biomasse au feuillage, etc.), (ii) croissance foliaire (vitesse d'apparition des feuilles, vitesse d'expansion des feuilles, etc.), (iii) structure foliaire (surface massique, azote, carbone) et (iv) discrimination isotopique du carbone (Δ), négativement corrélée à l'efficacité d'utilisation de l'eau. Les clones les plus productifs ne présentaient pas nécessairement une croissance foliaire importante (vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles), mais étalaient une surface foliaire supérieure et avaient des surfaces massiques et des teneurs en azote par unité de masse foliaire plus faibles que les clones peu vigoureux. L'efficacité d'utilisation de l'eau n'était pas corrélée avec la productivité, mais était étroitement associée au nombre total et à la vitesse d'apparition des feuilles. Les paramètres déduits des relations entre la surface massique des feuilles (SLA) et leur index de plastochrone foliaire (LPI) (SLA_A , LPI_A et S_0) se sont révélés être des indicateurs fiables de la productivité (SLA_A) et de l'efficacité d'utilisation de l'eau (LPI_A et S_0) pour les jeunes boutures des clones de *P. deltoides x nigra*.



Figure 2.1. Disposition des boutures des 31 clones de *P. x canadensis* à la serre du centre INRA d'Ardon, de jour (A) et de nuit (B).

Full title

Leaf traits correlated with productivity and carbon isotope discrimination in 31 *Populus x canadensis* (Moench) clones

Authors

Nicolas Marron¹, Marc Villar², Erwin Dreyer³, Didier Delay¹, Eric Boudouresque¹, Jean-Michel Petit¹, Francis M. Delmotte¹, Jean-Marc Guehl³, and Franck Brignolas^{1*}

Addresses

1 Laboratoire Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, UFR-Faculté des Sciences, Université d'Orléans, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France

2 INRA "Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières", BP 20619, Ardon, 45166 Olivet Cedex, France

3 UMR INRA-UHP "Ecologie et Ecophysiologie Forestières", INRA Nancy, 54280 Champenoux, France

* Author for correspondence: Franck Brignolas

Tel: +33 (0)2 38 49 48 02

Fax: +33 (0)2 38 49 49 11

Email: franck.brignolas@univ-orleans.fr

Running head

Links between leaf structure, leaf growth, productivity and $\Delta^{13}\text{C}$ in *P. deltoides x nigra*

Keywords

Populus x canadensis, specific leaf area, leaf plastochron index, leaf growth, productivity, carbon isotope discrimination, water-use efficiency.

Abbreviations

TLN, total leaf number; TLA, total leaf area; LMR, leaf mass ratio; RMR, root mass ratio; Biomass, total cutting dry weight; Lstem, stem length; dTLN/dt, total leaf number increment rate; dTLA/dt, total leaf area increase rate; Vmax, maximal increase rate of individual leaf area; LPI_{1d}, leaf plastochron index of the first leaf with null area increase rate; DLE, duration of leaf expansion; LPI_A, leaf plastochron index of the leaf with maximal specific leaf area; S₀, initial slope of the relationship specific leaf area - leaf plastochron index; C_M, leaf carbon content per dry weight unit; C_A, leaf carbon content per leaf area unit; N_M, leaf nitrogen content per dry weight unit; N_A, leaf nitrogen content per leaf area unit; LA_{max}, area of the largest leaf; SLA_A, largest specific leaf area; Δ_i , leaf carbon isotope discrimination measured at the beginning of the experiment; Δ_f , leaf carbon isotope discrimination measured at the end of the experiment.

Summary

We tested whether some leaf structural- and leaf growth parameters could be used as traits for productivity and water-use efficiency in *P. deltooides x nigra*. We assessed these traits in two-month-old rooted cuttings from 31 clones growing in 4-L pots, in a greenhouse under controlled temperature (18-20°C), light (16h photoperiod, photosynthetic photon fluence rate (PPFR) of 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400-700 nm) and optimal irrigation, in 6 randomized complete blocks with single tree plots. We used four groups of variables describing, (i) vigor (total biomass, leaf mass ratio, etc.), (ii) leaf growth (total leaf number increment rate, total leaf area increase rate, etc.), (iii) leaf structure (specific leaf area, nitrogen, carbon), and (iv) carbon isotope discrimination (Δ), which is negatively correlated with water-use efficiency. High yielding clones did not necessarily display large leaf growth such as total leaf number increment rate or total leaf area increase rate, but displayed higher total leaf area, lower specific leaf area and lower nitrogen per mass unit than clones with low vigor. Water-use efficiency did not correlate with productivity, but was strongly associated with total leaf number and total leaf number increment rate. Parameters derived from the relationship between specific leaf area and leaf plastochron index (SLA_A, LPI_A and S₀) were very accurate predictors of both productivity (SLA_A) and water-use efficiency (LPI_A and S₀) for young woody-cuttings of *P. deltooides x nigra* clones.

Introduction

Poplars are among the fastest growing trees under temperate latitudes and are of considerable commercial importance (Zsuffa *et al.*, 1996). Poplar cultivation tends to extend from bottomland to plateau areas where water availability is more irregular. Water availability is a major determinant of productivity in hybrid poplar (Tschaplinski & Blake, 1989; Tschaplinski *et al.*, 1994) inducing large changes in morphology and physiology (Ibrahim *et al.*, 1997). Although *Populus* spp. is generally considered to be highly vulnerable to decreased soil water availability, a considerable variability in the levels of drought tolerance has been detected among clones (Ceulemans *et al.*, 1978; Pallardy & Kozlowski, 1981; Gebre & Kuhns, 1991; Liu & Dickmann, 1996; Chen *et al.*, 1997). Several processes are involved in the response to drought, such as stomatal closure (Liu & Dickmann, 1992; Blake *et al.*, 1996; Harvey & van den Driessche, 1997; Marron *et al.*, 2002), osmotic adjustment (Gebre *et al.*, 1994; Marron *et al.*, 2002) and morphological changes (Liu & Dickmann, 1992; Chen *et al.*, 1997; Ibrahim *et al.*, 1997; Tschaplinski *et al.*, 1998). However, in poplars, the physiological bases of the variability in the degree of drought tolerance remain unclear (Tschaplinski *et al.*, 1998).

The relationship between productivity and water consumption, especially when water availability is limiting, is a subject of interest since the beginning of the twentieth century. Important inter- and intraspecific differences in water-use efficiency (WUE), defined as the ratio plant biomass accumulation / plant transpiration, have been reported (Briggs & Shantz, 1913). This trait, estimated via carbon isotope discrimination (Δ) – roughly the difference in carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) between atmospheric CO_2 and plant material measurements (Farquhar *et al.*, 1982; Farquhar & Richards, 1984), is highly heritable and has been correlated with productivity (Johnsen *et al.*, 1999). This parameter could be a good candidate for indirect selection for productivity. However, the relationship between WUE and productivity seems highly variable depending on species or genotypes. Absence of relationship suggests that the inter-genotype variability of WUE is mainly controlled by stomatal conductance and a positive one suggests that it is more controlled by photosynthetic capacity than by stomatal conductance (Farquhar *et al.*, 1989). Consequently, selection for high WUE may result in lower or higher productivity according to the predominant factor influencing variations of WUE for a considered species (Condon *et al.*, 1987). For this reason, it was suggested that the use of Δ for selection for high productivity should be coupled to other traits, less ambiguous indicators

of productivity such as leaf structure (*i.e.* specific leaf area) and leaf growth (*i.e.* leaf number increment rate, leaf area increase rate, total foliar area, etc.) (Larson & Isebrands, 1971; Guehl *et al.*, 1994; Ceulemans, 1990; Thumma *et al.*, 2001; Brendel *et al.*, 2002). Indeed, many authors classically decompose relative growth rate (RGR, $\text{g g}^{-1}_{\text{d.wt}} \text{day}^{-1}$) into net assimilation rate (NAR, $\text{g cm}^{-2} \text{day}^{-1}$), specific leaf area (SLA, defined as the ratio between leaf area and leaf dry weight, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) and leaf mass ratio (LMR, $\text{g g}^{-1}_{\text{d.wt}}$). If correlations between RGR and LMR are weak, the relative importance of SLA and NAR in the equation varies (Huante *et al.*, 1995; Saverimuttu & Westoby, 1996; Huante & Rincon, 1998; McKenna & Shipley, 1999; Poorter, 1999; Ryser & Wahl, 2001; Taub, 2002). Inter-specific differences in SLA are the main determinant of the variability of RGR at low irradiance, while at high irradiance inter-specific differences in NAR become the main determinant of RGR (Poorter & Van der Werf, 1998; Shipley, 2002).

Specific leaf area (SLA) is correlated with leaf anatomy traits (Cambridge & Lambers, 1998; Pyankov *et al.*, 1998), RGR (Singh *et al.*, 1985; Atkin & Lambers, 1998; Poorter & Van der Werf, 1998), and net photosynthesis (McClendon, 1962). SLA is determined by both leaf density and thickness (Niinemets, 2001). Increases in thickness are primarily due to additional photosynthetically competent mesophyll cell layers as well as to larger cells in each individual mesophyll layer (Pieters, 1974; De Lillis & Valletta, 1985; Körner *et al.*, 1989; Niinemets, 1999), while increases in density are due to thicker cell walls and to smaller and more tightly packed cells (Cutler *et al.*, 1977; Krause & Kummerow, 1977; Goryshina *et al.*, 1979; Schulz, 1984; Jones, 1985; Niinemets, 1999). Natural variations in both thickness and density have been shown to be responsible for variation in SLA among species (Abrams *et al.*, 1994; Garnier & Laurent, 1994). In a number of recent broad-scale comparisons of growth parameters in herbaceous and woody species, SLA was positively linked to relative growth rate (Reich *et al.*, 1992; Cornelissen *et al.*, 1998; Veneklaas & Poorter, 1998; Poorter & Garnier, 1999; Veneklaas *et al.*, 2002). The low SLA of slow-growing species often relates to higher leaf life-span and toughness (Reich *et al.*, 1991) and larger carbon (mainly in cell walls) - and lower nitrogen - contents (Coley, 1983). However, contrasting evidence comes from the observation that mature forest stands of evergreen conifers and deciduous hardwood species do not differ in productivity, despite strong differences in SLA (Reich, 1998; Poorter & De Jong, 1999). Moreover, several other studies have shown a negative correlation between SLA and biomass production (Nelson, 1988; Wright *et al.*, 1994; Thumma *et al.*, 2001). This

relationship was supposed to be due to the fact that plants with low SLA will have more mesophyll cells per unit area or larger mesophyll cells, leading to higher rates of CO_2 assimilation and, consequently, higher biomass production.

In previous studies we compared two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Luisa_Avanzo' and 'Dorskamp', known to differ in their level of drought tolerance in the field (Soulères, 1992). The most susceptible to drought ('Luisa_Avanzo') displayed larger SLA and leaf growth (leaf number increment and leaf area increase rates) than the drought tolerant one (Soulères, 1992; Brignolas *et al.*, 2000; Marron *et al.*, 2002; Marron *et al.*, 2003). Thus leaf growth and leaf structure (SLA) could be positively correlated and linked to drought tolerance, but this conclusion needs be reinforced by a comparison based on a large range of clones.

With the general goal to analyze the clonal variability in ecophysiological traits of productivity and drought tolerance in poplars, we tested whether leaf structure and growth traits may be used as indicators of inter-clonal variability of productivity and water-use efficiency. We compared 31 *Populus x canadensis* (Moench) clones from various origins with contrasting levels of productivity in field plantations, and grown in a greenhouse. Leaf structure was described by carbon and nitrogen contents, and SLA measured at individual leaf level. Indeed, each leaf on an individual cutting may exhibit different SLA depending on its position on the stem, *i.e.* on its age, stage of development and degree of maturity (Sicher *et al.*, 1984; Rawson *et al.*, 1987; Gunn *et al.*, 1999; Marron *et al.*, 2002). To take into account leaf age in the analysis, we used the concept of leaf plastochron index (LPI, Erickson & Michelini, 1957). Use of leaf plastochron index for leaf age requires to maintain a constant leaf production rate and thus, to work under non-limiting conditions at least for water, nutrients and light. Vigor and leaf growth parameters consisted in total biomass, leaf mass ratio, root mass ratio, length of the stem, total leaf area, total leaf number, total leaf number increment rate, total leaf area increase rate, maximal leaf area, maximal leaf area increase rate and duration of leaf expansion. Carbon isotope discrimination was considered as a surrogate of water-use efficiency. Our approach aimed at: (1) elucidating the links between leaf structure, leaf growth, productivity and carbon isotope discrimination; (2) proposing simple tools to discriminate *P. x canadensis* hybrids for their level of productivity and for their water-use efficiency.

Table 1 Relationships between measured leaf area (A) and measured leaf width (W). Each equation is followed by the fraction of explained variance (r^2). The relation is: $A = (a \times W^3) + (b \times W^2) + (c \times W) + d$. All correlations are significant at $P \leq 0.001$. Non-significant parameters are indicated in brackets.

Clone	Origin	Abbreviation	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	r^2
'2000_verde'	Italy	2000v	0.0026	1.168	(-28.14)	(482.7)	0.984
'Agathe_F'	USA / Holland	AF		0.590	(5.75)	(21.8)	0.974
'Boccalari'	Italy	Bcl		0.799	(-4.13)	(243.6)	0.966
'Branagesi'	Italy	Bg		0.973	(-23.96)	(504.5)	0.970
'Brenta'	Italy	Bt	-0.0022	1.123	(-27.48)	(471.1)	0.972
'Cappa_Bigliona'	Italy	CB		0.759	(-9.90)	(300.9)	0.976
'Carpaccio'	Italy	Cc		0.795	(7.50)	(-125.4)	0.978
'Cima'	Italy	Cm		0.844	(-9.31)	(222.5)	0.978
'Dorskamp'	Holland	Ds	-0.0034	1.398	-44.24	698.8	0.988
'Eco_28'	Italy	E28		0.831	(-18.38)	(611.5)	0.968
'Flevo'	Holland	Fv		0.826	(-15.47)	(342.0)	0.974
'Gaver'	Belgium	Gv	-0.0020	1.110	-27.25	433.6	0.986
'Ghoy'	Belgium	Gy	-0.0027	1.250	-30.67	423.7	0.982
H-523-9	Hungary	H5		0.650	(-4.61)	(259.5)	0.976
'I 214'	Italy	I2		0.716	(-7.83)	(310.1)	0.976
'I-45-51'	Italy	I4		0.812	(-13.32)	(367.2)	0.970
'Kopecky'	Hungary	Kp		0.629	(2.29)	(160.3)	0.980
'Koster'	Holland	Ks		1.268	(-31.25)	(489.8)	0.976
'Lambro'	Italy	Lb		1.303	(-35.44)	(621.2)	0.970
'Luisa_Avanzo'	Italy	LA		0.727	(-2.40)	(158.2)	0.984
'Mella'	Italy	MI		0.736	(-13.21)	(388.6)	0.974
'Mellone_Carlo'	Spain	MC		0.794	(-14.09)	(383.3)	0.978
NL-1070	Holland	N10		0.674	(-4.71)	(142.5)	0.988
NL-3149	Holland	N31		1.169	(-27.30)	(442.3)	0.958
NL-3972	Holland	N39		0.814	-13.69	(295.1)	0.974
NL-4040	Holland	N40	0.0039	(0.044)	(30.52)	(-208.0)	0.974
'Pannonia'	Hungary	Pn	-0.0028	1.240	(-25.43)	(444.1)	0.978
'Robusta'	France	Rb		0.649	(5.38)	(11.2)	0.974
'San_Martino'	Italy	SM		0.688	(1.75)	(137.2)	0.970
'Soligo'	Italy	Sg		0.695	(10.98)	(28.7)	0.962
'Triplo'	Italy	Tp		0.678	(3.28)	(139.4)	0.976

Material and methods

Plant material and growth

The experiments were carried out with homogeneous 25-cm long woody stem cuttings of 31 *Populus x canadensis* (Moench) (*P. deltoides* (Bartr.) Marsh. x *P. nigra* L.) clones from diverse origins (Table 1). During February 2001, one-month-old rooted cuttings of each clone were repotted into 4-L pots containing a mixture of blond and brown peat, horse manure, heather and bromide disinfected compost (25:25:20:20:10, v/v, pH 5.8) (Falienor, Vivy, France). Cuttings were grown in a greenhouse under controlled temperature (18-20°C), light (16h photoperiod, photosynthetic photon fluence rate (PPFR) of 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400-700 nm) and optimal irrigation, in 6 randomized complete blocks with single tree plots.

In order to calculate the leaf plastochron index (LPI), leaves of each cutting were numbered from top to bottom of the stem. The young leaf just exceeding 20 mm length was indexed 0 (Foliar Index = 0) (Larson & Isebrands, 1971). Every second day from March 7, 2001 to April 3, 2001, length and width of each leaf were measured on all cuttings. LPI was computed as FI + PI where FI is the foliar index (*i.e.* leaf rank on the stem) and PI is the plastochron index ($\text{PI} = (\log L_0 - \log 20) / (\log L_0 - \log L_{-1})$); L_0 is the lamina length in millimeters of the leaf indexed 0, and L_{-1} is the lamina length of the leaf indexed “-1”, the first leaf measuring less than 20 mm (Erickson & Michelini, 1957).

On March 13, 2001 (Day 72) and April 3, 2001 (Day 93), all leaves of three cuttings by clone were collected and ordered according to their LPI. They were photocopied, dried at 75°C for 24 h and weighted. Photocopies were scanned and leaf area was estimated with an image analyzer (UTHSCSA *Image Tool* program developed at the University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA, Texas and available from the Internet by anonymous FTP from maxrad6.uthscsa.edu). Total leaf area (TLA, cm^2) was calculated by summing individual leaf areas, and specific leaf area (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) as the ratio between individual leaf area and dry weight. Relationships between SLA and LPI were then established for each clone at each date. On Day 93, the length of the main stem (Lstem) was measured, and roots and stems were collected, dried at 75°C for 48 h and weighted. Total cutting biomass (Biomass, $\text{g}_{\text{d.wt}}$) was calculated by summing weights of leaves, green-stem, woody-stem and roots. Leaf mass ratio (LMR, $\text{g g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) and root mass ratio (RMR, $\text{g g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) were computed as (total foliage dry weight)/(Biomass) and (total root dry

Table 2 List, abbreviation and description of the variables used in this study. Variables were grouped as related to plant vigor, leaf growth, leaf structure and water-use efficiency (Δ).

	Variable	Description	Illustration
Vigor	TLN	Total leaf number	Fig. 1
	TLA	Total leaf area (cm ²)	Fig. 1
	LMR	Leaf mass ratio (g g ⁻¹ _{d.wt}) = Foliage biomass / Total biomass	
	RMR	Root mass ratio (g g ⁻¹ _{d.wt}) = Root biomass / Total biomass	
	Biomass	Total cutting dry weight (g _{d.wt})	
	Lstem	Stem length (cm)	
Leaf growth	dTLN/dt	Total leaf number increment rate (day ⁻¹)	Fig. 1
	dTLA/dt	Total leaf area increase rate (cm ² day ⁻¹)	Fig. 1
	Vmax	Maximal increase rate of individual leaf area (cm ² day ⁻¹)	Fig. 2a
	LPI _{ad}	LPI of the first leaf with null area increase rate	Fig. 2a
	DLE	Duration of leaf expansion (day) = LPI _{ad} x (dt/dTLN)	
	LPI _A	LPI of the leaf with maximal SLA along the stem	Fig. 2c, d
	S ₀	= (dSLA/dLPI) ₀ = (dSLA/dt) x (dt/dLPI) = (dSLA/dt) x (dt/dTLN)	Fig. 2c, d
Leaf structure	C _M , C _A	Leaf carbon content per dry mass (mg g ⁻¹ _{d.wt}) or leaf area (g ⁻¹ m ⁻²)	
	N _M , N _A	Leaf nitrogen content per dry mass (mg g ⁻¹ _{d.wt}) or leaf area (g ⁻¹ m ⁻²)	
	L _{Amax}	Area of the largest leaf (cm ²)	Fig. 2b
	SLA _A	Largest specific leaf area along the stem (cm ² g ⁻¹ _{d.wt})	Fig. 2c, d
	Δ_i	Leaf carbon isotopic discrimination measured on Day 72 (‰)	
	Δ_f	Leaf carbon isotopic discrimination measured on Day 93 (‰)	

weight)/(Biomass), respectively. At each date, two leaves of each cutting, for which FI varied between 10 and 15, were ground to powder and one milligram was combusted and analyzed for ^{13}C , total C and N composition using a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Germany). Carbon isotope composition was calculated relative to the Pee Dee Belemnite standard as (Craig, 1957):

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_{sa} - R_{sd}}{R_{sd}} \times 1000 [\text{‰}],$$

where R_{sa} and R_{sd} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of the sample and the

standard, respectively. The discrimination between the atmospheric CO_2 (δ_{air} was assumed to be close to -8‰) and plant material (δ_{plant}) was calculated as (Farquhar & Richards,

1984): $\Delta = \frac{\delta_{air} - \delta_{plant}}{1 + \frac{\delta_{plant}}{1000}}$. Total carbon and nitrogen were expressed per dry weight unit

($C_M, N_M, \text{mg g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) and per leaf area unit ($C_A, N_A, \text{g m}^{-2}$).

Allometric relationships between leaf dimensions (length or width) and leaf area were estimated at Days 72 and 93 from image analysis. Leaf length and width have been measured manually 6 times between Days 72 and 93, and total leaf number (TLN), total leaf area (TLA), total leaf number increment rate ($d\text{TLN}/dt, \text{day}^{-1}$) and total leaf area increase rate ($d\text{TLA}/dt, \text{cm}^2 \text{day}^{-1}$) were computed. Individual leaf growth rate ($\text{cm}^2 \text{day}^{-1}$) was computed at Days 72 and 93 and used to derive: 1- maximal leaf area (LAm_{ax}), 2- LPI of the first leaf with null area increase rate (LPI_{ad}), 3- maximal value of individual leaf area increase rate (V_{max}) and 4- duration of leaf expansion (DLE=LPI_{ad} × dt/dTLN). A detailed list of all variables used in this analysis is provided in Table 2.

Statistical analyses

Results were evaluated by linear regression and correlation analyses and analysis of variance using the SPSS statistical software package (SPSS, Chicago, IL). When regression analysis indicated an effect of LPI, the latter was included in the statistical model as a covariate. All statistical tests were considered significant at $P < 0.05$. Means are expressed with their standard error ($\pm \text{SE}$).

In order to study inter-clonal variability of all parameters followed in this experiment, we performed multivariate analyses using principal components analysis (PCA). The basic variables were standardized and orthogonal factors (= F1 and F2 axis) were successively built as linear combinations of these variables to maximize the part of the variability

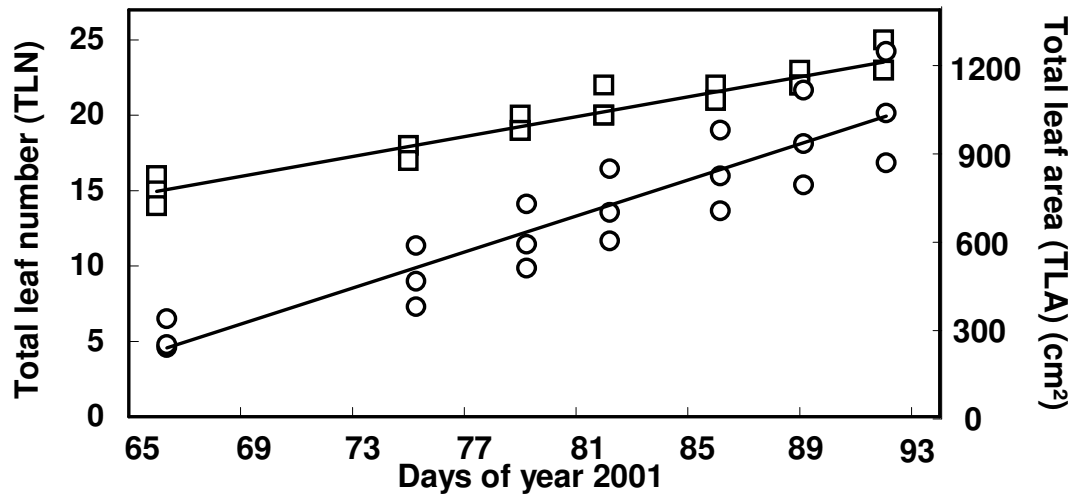


Fig. 1 Time course of total leaf number (squares) and total leaf area (circles) during the experiment for 3 rooted cuttings of the clone 'Luisa_Avanzo'.

explained by these factors. Variables were first represented on the plane defined by the two main factors of the PCA; their coordinates were their linear correlation coefficients (Pearson's coefficient) with these factors.

Results

For each clone, an allometric equation was developed between leaf area and either leaf length or width and used to derive leaf area from *in situ* measurements during the experiment. The best fits were obtained with width rather than with length (Table 1). For each clone, a significant, linear, and positive relationship was obtained between time (days of year) and total leaf number (TLN) or total leaf area (TLA) (Fig. 1 and Table 3). Thus, total leaf number increment rate ($d\text{TLN}/dt$, day^{-1}) and total leaf area increase rate ($d\text{TLA}/dt$, $\text{cm}^2 \text{day}^{-1}$) remained stable during the experiment and this allowed us to use leaf plastochron index (LPI) as estimator of leaf age.

Presentation of variables, time and clonal variations

Significant trinomial functions have been fitted to the relationships between specific leaf area (SLA) and leaf plastochron index (LPI) on Days 72 and 93, separately (Table 4). The relationships between LPI and individual leaf area, individual leaf area increase rates or SLA were used to estimate several parameters on Days 72 and 93: maximal leaf area (L_{Amax}) (Fig. 2a); maximal increase rate of individual leaf area (V_{max}), LPI of the first leaf with null area increase (LPI_{ad}) (Fig. 2b); maximal specific leaf area (SLA_A), LPI of the leaf with maximal SLA (LPI_A) and initial slope (S_0) ($=d\text{SLA}/d\text{LPI}_0$) (Fig. 2c, d). S_0 is a simple and useful index of total leaf number increment rate ($d\text{TLN}/dt$). Indeed, as shown in Table 2, S_0 is negatively linked to $d\text{TLN}/dt$, depending of the weight of $d\text{SLA}/dt$ in the relationship. Duration of leaf expansion (DLE) was computed at both dates as LPI_{ad} \times ($dt/d\text{TLN}$).

Maximal and minimal clonal values of the recorded variables are indicated in Table 5. An important inter-clonal variability was recorded for most of the vigor and leaf growth parameters with a very large range (factor 2 to 5) (Table 5). Biomass production ranged from 12.3 to 36.6 $\text{g}_{\text{d.wt}}$. For SLA, highly significant inter-clonal differences were observed. Mass based carbon and nitrogen contents in the leaves were similar while they differed when expressed on a leaf area basis reflecting differences in SLA (Table 5). At both dates, significant differences were observed between clones regarding carbon isotope

Table 3 Slopes (a) and Pearson's coefficient (r) of the linear regressions between days of year (D) and total leaf number (TLN) or total leaf area (TLA) of rooted cuttings from several poplar clones. Except for clone NL-3149 ($P \leq 0.05$), all correlations are significant at $P \leq 0.001$.

Clone	TLN = $aD + b$		TLA = $aD + b$	
	a (day^{-1})	r	a ($\text{cm}^2 \text{day}^{-1}$)	r
'2000_verde'	0.340	0.867	46.26	0.967
'Agathe_F'	0.344	0.970	28.28	0.988
'Boccalari'	0.380	0.940	43.26	0.862
'Branagesi'	0.355	0.984	56.06	0.930
'Brenta'	0.323	0.811	45.71	0.923
'Cappa_Bigliona'	0.347	0.794	37.12	0.782
'Carpaccio'	0.404	0.986	61.30	0.996
'Cima'	0.311	0.762	36.46	0.688
'Dorskamp'	0.348	0.937	34.89	0.955
'Eco_28'	0.151	0.906	33.51	0.982
'Flevo'	0.386	0.925	42.48	0.918
'Gaver'	0.380	0.788	31.34	0.664
'Ghoy'	0.353	0.940	62.99	0.923
H-523-9	0.347	0.825	25.11	0.908
'I-214'	0.244	0.878	31.77	0.970
'I-45-51'	0.271	0.676	43.35	0.916
'Kopecky'	0.380	0.955	33.44	0.919
'Koster'	0.401	0.738	48.02	0.821
'Lambro'	0.273	0.726	51.33	0.776
'Luisa_Avanzo'	0.324	0.962	31.19	0.922
'Mella'	0.342	0.783	36.58	0.803
'Mellone_Carlo'	0.306	0.930	34.83	0.878
NL-1070	0.336	0.922	40.46	0.940
NL-3149	0.362	0.959	54.80	0.923
NL-3972	0.230	0.582	18.28	0.430
NL-4040	0.368	0.903	21.24	0.779
'Pannonia'	0.315	0.894	44.80	0.950
'Robusta'	0.318	0.866	28.90	0.772
'San_Martino'	0.220	0.882	27.19	0.753
'Soligo'	0.271	0.846	28.29	0.835
'Triplo'	0.215	0.921	35.71	0.981

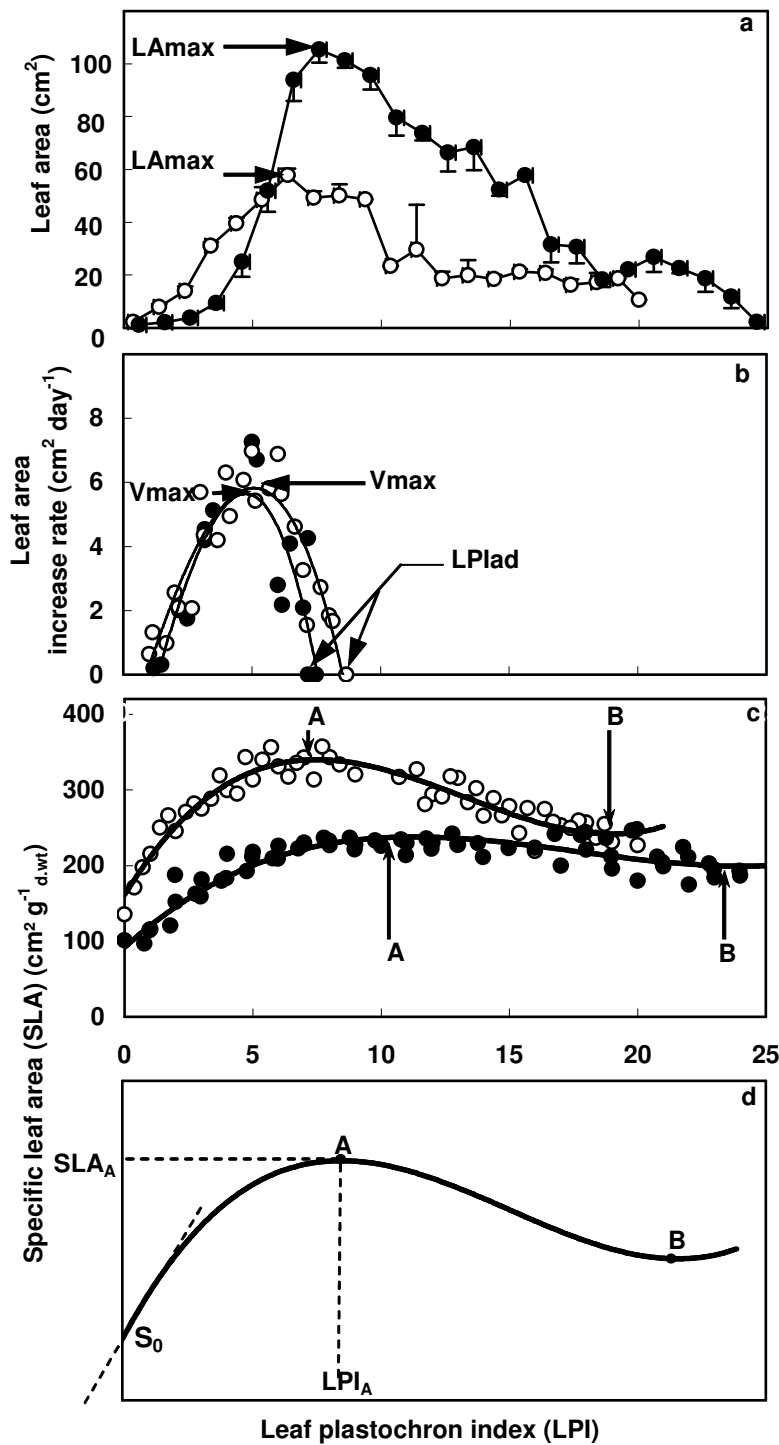


Fig. 2 Relationships between leaf plastochron index (LPI), leaf area (a), leaf area increase (b) and specific leaf area (SLA) (c and d). These relationships were established on Day 72 (open circles) and Day 93 (closed circles) on rooted cuttings of clone 'Luisa_Avanzo'. LAm_{ax} corresponds to the maximal leaf area along the stem. LPI_{lad} corresponds to the LPI of the first leaf with null area increase. V_{max} corresponds to the maximal leaf area increase along the stem. Point A (LPI_A, SLA_A) marks the leaf with maximum SLA. S₀ is the initial slope of the relationship for LPI = 0.

Table 4 Non-linear regressions between specific leaf area (SLA) ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) and leaf plastochron index (LPI) established for Days 72 and 93. The established relation is: $\text{SLA} = (a \times \text{LPI}^3) + (b \times \text{LPI}^2) + (c \times \text{LPI}) + d$. For each clone and date, the fraction of explained variance (r^2) is significant at $P \leq 0.001$. Non-significant parameters are indicated in brackets.

clone	Day 72					Day 93				
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	r^2	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	r^2
'2000_verde'	0.097	-4.019	44.39	158.6	0.790	0.006	-0.384	5.97	160.1	0.368
'Agathe_F'	0.074	-3.677	48.44	169.6	0.591	(0.004)	(-0.427)	10.40	174.6	0.410
'Boccalari'	0.127	-4.751	46.20	216.1	0.610	0.015	-0.984	18.63	127.5	0.788
'Branagesi'	0.095	-3.579	38.59	175.2	0.334	0.009	-0.719	16.49	127.5	0.801
'Brenta'	0.124	-5.162	59.81	129.7	0.812	0.044	-2.194	31.86	101.2	0.817
'Cappa_Bigliona'	0.243	-8.265	78.00	136.4	0.664	0.0269	-1.585	28.21	113.3	0.753
'Carpaccio'	0.074	-3.509	47.16	129.7	0.799	0.017	-1.184	23.28	98.1	0.889
'Cima'	0.107	-4.431	48.72	177.8	0.876	0.044	-2.144	29.94	118.2	0.637
'Dorskamp'	0.279	-9.141	80.71	154.9	0.821	0.026	-1.419	22.63	140.8	0.611
'Eco_28'	0.550	-13.990	98.78	128.7	0.764	0.135	-4.440	41.06	121.7	0.689
'Flevo'	0.097	-3.953	44.08	154.3	0.645	(0.002)	(-0.273)	8.01	193.3	0.540
'Gaver'	0.244	-8.440	78.01	176.4	0.810	0.054	-2.785	39.85	119.4	0.643
'Ghoy'	0.133	-5.300	55.73	202.4	0.228	0.028	-1.798	33.88	94.1	0.867
H-523-9	0.200	-6.667	58.80	220.5	0.618	0.025	-1.496	25.48	153.2	0.594
'I-214'	0.196	-6.489	58.86	181.4	0.750	(0.002)	(-0.327)	8.98	172.3	0.383
'I-45-51'	1.226	-26.556	160.53	(96.0)	0.874	0.042	-2.015	29.82	74.3	0.837
'Kopecky'	0.204	-7.529	76.23	136.9	0.810	0.061	-2.759	37.08	88.0	0.821
'Koster'	(0.161)	(-5.128)	(38.77)	287.4	0.658	0.052	-2.633	37.71	102.4	0.776
'Lambro'	0.400	-8.762	57.70	207.5	0.706	0.034	-1.626	25.07	91.6	0.745
'Luisa_Avanzo'	0.129	-5.124	54.99	161.3	0.887	0.038	-2.000	30.71	91.7	0.861
'Mella'	0.071	-3.030	38.53	139.9	0.608	0.038	-1.969	31.54	86.0	0.865
'Mellone_Carlo'	0.151	-6.106	67.60	113.4	0.759	0.077	-3.318	40.46	103.9	0.558
NL-1070	0.134	-5.038	52.82	132.9	0.771	0.020	-1.011	13.98	159.8	0.556
NL-3149	0.159	-5.819	55.75	177.7	0.604	0.034	-1.769	26.70	95.8	0.810
NL-3972	0.178	-6.060	55.05	185.3	0.542	0.052	-2.112	23.60	143.0	0.244
NL-4040	0.100	-4.084	48.03	131.3	0.826	0.011	-0.865	18.91	109.2	0.687
'Pannonia'	0.098	-3.979	47.79	120.7	0.819	0.015	-0.908	16.69	126.7	0.598
'Robusta'	0.067	-2.934	36.10	181.7	0.576	0.015	-0.962	18.24	138.7	0.561
'San_Martino'	0.272	-8.221	71.04	132.8	0.837	0.190	-5.396	47.08	102.5	0.616
'Soligo'	0.310	-9.202	74.99	151.5	0.738	0.130	-4.378	42.71	94.5	0.484
'Triplo'	0.312	-9.180	75.69	136.3	0.783	0.079	-2.928	33.20	98.8	0.484

discrimination (Δ) (Table 5). Carbon isotope discrimination (Δ) varied among clones by more than 6‰ extremes during Day 72 and 3‰ during Day 93.

All variables displayed significant differences between Day 72 and Day 93 (Table 6), with the exception of Δ . Mean values of total leaf carbon content (C_M and C_A) remained almost stable while total leaf nitrogen (N_M and N_A) decreased (Table 5). This decrease could be due to a reduction of N availability in the soil in the pots at the end of the experiment. LPI_A increased significantly and SLA_A and S_0 decreased (Fig. 2c). SLA_A as well as L_{Amax} increased from base to top of the stem. Thus, leaf area and thickness and/or density of fully expanded leaves increased with cutting age. However, LPI_A , as well as SLA_A or S_0 , were positively correlated between Days 72 and 93, confirming the stability with time of the inter-clonal differences for these variables (Table 6). Only the variables describing leaf area (TLA , V_{max} , L_{Amax}) and leaf carbon and nitrogen contents were not correlated between Days 72 and 93 (Table 6).

Relationships between variables

A general PCA was performed with clonal means of all variables from Day 93, excepted C_A and N_A . The main plane of the PCA (F1 x F2) explained 48.1 % of the inter-clonal variability with F1 explaining 28.6 % (Fig. 3). Axis F3 of PCA has been analyzed but it did not clearly differentiate clones for parameters used in this study and it reflected only 12.6 % of total variance (data not shown). Thus results presented after have been limited to the main plane F1 x F2.

F1 axis of the PCA was clearly defined by the opposition between S_0 and the group of variables including LPI_A , TLN , $dTLN/dt$, LPI_{ad} and L_{stem} (Fig. 3). S_0 scaled negatively with TLN at both dates and with $dTLN/dt$ on Day 72 only (Table 7). Thus, as previously suspected, S_0 is a simple and useful index of total leaf number (TLN) and total leaf number increment rate ($dTLN/dt$). On Day 93, TLN and $dTLN/dt$ did not correlate with Biomass. On Days 72 and 93, TLN and $dTLN/dt$ scaled positively with LPI_{ad} , while $dTLN/dt$ scaled negatively with duration of leaf expansion (DLE) (Table 7). On Day 72 and to a lower extent on Day 93 ($P=0.06$), LPI_A and LPI_{ad} were positively correlated showing that LPI_A , as LPI_{ad} , reflected the rank of the first leaf with null area increase rate and thus, that young mature leaves presented the highest SLA (SLA_A). TLN was linked to TLA on Day 93 only, while $dTLN/dt$ and TLA did not correlate at both dates. On Days 72 and 93, Δ was positively correlated with TLN and LPI_A and was negatively correlated with S_0 (Table 7).

Table 5 Minimum and maximum means of variables measured on Days 72 and 93. Significant differences between clones (ANOVA) are indicated by asterisks: * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$ and *** = $P \leq 0.001$. See Table 3 for codes.

Variable	Day 72			Day 93			
	Minimum	Maximum	<i>P</i>	Minimum	Maximum	<i>P</i>	
Vigor	TLN	10.0	21.7	***	16.0	31.5	***
	TLA (cm ²)	286.2	1038.3	***	875.3	1880.9	*
	LMR (g g ⁻¹ _{d.wt})				0.24	0.39	***
	RMR (g g ⁻¹ _{d.wt})				0.031	0.117	***
	Biomass (g _{d.wt})				12.28	36.61	***
	Lstem (cm)				33.43	70.93	***
Leaf growth	dTLN/dt (day ⁻¹)	0.15	0.40	***	0.15	0.40	***
	dTLA/dt (cm ² day ⁻¹)	18.28	62.99	***	18.28	62.99	***
	Vmax (cm ² day ⁻¹)	1.47	11.61	***	3.73	14.85	***
	LPIad	7.80	12.40	***	5.00	11.10	***
	DLE (day)	22.29	52.00		20.26	35.45	**
	LPI _A	4.5	9.8	***	6.5	17.0	***
	S ₀ (cm ² g ⁻¹ _{d.wt})	36.1	160.5	***	6.0	47.1	***
Leaf structure	LAm _{max} (cm ²)	28.81	148.88	***	69.89	179.99	***
	C _M (mg g ⁻¹ _{d.wt})	433.4	488.2		416.0	444.6	***
	C _A (g m ⁻²)	13.4	18.61	***	11.93	25.73	***
	N _M (mg g ⁻¹ _{d.wt})	36.3	45.2		19.9	30.8	
	N _A (g m ⁻²)	0.93	1.63	*	0.68	1.44	**
	SLA _A (cm ² g ⁻¹ _{d.wt})	293	398	***	188	293	***
	? (‰)	21.7	27.9	**	23.1	26.3	***

Table 6 Significant differences (ANOVA) and linear correlations (Pearson's coefficient) between Days 72 and 93 for vigor, leaf growth, leaf structure and Δ variables. Significant correlations are indicated by asterisks: * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$ and *** = $P \leq 0.001$. See Table 3 for codes.

		ANOVA	Linear correlations
Vigor	TLN	***	0.95***
	TLA	***	
Leaf growth	Vmax	***	
	LPI _{lad}	***	0.47**
	DLE	**	0.59***
	LPI _A	***	0.49**
	S ₀	***	0.41*
Leaf structure	C _M	***	
	C _A	***	0.47**
	N _M	***	
	N _A	***	
	L _A max	***	
	SLA _A	***	0.50**
Δ			0.65***

Table 7 Linear correlations (Pearson's coefficient) between vigor variables (TLN, TLA, LAR, RMR, Biomass, Lstem), leaf growth variables (dTLN/dt, dTLA/dt, Vmax, LPlad, DLE, LPIA, S0), leaf structure variables (CM, CA, NM, NA, LAMax, SLAA) and Δ . Linear correlations are measured on Day 72 (italic characters) and on Day 93 (bold characters) separately. Level of significance is indicated by asterisks: * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$ and *** = $P \leq 0.001$. See Table 3 for codes.

	Vigor						Leaf growth						Leaf structure							
	TLN	TLA	LMR	RMR	Biomass	Lstem	dTLN/dt	dTLA/dt	Vmax	LPlad	DLE	LPIA	S0	CM	CA	NM	NA	LAMax	SLAA	Δ
TLN							0.57													0.40
TLA	0.44 *						**		0.42				-0.53					0.68	-0.37	*
LMR									*				**					***	*	*
RMR			0.38 *																	
Biomass		0.72 ***	*																	
Lstem	0.67 ***	0.56 **	**		0.56 **															
dTLN/dt	0.80 ***					0.45 *	*		0.49	-0.77	0.44	-0.43					-0.57			
dTLA/dt						*			**	***	*	*								
Vmax								0.73 ***									0.37	0.47	*	
LPlad	0.56 **						0.78 ***	0.45 *	0.39 *		0.60	-0.46								
DLE	-0.64 ***					-0.38 *	**				***	**					0.53			
LPIA	0.70 ***	0.41 *				0.49 **	0.54 **			-0.47 **	***	**								0.54
S0	-0.66 ***	-0.44 *				-0.68 ***	**			0.36 *	-0.69 ***	*						0.36	0.54	-0.44
CM				-0.36 *		**					***	*						*	*	*
CA				*	0.44 *					0.39 *	-0.69 ***									
NM					-0.46 **						***									
NA		-0.48 **			**						-0.52 **							0.62 ***	0.50 **	
LAMax											*							***	*	
SLAA		0.51 **					0.40 *												-0.64 ***	0.51 **
Δ	0.39 *						0.45 *			-0.44 *	0.45 *	-0.38 *						-0.37 *	-0.52 **	

Lstem, measured on Day 93 only, was positively correlated with TLN, dTLN/dt, LPI_A, Biomass and TLA, while it was negatively correlated with S₀ and with DLE (Table 7).

F2 axis of the PCA was clearly defined by the opposition between Biomass and TLA on one hand, and, SLA_A and N_M on the other hand (Fig. 3). TLA and SLA_A scaled negatively at both dates, while TLA was negatively correlated with N_M and Biomass on Day 93 only (Table 7). Moreover, a positive correlation was noted between TLA and maximal leaf area (LAm_{ax}) at both dates. On Day 93 only, TLA and dTLA/dt, as well as dTLA/dt and maximal individual leaf area increase rate (V_{max}) scaled positively. Biomass was strongly and negatively correlated with SLA_A ($P < 0.001$) and with N_M ($P < 0.01$) and, to a lower extent, with leaf mass ratio (LMR) ($P = 0.039$) (Table 7). Excepted the positive correlation observed between Δ and TLA on Day 93 only, Δ did not correlate with the main variables that have contributed to built F2 (Biomass, SLA_A, N_M).

On a practical point of view, it is interesting to note that parameters extracted from SLA-LPI relationships were correlated with Biomass or Δ . Indeed, SLA_A was strongly correlated with Biomass and N_M on Day 93 and LPI_A and S₀ were strongly correlated with Δ at both dates. Results related to SLA_A, Δ , Biomass and N_M are provided for each clone in Table 8.

Discussion

Relationships between leaf growth and vigor

In the poplar clones grown from woody cuttings for this experiment, buds flushed synchronously and large inter-clonal differences were observed for total leaf area (TLA) and maximal individual leaf area (LAm_{ax}) and leaf growth parameters such as total leaf number increment rate (dTLN/dt), total leaf area increase rate (dTLA/dt), maximal leaf growth rate (V_{max}) and duration of leaf expansion (DLE). As already shown in previous studies on poplars (Ceulemans, 1990), TLA was closely correlated with total biomass (Biomass). TLA is genetically controlled (Larson & Isebrands, 1971) and can be considered as a determinant of poplar productivity. TLA was positively correlated with maximal individual leaf area (LAm_{ax}) and less closely with maximal leaf growth rate (V_{max}) and LPI of the first leaf with null area increase (LPI_{ad}). However, TLA did not correlate with total leaf number increment rate. Thus, high yielding hybrid clones do not necessarily display a higher leaf production rate, but present a higher total leaf area than clones with lower vigor (Ceulemans, 1990). We showed that maximal individual leaf area

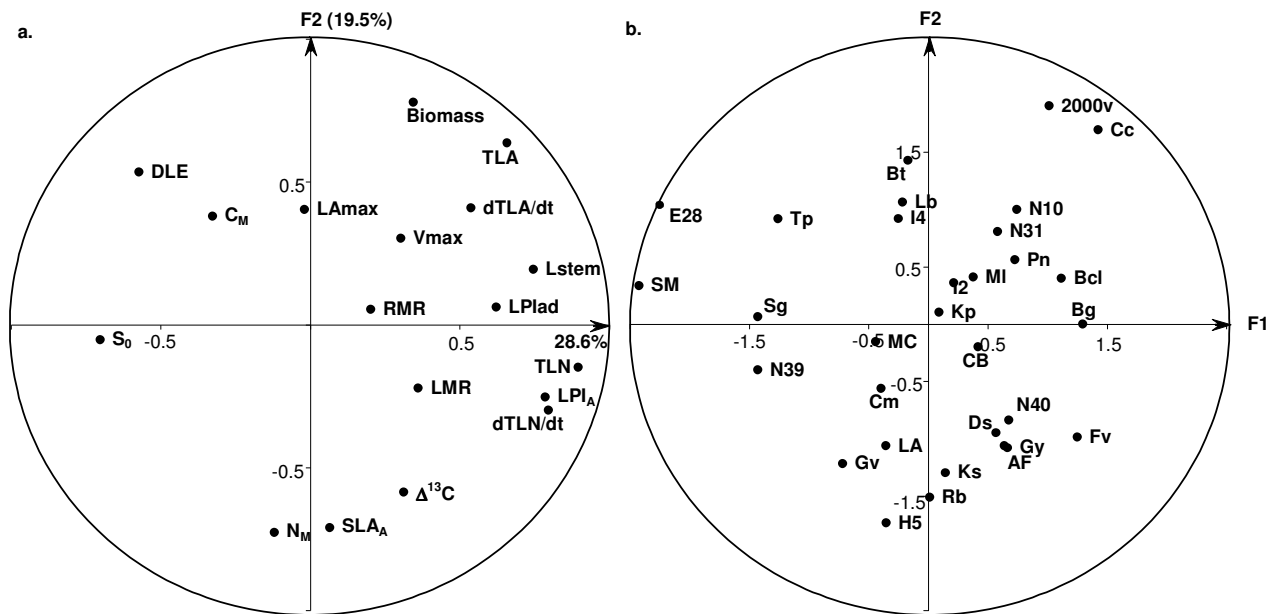


Fig. 3 Distribution of the 20 variables (a) and projection of the 31 clones (b) in the factorial plane F1 x F2 of the PCA defined at Day 93. F1 and F2 are linear combinations of the 18 variables and were built to maximize the part of the data variability that they explained. See Table 3 for variable codes and Table 1 for clonal abbreviations.

(L_{Amax}) could be used as a simple estimator of clonal variations in total leaf area (TLA), as attested by the strong correlation observed between TLA and L_{Amax}. Moreover, a high total leaf area increase rate (dTLA/dt) was partly due to a high individual leaf growth rate (V_{max}), as attested by the positive correlation noted between dTLA/dt and V_{max}.

Total leaf number increment rate (dTLN/dt) was negatively correlated to duration of leaf expansion (DLE) measured at Days 72 and 93. Thus, clones with the highest rate of leaf production were also clones that used the shortest time to expand leaves. We have shown a positive correlation between total leaf number increment rate and LPI of the first leaf with null area increase rate (LPI_{ad}). Such a concomitance between high leaf plastochron index at which leaf maturity is attained and high leaf production rate has already been shown for *Populus* (Ceulemans *et al.*, 1988; Ceulemans, 1990). Although total leaf number increment rate was negatively correlated to duration of leaf expansion (DLE), clones with high dTLN/dt also presented the greatest number of expanding leaves, as attested by the positive correlation between LPI_{ad} and dTLN/dt. We can clearly conclude that clonal variability in the number of expanding leaves taken on a stem is due to variability in total leaf number increment rate rather than in DLE.

Variations of S_0 can be due to SLA_A and LPI_A variations. However, the orthogonal position of SLA_A variable with respect to S_0 and LPI_A, as well as the strong correlation measured between LPI_A and S_0 at both dates, show that S_0 was under the control of LPI_A rather than SLA_A. Thus, low S_0 was mainly due to high LPI_A (number of expanding leaves). LPI_A was positively correlated with TLN or dTLN/dt. This result is supported, on Day 72, by the negative correlation between S_0 and dTLN/dt. Indeed, we have previously shown that S_0 ($=d\text{SLA}/d\text{LPI}$)₀ was mainly under the control of LPI variable rather than SLA one. Now, we specify that S_0 was mainly under the control of total leaf number increment (dTLN/dt). This negative relationship could be predicted because $S=d\text{SLA}/d\text{LPI}=(d\text{SLA}/dt)/(dt/d\text{LPI})$, and dt/dLPI is equal to dt/dTLN, inverse function of total leaf number increment rate. Thus, it is clear that F1 axis of the PCA allows us to distinguish clones, not only for their number of expanding leaves, but also for TLN and dTLN/dt. In brief, LPI_A and S_0 , measured at one time, can be used to discriminate clones for dTLN/dt, for which time repeated measurements are classically needed!

Table 8 Total dry biomass (Biomass), carbon isotope discrimination (Δ), maximal specific leaf area (SLA_A) and total leaf nitrogen expressed per dry weight unit (N_M) for the 31 clones.

clone	Biomass (g _{d.wt})	Δ (‰)	SLA_A (cm ² g ⁻¹ _{d.wt})	N_M (mg g ⁻¹ _{d.wt})
'2000_verde'	36.61	24.23	188	21.07
'Agathe_F'	19.72	25.67	250	28.83
'Boccalari'	24.24	25.18	238	24.10
'Branagesi'	20.16	25.17	245	23.43
'Brenta'	19.93	23.15	245	21.60
'Cappa_Bigliona'	24.38	24.39	272	27.77
'Carpaccio'	30.29	24.37	240	21.10
'Cima'	20.24	25.51	248	28.67
'Dorskamp'	16.02	25.77	252	27.07
'Eco_28'	18.81	23.71	239	23.17
'Flevo'	18.56	25.98	260	23.53
'Gaver'	15.23	23.39	293	29.83
'Ghoy'	14.26	25.38	292	26.03
H-523-9	12.28	25.69	288	29.03
'I-214'	25.69	25.11	240	25.13
'I-45-51'	21.33	24.55	215	21.75
'Kopecky'	25.01	24.41	244	24.90
'Koster'	14.35	24.32	269	30.85
'Lambro'	26.31	24.31	219	28.21
'Luisa_Avanzo'	17.89	25.94	238	29.93
'Mella'	18.89	25.25	250	19.90
'Mellone_Carlo'	24.51	25.47	255	26.24
NL-1070	27.59	24.87	220	20.41
NL-3149	25.34	24.65	221	20.86
NL-3972	16.94	24.86	223	21.68
NL-4040	20.41	25.15	238	27.29
'Pannonia'	26.64	24.93	224	22.86
'Robusta'	16.20	26.31	247	29.13
'San_Martino'	17.60	25.05	233	21.80
'Soligo'	21.31	24.28	224	27.27
'Triplo'	23.49	23.69	219	26.63

Relationships between specific leaf area and leaf plastochron index

Variations in specific leaf area (SLA) can be due to variations in leaf thickness and/or in density (Niinemets, 2001; Veneklaas *et al.*, 2002). SLA is positively related to density and/or thickness, but these two parameters are not necessarily linked (Witkowski & Lamont, 1991; Garnier & Freijesen, 1994; Niinemets, 1999; Wilson *et al.*, 1999). From the top of the cuttings downward, SLA increased, as a consequence of leaf expansion, up to a maximum at leaf expansion cessation. This result has already been observed for two *P. x canadensis* clones (Marron *et al.*, 2003). Thus, we can conclude that young mature leaves present the highest SLA and that LPI_A reflects, as LPI_{ad} , the number of expanding leaves on a stem, or the rank of the first mature leaf from the top of the stem. The decrease in density and/or thickness during leaf expansion could be explained by prolonged growth of a fixed number of cells as observed for *Populus deltoides* and by simultaneous and continuous production and enlargement of cells as observed for *P. trichocarpa* (Van Volkenburgh & Taylor, 1996). When the final leaf size was reached, SLA decreased. This may be due either to a thickening of cuticle and secondary cell walls (Pieters, 1974) or to retention of photosynthates and mineral elements during leaf ageing (Zelawski & Walker, 1976); the increase of structural dry weight was probably the main factor (Gunn *et al.*, 1999). SLA slightly re-increased in the oldest leaves, probably reflecting a re-mobilization of compounds from the leaf to the stem before leaf senescence. Maximal SLA decreased with cutting age. This could be an ontogenetic process paralleling the increase in LMA_{max} or a plastic response to increases in irradiance that was acting from the beginning to the end of the experiment (Abrams *et al.*, 1994; Niinemets, 2001).

Relationships between water-use efficiency, leaf growth, leaf structure and vigor

On Day 93 only, a low SLA_A reflected a high carbon content per leaf area unit (C_A), as indicated by negative correlation between SLA_A and C_A . At same time, clones with highest SLA presented the highest nitrogen content per dry weight unit (N_M). Area based nitrogen (N_A), was negatively linked to LPI_A and was positively linked to S_0 . Moreover LPI_A (*vs.* S_0) was positively (*vs.* negatively) correlated with TLN and $d\text{TLN}/dt$. Thus, leaves with high nitrogen per unit area characterized clones that presented a limited number of expanding leaves and a low total leaf number increment rate. On Day 93, total biomass was strongly and negatively linked to SLA_A and N_M . Thus, dense or thick leaves with low nitrogen per mass unit characterize high yielding poplar clones. It is now clear that leaf

structure estimated *via* SLA and leaf growth parameters did not correlate. However, SLA was negatively correlated with total leaf area and total biomass reflecting that high yielding *P. deltoides* \times *nigra* hybrids are characterized by low SLA, low nitrogen per mass unit and high total leaf area.

Many authors classically broke down relative growth rate (RGR) into net assimilation rate (NAR, $\text{g cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$), specific leaf area (SLA, $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}_{\text{d.wt}}$) and leaf mass ratio (LMR, $\text{g g}^{-1}_{\text{d.wt}}$). If correlations between RGR and LMR are weak, the relative importance of SLA and NAR in the equation varies (Huante *et al.*, 1995; Saverimuttu & Westoby, 1996; Huante & Rincon, 1998; McKenna & Shipley, 1999; Poorter, 1999; Ryser & Wahl, 2001; Taub, 2002). In our experiment, total biomass was negatively correlated with SLA and, in a lesser extent, with LMR. Because total biomass and leaf area ratio ($\text{LAR} = \text{SLA} \times \text{LMR}$) scaled negatively, we can hypothesize that inter-clonal variability in biomass production was under the control of LAR rather than of NAR. Moreover, it is clear that LMR played a smaller role than SLA to explain inter-clonal variability in productivity. It has been proposed that inter-specific differences in SLA are the main determinant of RGR at low irradiance, while at high irradiance inter-specific differences in NAR become the main determinant of RGR (Poorter & Van der Werf, 1998; Shipley, 2002). Similarly, it has been also shown that inter-specific variations in SLA are important in determining variations in RGR when growth temperature is superior to 20°C while NAR become more important than SLA for explaining variations in RGR when growth temperature is inferior to 20°C (Loveys *et al.*, 2002).

On Day 93, the length of the stem (Lstem) was positively correlated with Biomass. It is clear, for young woody-stem cuttings, that the building of the stem is closely related to leaf expansion. This result was corroborated by significant correlations between Lstem and TLN, TLA and dTLN/dt . Thus, although Lstem was correlated to total biomass, we cannot use it as indicator of productivity.

Water-use efficiency (WUE) is an essential parameter to understand the relationships between plant productivity and water consumption, especially when water availability is limiting for productivity. We used the approach based on the linear and negative relationships between carbon isotope discrimination (Δ), a measure of the plant depletion in ^{13}C as compared with air, and time-integrated WUE (Farquhar *et al.*, 1982; Farquhar & Richards, 1984; Brendel *et al.*, 2002). In our experiment, clonal variations in Δ were significant and remained stable between dates (Tables 5 and 6). Δ was associated to LPI_A

and in a lesser extent, to S_0 (Table 7). Since LPI_A summarizes leaf growth parameters (TLN and $d\text{TLN}/dt$), Δ was clearly more associated with leaf growth parameters than with structural ones (SLA, C, N). At leaf level, WUE and leaf growth parameters scaled negatively, and WUE did not depend on structural leaf traits such as density or thickness. No correlation was observed between total biomass and Δ , which clearly shows the independence between productivity and water-use efficiency. These results suggest that differences in Δ among clones were driven by differences in stomatal conductance, rather than by differences in CO_2 assimilation rate (Farquhar *et al.*, 1989). From a practical point of view, the independence found here between Δ and vigor, points to the possibility of selecting clones combining satisfactory vigor and high water-use efficiency, which would be a considerable advantage for poplar cultivation in moderately drought constrained areas.

Acknowledgements

Financial support was provided by the Conseil Régional, Région Centre, France, and by INRA through the Transversal Action ECOGENE. N. Marron was supported by a Ph.D. grant from the Conseil Régional, Région Centre, France. The authors thank R. Bénardeau, G. Moreau, P. Priault, S. Ribert and G. Vidal for technical assistance and C. Bréchet for help with nitrogen, carbon and Δ analyses. We also thank AFOCEL, *Cemagref* and IDF for their help with choice of the clones.

References

- Abrams MD, Kubiske ME, Mostoller SA. 1994. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. *Ecology* 75: 123-133.
- Atkin OK, Lambers H. 1998. Slow-growing alpine and fast growing lowland species: a case study of factors associated with variation in growth rate among herbaceous higher plants under natural and controlled conditions. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI, eds. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 259-288.
- Blake TJ, Sperry JS, Tschaplinski TJ. 1996. Water relations. In: Stettler RF, Bradshaw HDJ, Heilman PE, Hinckley TM, eds. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa, Canada: NRC-CNRC, 401-422.
- Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl J-M. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of delta C-13 and ring width in maritime pine. *Plant Cell and Environment* 25: 945-953.
- Briggs LJ, Shantz HL. 1913. The water requirements of plants. I. Investigations in the Great Plains in 1910 and 1911. USDA Bureau of Plant Industry, Bulletin 284.
- Brignolas F, Thierry C, Guerrier G, Boudouresque E. 2000. Compared water deficit response of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Annals of Forest Science* 57: 261-266.
- Cambridge ML, Lambers H. 1998. Influence of light and temperature on leaf growth. In: Milthorpe FL, ed. *The growth of leaves*. London, UK: Butterworths Scientific Publications, 151-169.
- Ceulemans R. 1990. Genetic variation in functional and structural productivity determinants in poplar. Amsterdam, the Netherlands: U.o.A.-D.o. Biology.
- Ceulemans R, Impens I, Lemeur R, Moermans R, Samsuddin Z. 1978. Water movement in the soil-poplar-atmosphere system. I. Comparative study of stomatal morphology and anatomy, and the influence of stomatal density and dimensions on the leaf diffusion characteristics in different poplar clones. *Oecologia Plantarum* 13: 1-12.
- Ceulemans R, Impens I, Steenackers V. 1988. Genetic variation in aspects of leaf growth of *Populus* clones, using the leaf plastochron index. *Canadian Journal Forest Research* 18: 1069-1077.
- Chen S, Wang S, Altman A, Hüttermann A. 1997. Genotypic variation in drought tolerance of poplar in relation to abscisic acid. *Tree Physiology* 17: 797-803.
- Coley PD. 1983. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monograph* 53: 209-233.
- Condon AG, Richards RA, Farquhar GD. 1987. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field grown wheat. *Crop Science* 27: 996-1001.
- Cornelissen JHC, Castro-Díez P, Carnelli AL. 1998. Variation in relative growth rate among woody species. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI, eds. *Inherent variation in plant growth; Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 363-392.
- Craig H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for massspectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 12: 133-149.
- Cutler JM, Rains DW, Loomis RS. 1977. The importance of cell size in the water relations of plants. *Physiologia Plantarum* 40: 255-260.
- De Lillis M, Valletta A. 1985. Leaf anatomy of evergreen woody plants from Canary Islands and Mediterranean Basin. A comparison. *Annali di Botanica* 43: 209-225.
- Erickson RO, Michelini FJ. 1957. The plastochron index. *American Journal of Botany* 44: 297-305.
- Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular CO₂-concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 9: 121-137.
- Farquhar GD, Richards RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 9: 539-552.

- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 40: 503-537.
- Garnier E, Freijssen AHJ. 1994. On ecological inference from laboratory experiments conducted under optimum conditions. In: J Roy, E Garnier, eds. *Whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions*. The Hague, the Netherlands: SPB Academic Publishing, 267-292.
- Garnier E, Laurent G. 1994. Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytologist* 128:725-736.
- Gebre GM, Kuhns MR. 1991. Seasonal and clonal variations in drought tolerance of *Populus deltoides*. *Canadian Journal of Forest Research* 21: 910-916.
- Gebre GM, Kuhns MR, Brandle JR. 1994. Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiology* 14: 575-587.
- Goryshina TK, Zabolina LN, Pruzhina EG. 1979. Osobennosti assimilyatsionnyh tkanei i plastidnogo apparata lista v raznyh chastyah krony u nekotoryh drevesnyh porod v lesostepnoi dubrave. (Characteristics of assimilatory tissues and plastid apparatus in leaves of various parts of crown in some tree species of the oakwood). *Vestnik Leningradskogo Gosudarstvennogo Universiteta, ser. Biologiya*. 3: 67-76.
- Guehl JM, Nguyen-Queyrens A, Loustau D, Ferhi A. 1994. Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. In: Sandermann HJ, Bonnet-Masimbert M, eds. *EUROSILVA Contribution to forest tree physiology*. Paris, France: INRA, 297-321.
- Gunn S, Farrar JF, Collis BE, Nason M. 1999. Specific leaf area in barley: individual leaves versus whole plants. *New Phytologist* 143: 45-51.
- Harvey HP, van den Driessche R. 1997. Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. *Tree Physiology* 17: 647-654.
- Huante P, Rincon E, Acosta I. 1995. Nutrient availability and growth rate of 34 species from a tropical deciduous forest in Mexico. *Functional Ecology* 9: 849-858.
- Huante P, Rincon E. 1998. Responses to light changes in tropical deciduous woody seedlings with contrasting growth rates. *Oecologia* 113: 53-66.
- Ibrahim L, Proe MF, Cameron AD. 1997. Main effects of nitrogen supply and drought stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 1412-1419.
- Johnsen KH, Flanagan LB, Huber DA, Major JE. 1999. Genetic variation in growth, carbon isotope discrimination, and foliar N concentration in *Picea mariana* : analyses from a half-diallel mating design using field-grown trees. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 1727-1735.
- Jones HG. 1985. Adaptive significance of leaf development and structural responses to environment and structural responses to environment. In: Baker NR, Davies WJ, Ong CK, eds. *Society for experimental biology seminar series, 27: control of leaf growth*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Körner C, Neumayer M, Pelaez Menendez-Riedl S, Smeets-Scheel A. 1989. Functional morphology of mountain plants. *Flora* 182: 353-383.
- Krause D, Kummerow J. 1977. Xeromorphic structure and soil moisture in the chaparral. *Acta Oecologica* 12: 133-148.
- Larson PR, Isebrands JG. 1971. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Canadian Journal of Forest Research* 1: 1-11.
- Liu, Z, Dickmann DI. 1992. Abscisic acid accumulation in leaves of two contrasting hybrid poplar clones affected by nitrogen fertilization plus cyclic flooding and soil drying. *Tree Physiology* 11: 109-122.
- Liu, Z, Dickmann DI. 1996. Effects of water and nitrogen interaction on net photosynthesis, stomatal conductance, and water-use efficiency in two hybrid poplar clones. *Physiologia Plantarum* 97: 507-512.
- Loveys BR, Scheurwater I, Pons TL, Fitter AH, Atkin OK. 2002. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow-growing plant species. *Plant Cell and Environment* 25: 975-987.

- Marron N, Delay D, Petit J-M, Dreyer E, Kahlem G, Delmotte FM, Brignolas F. 2002. Physiological traits of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiology* 22: 849-858.
- Marron N, Dreyer E, Boudouresque E, Delay D, Petit J-M, Delmotte FM, Brignolas F. 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiology* 23: in press.
- McClendon JH. 1962. The relationship between the thickness of deciduous leaves and their maximum photosynthesis rate. *American Journal of Botany* 49: 320-322.
- McKenna MF, Shipley B. 1999. Interacting determinants of interspecific relative growth: empirical patterns and a theoretical explanation. *Ecoscience* 6: 286-296.
- Nelson CJ. 1988. Genetic association between photosynthetic characteristics and yield: review of evidence. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 543-554.
- Niinemets Ü. 1999. Research review. Components of leaf dry mass per area - thickness and density - alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist* 144: 35-57.
- Niinemets Ü. 2001. Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology* 82: 453-469.
- Pallardy SG, Kozłowski TT. 1981. Water relations in *Populus* clones. *Ecology* 62:159-169.
- Pieters GA. 1974. The growth of sun and shade leaves of *Populus euramericana* 'Robusta' in relation to age, light intensity and temperature. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool de Wageningen* 74: 1-107.
- Poorter L. 1999. Growth responses of 15 rainforest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology* 13: 396-410.
- Poorter H, De Jong R. 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* 143: 163-176.
- Poorter H, Garnier E. 1999. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate. In: Pugnaire F, Valladares X, eds. *Handbook of functional plant ecology*. New York, USA: Marcel Dekker, 81-120.
- Poorter H, Van der Werf A. 1998. Is inherent variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI, eds. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 309-336.
- Pyankov VI, Ivanova LA, Lambers H. 1998. Quantitative anatomy of photosynthetic tissues of plant species of different functional types in a boreal vegetation. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI, eds. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 71-87.
- Rawson HM, Gardner PA, Long MJ. 1987. Sources of variation in specific leaf area in wheat grown at high temperature. *Australian Journal of Plant Physiology* 14: 287-298.
- Reich PB, Uhl C, Walters MB, Ellsworth DS. 1991. Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 amazonian tree species. *Oecologia* 86: 16-24.
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS. 1992. Leaf life-span in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecology Monograph* 62: 365-392.
- Reich PB. 1998. Variation among plant species in leaf turnover rates and associated traits: implications for growth at all life stages. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI, eds. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 467-487.
- Ryser P, Wahl S. 2001. Interspecific variation in RGR and the underlying traits among 24 grass species grown in full daylight. *Plant Biology* 3: 426-436.
- Saverimuttu T, Westoby M. 1996. Components of variation in seedling potential relative growth rate: phylogenetically independent contrasts. *Oecologia* 105: 281-285.
- Schulz S. 1984. Anatomisch-morphologische untersuchungen an blättern immergrüner arten der mediterranean hartlaubformation. Universität Würzburg.

- Sicher RC, Kramer DF, Harris WG. 1984. Diurnal carbohydrate metabolism of barley primary leaves. *Plant Physiology* 76: 165-169.
- Shipley B. 2002. Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Functional Ecology* 16: 682-689.
- Singh BB, Shrivastava MK, Lalchand. 1985. Relationships among leaf chlorophyll, bean yield and other characters in field grown soybean cultivars. *Photosynthetica* 19: 240-243.
- Soulères G. 1992. Les milieux de la populiculture. Paris, France: IDF.
- Taub DR. 2002. Analysis of interspecific variation in plant growth responses to nitrogen. *Canadian Journal of Botany* 80: 34-41.
- Thumma, BR, Naidu BP, Chandra A, Cameron DF, Bahnisch LM, Liu C. 2001. Identification of causal relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. *Journal of Experimental Botany* 52: 203-214.
- Tschaplinski TJ, Blake TJ. 1989. Water relations, photosynthetic capacity, and root/shoot partitioning of photosynthate as determinants of productivity in hybrid poplar. *Canadian Journal Botany* 67: 1689-1697.
- Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Gunderson CA. 1994. Water-stress tolerance of black and eastern cottonwood clones and four hybrid progeny. I. Growth, water relations and gas exchange. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 364-371.
- Tschaplinski TJ, Tuskan GA, Gebre GM, Todd DE. 1998. Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiology* 18: 653-658.
- Van Volkenburgh E, Taylor G. 1996. Leaf growth physiology. In: Stettler RF, Bradshaw HDJ, Heilman PE, Hinckley TM. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa, Canada: NRC-CNRC, 283-299.
- Veneklaas EJ, Poorter L. 1998. Growth and carbon partitioning of tropical tree seedlings in contrasting light environments. In: Lambers H, Poorter H, Van Vuuren MMI. *Inherent variation in plant growth; Physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden, the Netherlands: Backhuys Publishers, 337-361.
- Veneklaas EJ, Santos Silva MPRM, den Ouden F. 2002. Determinants of growth rate in *Ficus benjamina* L. compared to related faster-growing woody and herbaceous species. *Scientia Horticulturae* 93: 75-84.
- Wilson PJ, Thompson K, Hodgson JG. 1999. Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist* 143: 155-162.
- Witkowski ETF, Lamont BB. 1991. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* 88: 486-493.
- Wright GC, Rao RCN, Farquhar GD. 1994. Water-use efficiency and carbon isotope in peanuts under water deficit conditions. *Crop Science* 34: 92-97.
- Zelawski W, Walker RB. 1976. Photosynthesis, respiration, and dry matter production. In: Miksche JP, ed. *Modern methods of forest genetics*. New York, USA: Springer-Verlag, 89-119.
- Zsuffa L, Giordano E, Pryor LD, Stettler RF. 1996. Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. In: Stettler RF, Bradshaw HDJ, Heilman PE, Hinckley TM, eds. *Biology of Populus and its implications for management and conservation*. Ottawa, Canada: NRC-CNRC, 515-539.

3. Conclusions et perspectives

Contrairement à ce qu'il avait déjà été observé pour de nombreux végétaux ligneux (Reich *et al.* 1992, Cornelissen *et al.* 1998, Veneklaas et Poorter 1998, Poorter et Garnier 1999, Veneklaas *et al.* 2002), la productivité est négativement corrélée à la SLA pour les hybrides euraméricains : la productivité des cultivars est proportionnelle à la densité et/ou à l'épaisseur de leurs feuilles. L'importance de la SLA dans l'équation $RGR = NAR \times LMR \times SLA$ ayant été montrée dépendante de l'intensité lumineuse, il sera important d'établir à nouveau les relations pour des conditions environnementales différentes. Comme cela a déjà été observé pour le peuplier (Ceulemans 1990), la productivité est liée à la surface foliaire totale de la plante (TLA). Cette surface foliaire totale n'est pas corrélée aux vitesses d'étalement ($dTLA/dt$) et d'apparition des feuilles ($dTLN/dt$), et résulte donc sans doute d'une combinaison entre les deux. La discrimination isotopique du carbone ne présente aucun lien avec la productivité mais s'associe au nombre total de feuilles (TLN) et à leur vitesse d'apparition ($dTLN/dt$), les clones utilisant le plus efficacement l'eau correspondant à ceux ayant une croissance foliaire modérée.

Au sein de l'espèce *P. x canadensis*, les paramètres déduits des relations $SLA=f(LPI)$ apparaissent comme des outils simples d'utilisation, indicateurs de la productivité, de la croissance foliaire et de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) des clones de peupliers euraméricains. L'objectif du Chapitre 3 sera de déterminer les relations entre la productivité, l'efficacité d'utilisation de l'eau, la croissance et la structure des feuilles et la tolérance à la sécheresse pour les peupliers euraméricains.

Chapitre 3

Recherche de déterminants foliaires de tolérance à la sécheresse

1. Introduction

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est connue pour jouer un rôle important dans l'acclimatation, dans la productivité et dans la probabilité de survie en conditions de sécheresse (Jones 1993, Lauteri *et al.* 1997). En contribuant à la productivité quand l'alimentation en eau est limitée, la WUE est considérée comme l'une des composantes principales de la tolérance des plantes à la sécheresse (Cowan 1986, Wright *et al.* 1994). Les plantes peuvent atteindre de fortes WUE par une importante photosynthèse nette et/ou par une faible transpiration. Ces deux processus sont, au moins en partie, régulés par la conductance stomatique (Cowan 1982). Quand l'eau est limitante, la conductance diminue en raison de la fermeture des stomates. Cette fermeture a un impact plus marqué sur la transpiration que sur la photosynthèse en raison des résistances additionnelles associées à la diffusion du CO₂ relativement à celle de H₂O dans la feuille (Cowan 1982, Nobel 1991). Ainsi, une augmentation de la WUE causée par la fermeture des stomates entraîne une réduction de l'assimilation de carbone. Cependant, quand l'alimentation en eau est réduite, les plantes utilisant plus efficacement une quantité d'eau donnée devrait croître plus rapidement (Wright *et al.* 1993). Ainsi, en conditions de sécheresse, les plantes à fortes WUE devraient avoir une productivité plus importante ou une aptitude plus grande à survivre que des plantes à faibles WUE (Jones 1993). Cette relation positive entre la WUE et le niveau de tolérance à la sécheresse a été observée pour de nombreuses espèces telles que l'eucalyptus (Blake et Suiter Filho 1988), l'épicéa (Sun *et al.* 1996), le pin ponderosa (Zhang *et al.* 1997), le pin maritime (Nguyen-Queyrens *et al.* 1998) ou le caféier (DaMatta *et al.* 2003). L'objectif de ce chapitre est de juger si des clones qui se distinguent par leur productivité ou par leur efficacité à utiliser l'eau, présentent des niveaux de tolérance tranchés en réponse à une sécheresse d'intensité contrôlée. Autrement dit, existe-il des

relations entre productivité, efficacité de l'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse au sein des hybrides *P. deltoides* x *P. nigra* ?

Pour apporter des éléments de réponse à cette question, nous avons adopté la démarche suivante. D'abord, six clones ont été sélectionnés parmi les trente et un étudiés précédemment (Chapitre 2), en tenant compte de leurs différences de productivité et de discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13 (Chapitre 2, Tableau 2.5). Les clones '2000_verde' et 'Ghoy' ont été choisis en raison de leurs niveaux de productivité très tranchés, le premier étant le plus productif et le second faisant partie des moins productifs (biomasses sèches moyennes de boutures en fin d'expérience respectivement égales à 36,6 et 14,3 g). Les clones 'Soligo', 'Flevo', 'I45-51' et 'I214' ont été sélectionnés pour leur aptitude différente à discriminer le carbone. Le clone 'Soligo' présentait une discrimination isotopique du carbone parmi les plus faibles (24,2 ‰), alors que le clone 'Flevo' faisait au contraire partie des clones affichant les plus fortes valeurs (26,0 ‰). Les clones 'I45-51' et 'I214' présentaient des discriminations isotopiques du carbone intermédiaires (respectivement 24,5 et 25,1 ‰). Une sécheresse réversible, d'intensité contrôlée et équivalente entre clones, a ensuite été induite par arrêt d'arrosage sur un lot de jeunes boutures ligneuses, cultivées en serre, de chacun des six clones. Un autre lot de boutures était maintenu en conditions hydriques non limitantes et constituait le lot témoin. Des mesures de biomasse ont été effectuées à plusieurs reprises au cours de l'expérience à partir de boutures témoin et stressées. Ces prélèvements ont été réalisés le jour de l'arrêt d'arrosage, au moment de la fermeture des stomates, puis trois jours après et enfin après ré-arrosage de certains des plants non irrigués. Ces différentes mesures nous ont permis d'estimer la vitesse de croissance relative de chaque clone en conditions témoin (RGR_T) et en conditions de sécheresse (RGR_S) et la différence $RGR_T - RGR_S$ nous a donné accès à un classement relatif des clones selon leur niveau de tolérance à la sécheresse. Par ailleurs, les paramètres de structure et de croissance des feuilles, décrits dans le chapitre précédent, ont également été suivis sur chaque lot de boutures. Le suivi de ces paramètres sur le lot témoin nous a permis d'établir au terme de l'expérience les corrélations entre vigueur (biomasse, coefficients d'allocation et vitesse de croissance relative) et paramètres foliaires de structure (surface massique) et de croissance (vitesse d'apparition des feuilles, vitesse d'étalement du feuillage etc.). Le suivi de ces paramètres sur les lots de boutures stressées nous a permis de juger de la modulation par la contrainte hydrique des liens observés en

conditions hydriques non limitantes entre productivité et paramètres foliaires de structure et de croissance. Dans cette expérience, la discrimination isotopique vis à vis du carbone n'a pas été estimée. Nous précisons également que les boutures de cette dernière expérience n'ont pas bénéficié des mêmes conditions d'éclairement que celles utilisées dans l'expérience du chapitre précédent. En effet, elle a été réalisée en serre à l'Université d'Orléans sous un éclairage au moins trois fois plus faible (densité de flux de photons transmis dans le PAR, $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) que celui dont les plantes disposaient à l'INRA d'Ardon ($700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Le clone 'I214' a été sélectionné en Italie en 1929 (Institut de Populiculture de Casale Monferrato). Malgré des exigences stationnelles élevées (richesse chimique / alimentation en eau), sa productivité lorsque l'eau n'est pas limitante est importante (Paillassa 1998). Depuis son arrivée en France en 1958, sa popularité n'a jamais décliné et les forestiers prédisent une augmentation de ses plantations pour l'avenir (Breton 2000, Thivolle-Cazat 2002). Il représente actuellement, avec 'I45-51', près de 30 % des variétés de peuplier commercialisées (Breton 2000). Sélectionné en 1948 en Italie (Institut de Populiculture de Casale Monferrato) et introduit en France en 1974, le clone 'I45-51' présente cependant des caractéristiques différentes de celles du clone 'I214'. Ce clone, moins productif mais également moins exigeant quant à la qualité du sol, peut supporter des ruptures d'alimentation en eau et tolérer la sécheresse (Paillassa 1999). De la même façon, les clones 'Flevo' et 'Ghoy' semblent relativement tolérants à la sécheresse. Le clone 'Flevo', sélectionné aux Pays-Bas (Wageningen) en 1952 et introduit en France, comme les clones 'Dorskamp' et 'I45-51', en 1974, a des besoins en eau peu importants et montre une bonne productivité (Paillassa 1999). Le clone 'Ghoy', sélectionné en 1960 en Belgique (Grammont) et introduit en France en 1982, est connu pour supporter l'absence de nappe phréatique comme les nappes proches, mais il s'agit d'un clone exigeant quant à la qualité du sol (Paillassa 1998). Les clones 'Soligo' et '2000_verde' sont des sélections italiennes récentes présentées comme une alternative au clone 'I214' (Figures 3.1 et 3.2).

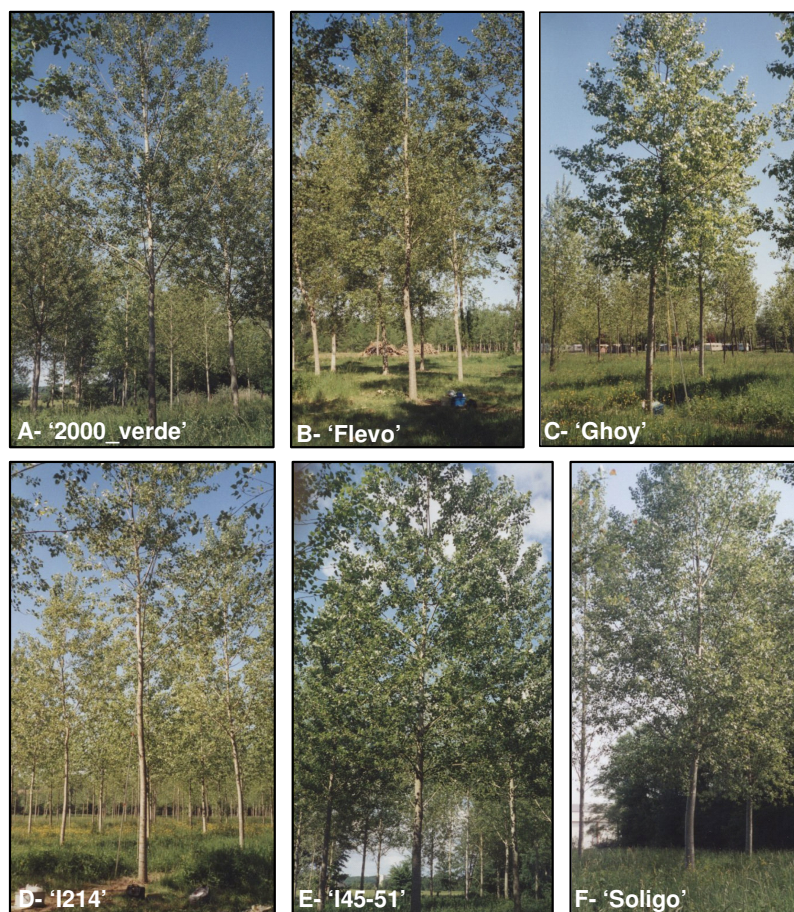


Figure 3.1. Arbres âgés de 9 ans : clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' à Château-Renard (Loiret) (A, E et F) ou à Triguères (Loiret) (B, C et D) (Cemagref).

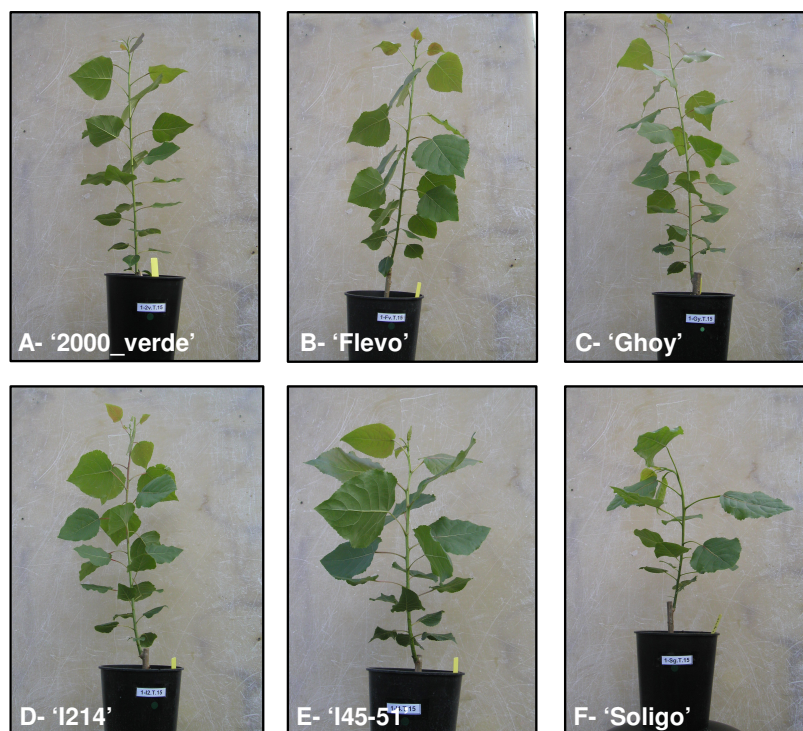


Figure 3.2. Boutures âgées de 3 mois des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal et initiation de la contrainte hydrique

Les expériences ont été réalisées à partir de boutures ligneuses de 25 cm des six clones de *Populus x canadensis* (Moench) : 'I214', 'I45-51', '2000_verde', 'Flevo', 'Soligo' et 'Ghoy'. En mars 2002, 21 boutures de chaque clone ont été repotées en pots de 4 L contenant un mélange de tourbe blonde, de tourbe brune, de fumier de cheval, de terre de bruyère et de compost désinfecté (25:25:20:20:10, v/v, pH 5,8). Les boutures étaient disposées dans une serre chauffée (18-20°C) et éclairée (16 heures de photopériode, densité de flux de photons transmis dans le PAR, 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de l'Université d'Orléans et alimentées de façon optimale en eau au goutte à goutte (Figure 3.3). À partir d'avril 2002, les feuilles de chaque bouture ont été numérotées de l'apex vers la base des tiges. La jeune feuille excédant juste 20 mm de long était indexée 0 (Index Foliaire = 0) (Larson et Isebrands 1971). Le 23 avril 2002, la sécheresse a été induite par arrêt d'arrosage pour 9 boutures de chaque clone. Les 12 boutures restantes de chaque clone ont été maintenues en conditions hydriques non limitantes et utilisées comme témoins. Après 6 à 9 jours d'arrêt d'arrosage, certains plants stressés ont été ré-arrosés afin de juger de la réversibilité du stress appliqué (Figure 3.4).

2.2. Estimation des paramètres

Tous les 2 jours du 14 avril au 10 mai, le nombre total de feuilles (**TLN**) et la largeur de chaque feuille de 3 boutures témoin et de 3 boutures stressées par clone ont été mesurés. La surface des feuilles a été calculée à l'aide des équations établies au Chapitre 2, liant largeur à surface, et la surface totale du feuillage des boutures (**TLA**, cm^2) en était déduite. La vitesse d'apparition des feuilles (**dTLN/dt**, jour^{-1}) et la vitesse d'étalement du feuillage des boutures témoin (**dTLA/dt**, $\text{cm}^2 \text{jour}^{-1}$) correspondent respectivement aux coefficients directeurs des droites obtenues à partir des relations $\text{TLN} = f(\text{temps})$ et $\text{TLA} = f(\text{temps})$. En conditions hydriques limitantes, les vitesses d'apparition et d'étalement ont été calculées de proche en proche du fait de l'augmentation de l'intensité de la contrainte au cours de l'expérience. La surface de la plus grande feuille des boutures (**LAm_{max}**, cm^2) a été déduite de la relation entre la surface individuelle des feuilles et l'index foliaire (FI). La valeur maximale de vitesse d'étalement (**V_{max}**, $\text{cm}^2 \text{jour}^{-1}$) et l'index foliaire de la première feuille ayant arrêté de croître le long de la tige (**FI_{ad}**) ont été déterminés à partir de la



Figure 3.3. Disposition et évolution des boutures des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', '1214', '145-51' et 'Soligo' à la serre du LBLGC (Université d'Orléans) durant l'expérience d'arrêt d'arrosage / ré-arrosage : le 13 mars 2002, jour du repotage en pots de 4 L (au premier plan, le clone 'Ghoy') (A) ; le 15 avril 2002 (au premier plan, le clone 'Flevo') (B) ; le 2 mai 2002 (à gauche, le clone '145-51' et à droite, le clone '2000_verde') (C).

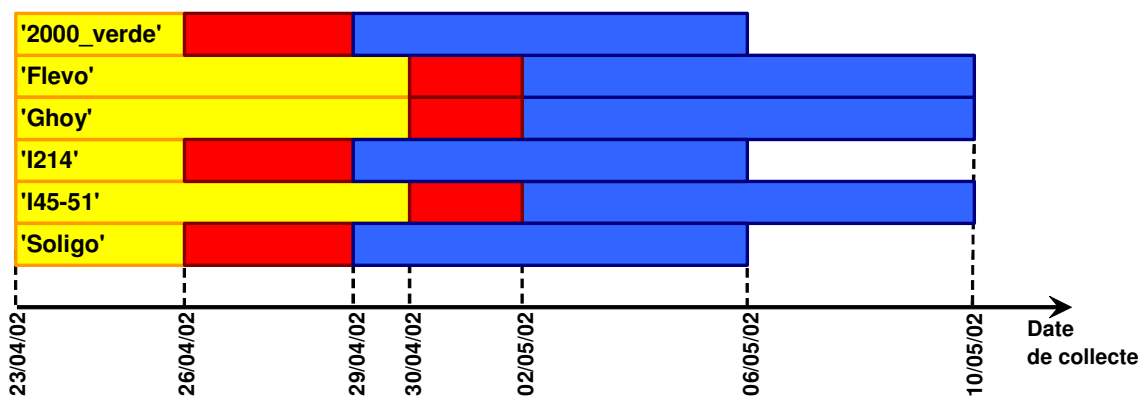


Figure 3.4. Chronologie des collectes. Les périodes de chute de conductance sont indiquées en jaune. Les périodes d'arrêt d'arrosage complet correspondent aux barres jaunes et rouges. Les périodes de ré-arrosage sont symbolisées par les barres bleues.

relation entre la vitesse individuelle d'étalement foliaire et FI. La durée d'expansion d'une feuille (**DLE**, jour) a été calculée d'après $DLE = FI_{ad} \times dt/dTLN$.

Deux fois par semaine, la conductance stomatique (g_s , $\text{mmol}_{\text{eau}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de 3 boutures témoin et de 3 boutures stressées de chaque clone a été suivie pour la face supérieure et la face inférieure d'une feuille pleinement étalée en utilisant un poromètre (PMR-2®, PPsystème®, Hertfordshire). Le jour de l'arrêt d'arrosage, 3 boutures témoin de chaque clone ont été utilisées afin de mesurer les paramètres suivants :

- 1- Le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp} , MPa) d'une feuille mature de la base de la bouture a été mesuré à l'aide d'une chambre à pression de Scholander.
- 2- La teneur volumique en eau du sol (**SWC**, g cm^{-3}) a été déterminée à partir d'un volume calibré de substrat homogénéisé (150 cm^3) pesé avant et après avoir été placé 24 heures à l'étuve à 100°C pour obtenir sa masse sèche.
- 3- La teneur en eau relative des feuilles (**RWC**, %) et leur surface massique (SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) ont été déterminées pour une feuille sur deux. Les feuilles ont été pesées immédiatement après leur collecte pour déterminer leur masse fraîche (MF). Le pétiole de chaque feuille a ensuite été placé dans de l'eau distillée, à l'obscurité et à 4°C pendant 24 heures avant que la masse à pleine turgescence ne soit déterminée (MT). Enfin, la masse sèche (MS) a été mesurée après que les feuilles aient été séchées 24 heures à 75°C . Des polynômes d'ordre 3 ont été ajustés sur les relations $SLA = f(FI)$ et les paramètres suivants en ont été déduits : SLA_A , SLA maximale le long de la tige, FI_A , index foliaire correspondant à SLA_A et enfin S_0 , coefficient directeur du trinôme à l'origine.
- 4- Les teneurs en oses solubles et en composés phénoliques ont été déterminées à partir d'une feuille en croissance et d'une jeune feuille adulte de chaque bouture. Dès sa collecte, chaque feuille a été plongée dans de l'azote liquide avant d'être lyophilisée et broyée. Les protocoles d'extraction et de dosage des oses solubles et des composés phénoliques sont détaillés Chapitre 1, respectivement paragraphe 4.1 (page 61) et paragraphe 5.2.1 (page 83). Les résultats sont présentés au plus fort de la sécheresse (3^{ème} collecte, trois jours après la chute de conductance) pour les témoins et les stressés et pour deux étages de feuilles, en croissance ($FI = 2,6 \pm 0,1$) et jeunes adultes ($FI = 10,4 \pm 0,2$). Concernant la composition phénolique estimée par HPLC, 24 pics ont été retenus et analysés en fonction du traitement (témoins/stressés), de l'âge des feuilles (en croissance/jeunes adultes) et du clone.

Tableau 3.I. Abréviations et descriptions des variables mesurées. Traitement(s) pour lequel ou lesquels les variables ont été déterminées (témoins / stressés). Les variables sont regroupées en 6 catégories : vigueur, croissance foliaire, structure foliaire, statut hydrique, oses et composés phénoliques.

	Variable	Signification	Unité	Illustration	Témoins	Stressés	
Vigueur	TLN	Nombre total de feuilles		Figure 3.8, A Annexe 3.1	X	X	
	TLA	Surface foliaire totale	cm ²	Figure 3.8, B Annexe 3.2	X	X	
	LAR	Surface foliaire rapportée à la biomasse	cm ² g ⁻¹ _{MS}		X	X	
	LMR	Allocation de biomasse au feuillage	g g ⁻¹ _{MS}	Annexe 3.VI	X	X	
	RMR	Allocation de biomasse aux racines	g g ⁻¹ _{MS}	Annexe 3.VI	X	X	
	Biomass	Biomasse sèche totale de la bouture	g _{MS}	Annexe 3.VI	X	X	
	RGR	Vitesse de croissance relative	mg g ⁻¹ _{MS} jour ⁻¹		X	X	
	RGR _P	Ralentissement de RGR des stressés	mg g ⁻¹ _{MS} jour ⁻¹			X	
Croissance foliaire	dTLN/dt	Vitesse d'apparition des feuilles	jour ⁻¹	Figure 3.8, A Annexe 3.1 Tableau 3.V	X	X	
	dTLA/dt	Vitesse d'étalement des feuilles	cm ² jour ⁻¹	Figure 3.8, B Annexe 3.2 Tableau 3.V	X	X	
	Vmax	Vitesse individuelle d'étalement maximale	cm ² jour ⁻¹	Figure 3.9, C Annexe 3.4	X	X	
	Flad	FI de la première feuille adulte		Figure 3.9, C Annexe 3.4	X	X	
	DLE	Durée d'étalement foliaire	jour		X		
	FI _A	FI correspondant à SLA maximale le long de la tige		Figure 3.9, A et B Annexe 3.3	X		
	S ₀	Pente du polynôme SLA=f(FI) à l'origine	cm ² g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.9, A et B Annexe 3.3	X		
Structure foliaire	LAm _{ax}	Surface de la plus grande feuille sur la tige	cm ²	Figure 3.9, D Annexe 3.5	X	X	
	SLA _A	SLA maximale le long de la tige	cm ² g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.9, A et B Annexe 3.3	X	X	
Statut hydrique	Plante	g _s	Conductance stomatique totale	mmol _{eau} m ⁻² s ⁻¹	Figure 3.6	X	
		RWC	Teneur en eau relative des feuilles	%	Figure 3.7	X	X
	Sol	Ψ _{wp}	Potentiel hydrique foliaire de base	MPa	Figure 3.5	X	X
		SWC	Teneur volumique en eau du sol	g cm ⁻³	Figure 3.5	X	X
Oses	OsesJA	Teneur en oses solubles des jeunes feuilles adultes	mg Eq Man g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.10	X	X	
	OsesC	Teneur en oses solubles des feuilles en croissance	mg Eq Man g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.10	X	X	
Composés phénoliques	Croissance	Pic4C	Teneur du composé correspondant au pic 4	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X
		Pic16C	Teneur du composé correspondant au pic 16	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X
		Pic27C	Teneur du composé correspondant au pic 27	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X
	Jeunes adultes	Pic4JA	Teneur du composé correspondant au pic 4	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X
		Pic16JA	Teneur du composé correspondant au pic 16	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X
		Pic27JA	Teneur du composé correspondant au pic 27	mg Eq coum g ⁻¹ _{MS}	Figure 3.11	X	X

5- Les masses sèches des racines, de la tige verte, de la tige ligneuse et des feuilles restantes ont été déterminées.

Au cours du cycle sécheresse / ré-arrosage, ces paramètres ont été mesurés à trois autres occasions à partir de 3 boutures témoin et de 3 boutures stressées de chaque clone, d'abord lors de la fermeture des stomates, puis trois jours plus tard et enfin lors de la réouverture des stomates après le ré-arrosage de certains des plants non irrigués (Figure 3.4).

La productivité des clones a été évaluée par la vitesse de croissance relative (**RGR**) des plants témoin et stressés ($\text{mg g}^{-1}\text{MS jour}^{-1}$). La chute de la **RGR** au cours de la contrainte hydrique a été exprimée par la différence entre les **RGR** mesurées en conditions témoin (RGR_T) et de stress hydrique (RGR_S) : $\text{RGR}_P = \text{RGR}_T - \text{RGR}_S$. La surface foliaire rapportée à la biomasse (**LAR**, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) et les coefficients d'allocation de biomasse au feuillage (**LMR**) et aux racines (**RMR**) ont également été déterminés en fin d'expérience pour les témoins et les stressés. Les variables indicatrices de la vigueur, de la croissance foliaire, de la structure foliaire, du statut hydrique et des teneurs en oses solubles ainsi que de certains composés phénoliques des plantes sont présentées dans le Tableau 3.I.

2.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Software). Les moyennes sont exprimées avec leurs erreurs standard et comparées à l'aide d'analyses de variance (ANOVA). Pour les comparaisons multiples, les regroupements ont été effectués à l'aide du test de Student, Newman et Keuls (SNK) dans le cas où le nombre de répétitions était constant, à l'aide du test de Scheffé dans le cas contraire. Les comparaisons de moyennes dans le temps ont été effectuées en utilisant la procédure General Linear Model (GLM) pour mesures répétée (Split Plot in Time). Quand les paramètres sont exprimés en fonction de l'index foliaire, celui-ci a été inclus dans le modèle statistique comme covariable. Les relations entre les paramètres ont été testées en utilisant des corrélations linéaires (coefficient de Pearson) et les relations entre l'index foliaire et les paramètres, en utilisant des corrélations de rang (coefficient de Spearman). Les résultats sont représentés comme significatifs lorsque les valeurs de la probabilité P sont inférieures ou égales à 5 % (*), à 1 % (***) et à 1 % (**).

La variabilité clonale des paramètres descriptifs de la vigueur des boutures ainsi que de la croissance et de la structure des feuilles a été décrite à l'aide d'analyses multivariées

en utilisant une analyse en composantes principales (ACP). Les variables ont été standardisées et des facteurs orthogonaux (axes F1 et F2) successivement construits comme la combinaison linéaire de ces variables maximisant la part de variabilité expliquée par ces facteurs. Les variables ont d'abord été représentées dans le plan défini par les deux principaux facteurs de l'ACP (F1 x F2), leurs coordonnées étant leurs coefficients de corrélation linéaire avec ces facteurs (coefficients de Pearson). Les coordonnées de chacune des trois boutures de chaque clone dans le plan F1 x F2 ont été calculées, et les cultivars ont été projetés pour permettre les comparaisons clonales.

3. Résultats

3.1. Statut hydrique et variabilité clonale

En conditions hydriques non limitantes, la teneur en eau du sol (SWC) et le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) étaient respectivement toujours supérieurs à 0,15 g cm⁻³ et à -0,6 MPa (Figure 3.5). Les feuilles de tous les clones étaient amphistomatiques et affichaient des conductances stomatiques 2 fois plus importantes pour la face inférieure des feuilles que pour la face supérieure ; seules les feuilles du clone 'Soligo' présentaient des conductances similaires pour les deux faces (Figure 3.6). Le clone 'Soligo' présentait une conductance stomatique totale (g_s) significativement plus faible (204 mmol_{eau} m⁻² s⁻¹) que celles des clones 'I214', 'Flevo' et 'Ghoy' (respectivement 421, 402 et 382 mmol_{eau} m⁻² s⁻¹). Les teneurs relatives en eau (RWC) des feuilles adultes étaient semblables entre clones et supérieures à 95 % (Figure 3.7). Les RWC plus faibles mesurées pour les feuilles d'index foliaires inférieurs à 8 étaient sans doute dues à l'absorption continue d'eau en relation avec la croissance au cours de la phase de re-saturation (Čatský 1959). L'arrêt d'arrosage eut pour conséquences des diminutions de SWC, de Ψ_{wp} , de g_s et de RWC à des niveaux similaires entre clones pour atteindre respectivement des valeurs de l'ordre de 0,10 g cm⁻³, -1,4 MPa, 27 mmol_{eau} m⁻² s⁻¹ et 90 % (Figures 3.5, 3.6 et 3.7). Après ré-arrosage, les paramètres hydriques de la plante (RWC et g_s) ont retrouvé des valeurs semblables à celles mesurées pour les plants bien irrigués et cela pour tous les clones. Ainsi, dans cette expérience tous les cultivars ont subi une sécheresse réversible de même intensité.

Au cours de l'arrêt d'arrosage, deux groupes de trois clones se sont distingués par le potentiel hydrique foliaire de base atteint lors de la fermeture des stomates. En effet, la conductance stomatique des clones '2000_verde', 'I214' et 'Soligo' chutait pour des valeurs de Ψ_{wp} de l'ordre de -0.6 MPa, alors que celle des clones 'Ghoy', 'Flevo' et 'I45-51' chutait pour des valeurs de Ψ_{wp} inférieures à -1,1 MPa (Figure 3.5 - collecte 2).

3.2. Présentation des variables et différences entre clones en conditions hydriques non limitantes

Pour chaque cultivar, une relation linéaire, positive et significative a été obtenue entre la date et la surface foliaire totale (TLA) et entre la date et le nombre total de feuilles (TLN) (Figure 3.8 et Annexes 3.1 et 3.2). Les vitesses d'apparition des feuilles (dTLN/dt)

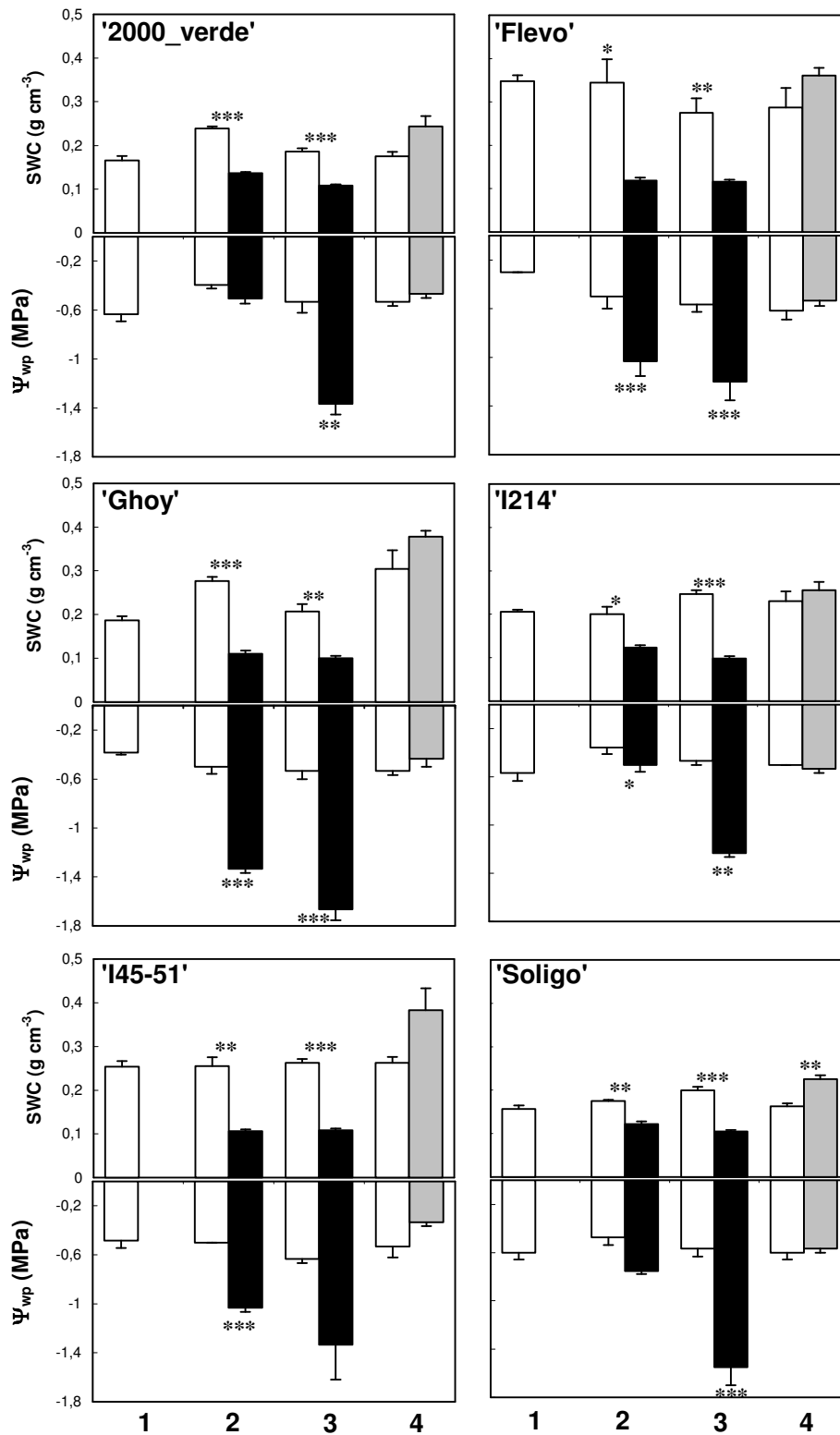


Figure 3.5. Évolution de la teneur en eau du sol (SWC) et du potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) des boutures témoin (blanc), stressées (noir) et ré-arrosées (gris) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' lors de l'initiation du stress (1), lors de la chute de conductance (2), 3 jours plus tard, au plus fort du stress (3) et après ré-ouverture des stomates suite au ré-arrosage (4). Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les différences significatives entre traitements sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$.

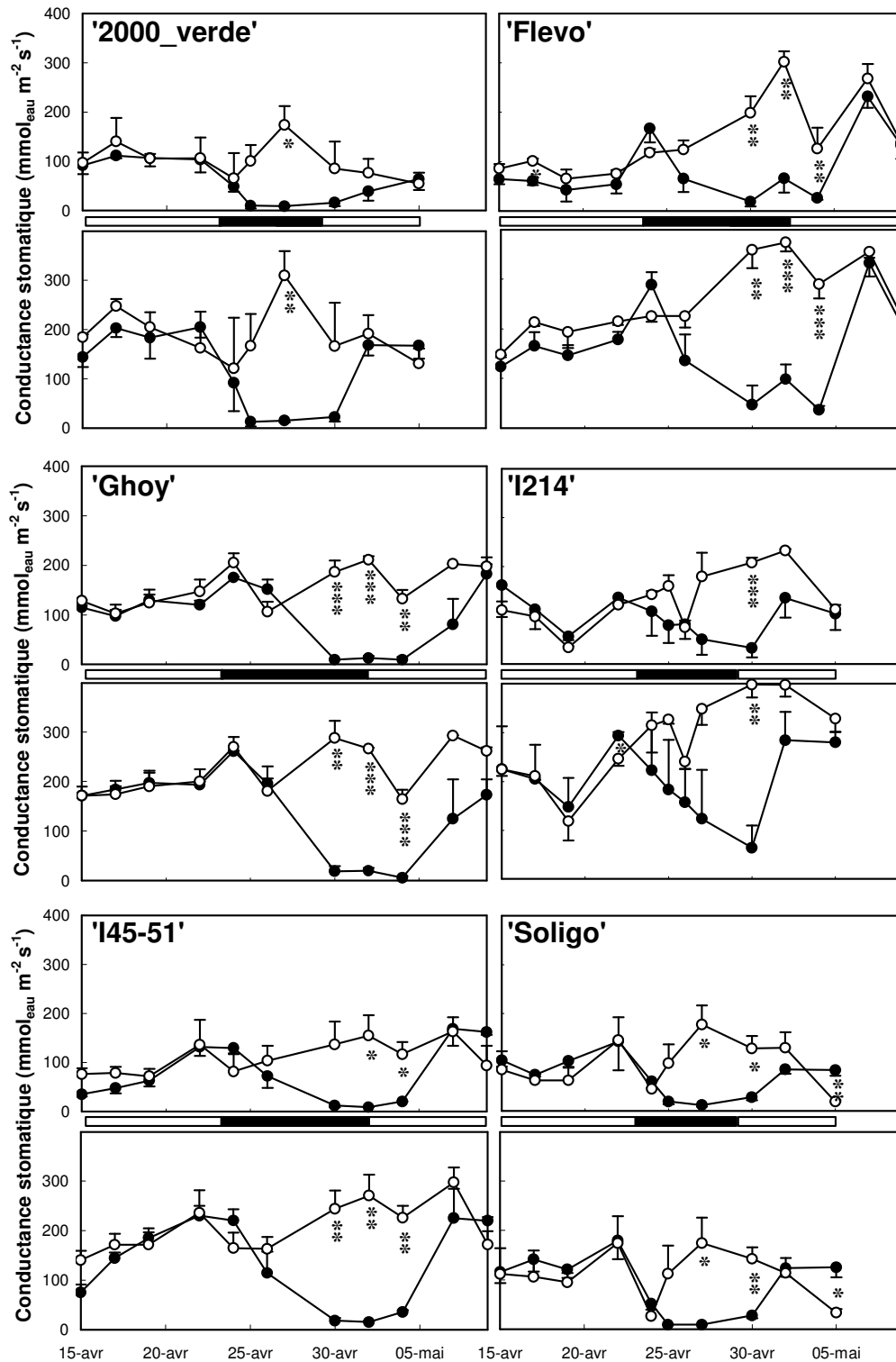


Figure 3.6. Évolution au cours du temps d'expérience de la conductance stomatique des faces supérieures (graphique supérieur) et inférieures (graphique inférieur) des feuilles de boutures témoin (blanc) et stressées (noir) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) des mesures effectuées sur trois boutures. Les périodes d'alimentation optimale en eau et d'arrêt d'arrosage sont respectivement représentées par les barres blanches et noires. Les différences significatives entre traitements sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$.

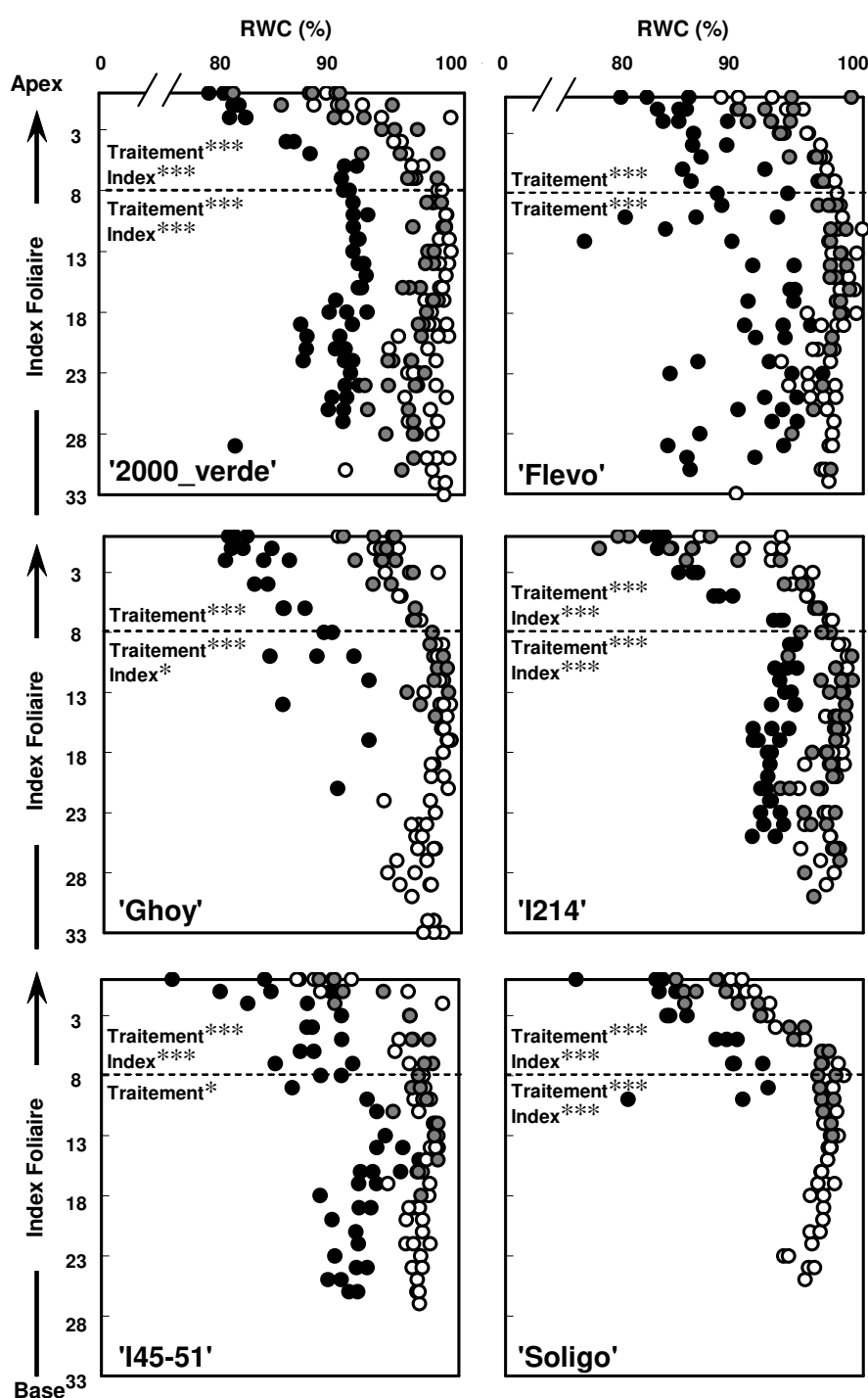


Figure 3.7. Teneurs relatives en eau (RWC) des feuilles de boutures témoin (blanc), stressées (noir), au plus fort du stress (3 jours après le chute de conductance), et ré-arrosées (gris), lors de la réouverture des stomates consécutive au ré-arrosage, des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' en fonction de leurs index foliaires. Pour chaque clone et chaque traitement, 3 boutures ont été utilisées. Pour chaque clone, la significativité des effets « index » et « traitement » est indiquée par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les tests ont été effectués en dissociant les index inférieurs à 8 des index supérieurs à 8.

et d'étalement du feuillage ($dTLA/dt$) étaient donc constantes au cours de l'expérience. Ces vitesses ont été déduites des dérivées des relations $TLA=f(\text{temps})$ et $TLN=f(\text{temps})$ (Tableau 3.II). Les relations liant l'index foliaire à la surface massique (SLA), à la surface foliaire et à la vitesse d'étalement individuelle des feuilles ont été utilisées pour mesurer les paramètres suivants : la surface massique maximale (SLA_A), l'index foliaire correspondant à cette surface massique maximale (FI_A) et le coefficient directeur à l'origine (S_0) de la relation $SLA=f(FI)$ (Figure 3.9, A et B, et Annexe 3.3) ; la vitesse maximale d'étalement foliaire (V_{max}) et l'index de la première feuille ayant arrêté de croître (FI_{ad}) (Figure 3.9, C, et Annexe 3.4) ; la surface de la plus grande feuille (L_{Amax}) (Figure 3.9, D, et Annexe 3.5).

Des différences significatives entre clones étaient observées pour la plupart des paramètres de vigueur, de croissance et de structure des feuilles (Tableau 3.III). Notamment, la vitesse de croissance relative (RGR), la surface massique foliaire maximale (SLA_A), la vitesse d'apparition des feuilles ($dTLN/dt$), les vitesses d'expansion foliaire totale et individuelle ($dTLA/dt$ et V_{max}), la surface foliaire rapportée à la biomasse totale (LAR) et la conductance stomatique (g_s) variaient de plus d'un facteur 2 entre clones. En revanche, les teneurs en oses solubles des feuilles en croissance (OsesC) et des jeunes feuilles adultes (OsesJA) n'étaient pas significativement différentes entre clones lorsque l'eau n'était pas limitante (Tableau 3.III et Figure 3.10). Les teneurs en oses des feuilles en croissance étaient cependant systématiquement supérieures ou égales à celles des jeunes feuilles adultes pour tous les clones et quel que soit le traitement (Figure 3.10).

Concernant la composition phénolique des feuilles par HPLC, 24 pics des chromatogrammes ont été retenus et analysés en fonction du traitement (témoins/stressés), de l'âge de feuilles (en croissance/jeunes adultes) et du clone (Figure 3.11 et Annexe 3.6). Les feuilles en croissance présentaient des teneurs en composés phénoliques supérieures à celles des jeunes feuilles adultes. La sécheresse avait en revanche peu d'incidence sur les teneurs en composés phénoliques. Seuls les pics numérotés 4, 16 et 27 ont été intégrés dans la description des relations entre variables. Ces composés ont été choisis parce que leurs teneurs étaient significativement différentes entre les clones et entre les deux étages de feuilles (Tableau 3.III et Figure 3.11, B et D) et parce qu'ils présentaient des polarités variées puisque leur élution avait respectivement lieu en début, en milieu et en fin d'analyse (Figure 3.11, A).

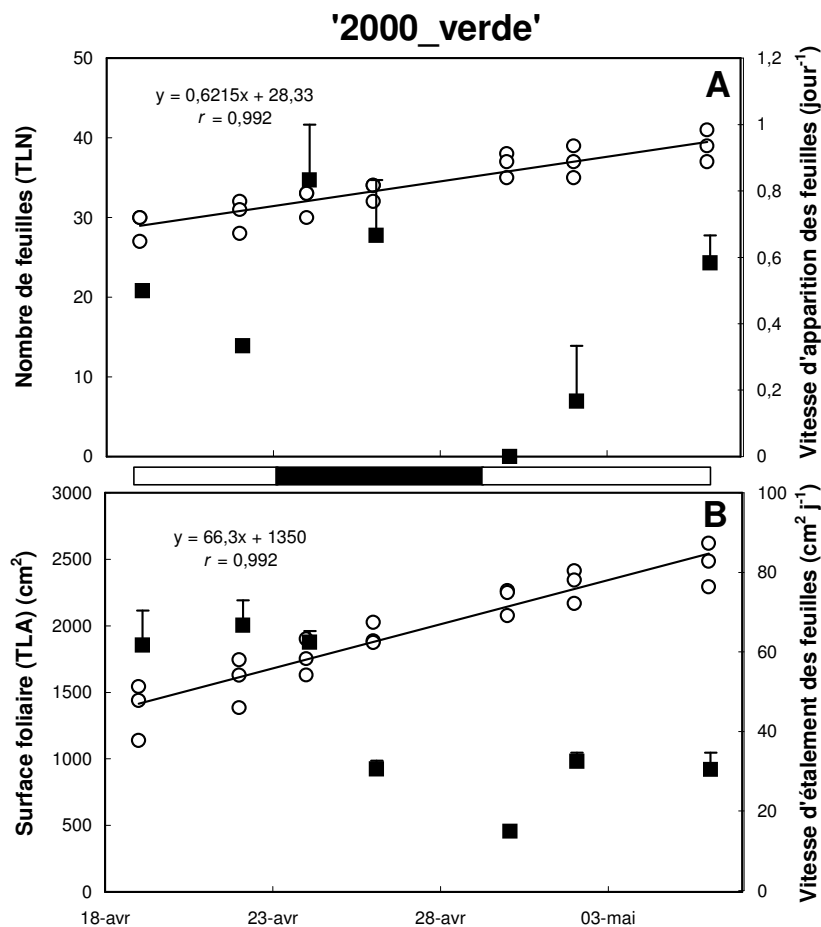


Figure 3.8. Évolution au cours du temps d'expérience du nombre de feuilles des boutures témoin (cadre A, cercles blancs), de la vitesse d'apparition des feuilles des boutures stressées (cadre A, carrés noirs), de la surface foliaire totale des boutures témoin (cadre B, cercles blancs) et des vitesses d'étalement des feuilles des boutures stressées (cadre B, carrés noirs) du clone '2000_verde'. Pour les vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles, les points correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de trois valeurs. Les périodes d'alimentation optimale en eau et d'arrêt d'arrosage sont respectivement représentées par les barres blanches et noires.

Tableau 3.II. Coefficients directeurs (a) et coefficients de Pearson (r) des régressions linéaires entre les jours de l'année (D) et le nombre total de feuilles (TLN) ou la surface foliaire totale (TLA) des boutures des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Toutes les corrélations sont significatives à $P \leq 0,001$. Les suivis de TLN et de TLA dans le temps ont été effectués à partir de 3 boutures de chaque clone.

clone	TLN = aD + b		TLA = aD + b	
	a (jour ⁻¹)	r	a (cm ² jour ⁻¹)	r
'2000_verde'	0,62	0,992	66,3	0,992
'Flevo'	0,83	0,971	97,7	0,988
'Ghoy'	0,83	0,979	65,7	0,982
'I214'	0,60	0,969	60,0	0,988
'I45-51'	0,56	0,960	65,2	0,994
'Soligo'	0,44	0,991	55,2	0,997

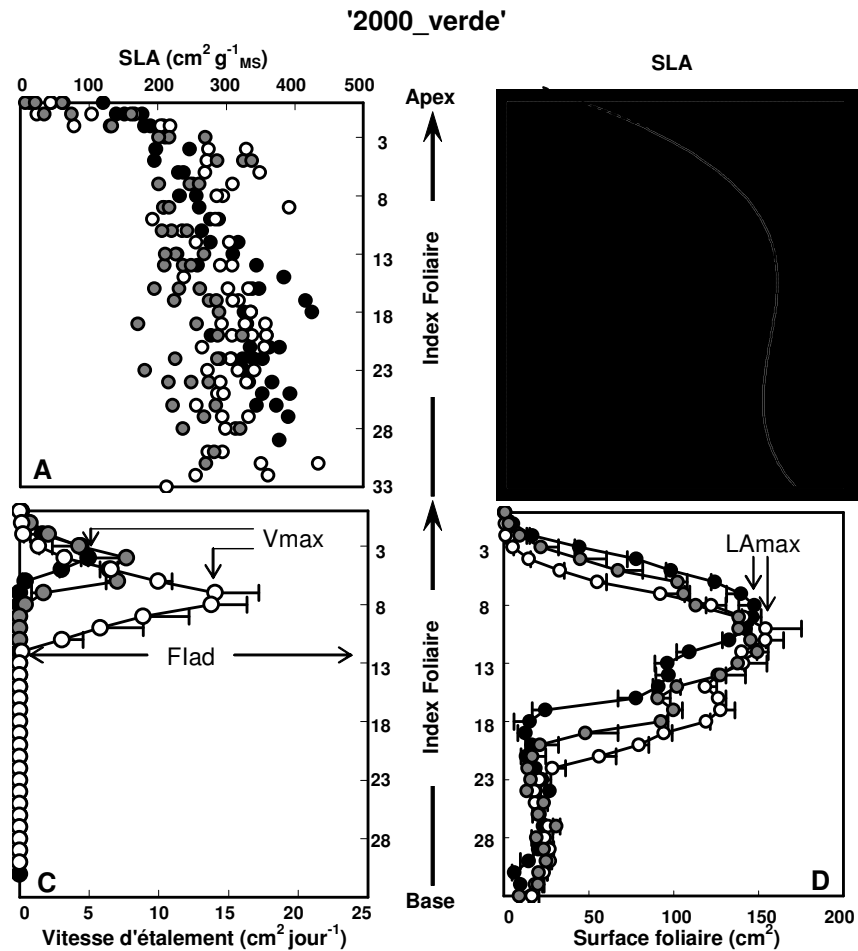


Figure 3.9. Relations entre l'index foliaire (FI), la surface massique (SLA) (A et B), la vitesse d'étalement (C) et la surface des feuilles (D). Les relations ont été établies pour les boutures témoin (blanc), stressées (noir) au plus fort du stress, et ré-arrosées (gris) lors de la réouverture des stomates, pour le clone '2000_verde'. Pour chaque traitement, 3 boutures ont été utilisées. Flad correspond au LPI de la première feuille dont la vitesse d'étalement est nulle. V_{max} est la vitesse d'étalement maximale le long de la tige. LAmax correspond à la surface foliaire maximale le long de la tige. Le point A (FI_A , SLA_A) marque la feuille présentant la SLA maximale. S_0 est la pente de la relation à l'origine.

Tableau 3.III. Valeurs minimales et maximales des moyennes des variables mesurées pour les témoins et les stressés, comparaison clonale et comparaison des témoins aux stressés. Les variables sont regroupées en 6 catégories : vigueur, croissance foliaire, structure foliaire, statut hydrique, teneurs en oses et teneurs en composés phénoliques. Les différences significatives sont indiquées par les astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. nd = non déterminée. Excepté pour les variables RGR et RGR_p, les valeurs correspondent aux moyennes de 3 mesures.

Variable	Témoins ($\Psi_{wp} = -0,55 \pm 0,02$ MPa)			Stressés ($\Psi_{wp} = -1,38 \pm 0,07$ MPa)			P (comparaison témoins / stressés)		
	Minimum	Maximum	P (comparaison clonale)	Minimum	Maximum	P (comparaison clonale)			
Vigueur	TLN	28,3	39,3	***	26,0	34,7	***		
	TLA	1846	2465	*	1125	2015	***		***
	LAR	55,2	96,2	*	49,3	104,5	**		
	LMR	0,35	0,44		0,15	0,39	**		***
	RMR	0,06	0,13	**	0,05	0,12	***		
	Biomass	22,8	37,9	***	15,5	24,4	*		***
	RGR	34,1	82,8	nd	10,2	37,7	nd		**
	RGR _p				0	57,2	nd		nd
Croissance foliaire	dTLN/dt	0,44	0,83	***	0	0,17	*	***	
	dTLA/dt	55,2	97,7		0	38,5		***	
	Vmax	14,7	26,1	*	0	10,1	*	***	
	Flad	9,0	12,6	*	0	10,1	***	***	
	DLE	13,8	20,8					nd	
	Fl _A	8,0	15,5	***				nd	
	S ₀	37,8	78,4	***				nd	
Structure foliaire	LAm _{ax}	122,0	231,9,	**	99,1	182,8		*	
	SLA _A	187,7	353,7	***	186,3	320,7	***		
Statut hydrique	Plante	g _s	204,3	420,9	*			nd	
		RWC	96,5	97,8		87,3	92,7		***
	Soil	Ψ_{wp}	-0,63	-0,47		-1,67	-1,20		***
		SWC	0,19	0,27	*	0,10	0,12		***
Oses	OsesJA	8,5	11,8		9,5	12,6	*		
	OsesC	8,8	12,9		9,9	15,3	*	**	
Composés phénoliques	Croissance	Pic4C	0,52	3,45	***	0,53	1,82	***	
		Pic16C	0,23	7,38	***	0,29	4,87	***	
		Pic27C	0	0,17	***	0	0,06	***	*
	Jeunes adultes	Pic4JA	0,37	3,95	***	0,43	2,95	***	
		Pic16JA	0,21	1,44	**	0,29	0,70	**	
		Pic27JA	0	0,08	**	0	0,10	***	

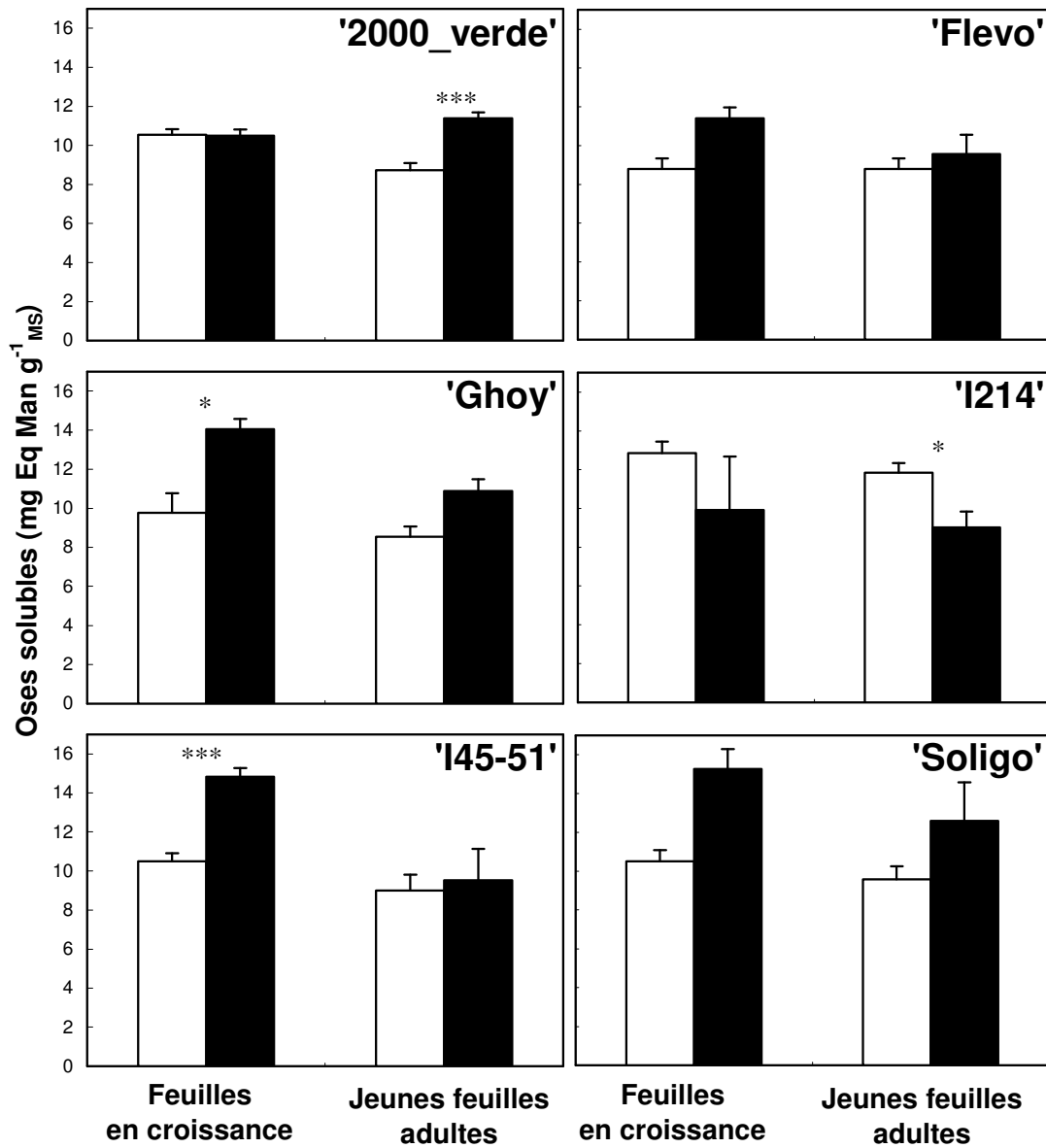


Figure 3.10. Teneurs massiques en oses solubles des feuilles en croissance et jeunes adultes de boutures témoin (blanc) et stressées (noir) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures. Les astérisques indiquent les différences significatives entre témoins et stressés : (*) pour $P \leq 0,05$ et (***) pour $P \leq 0,001$.

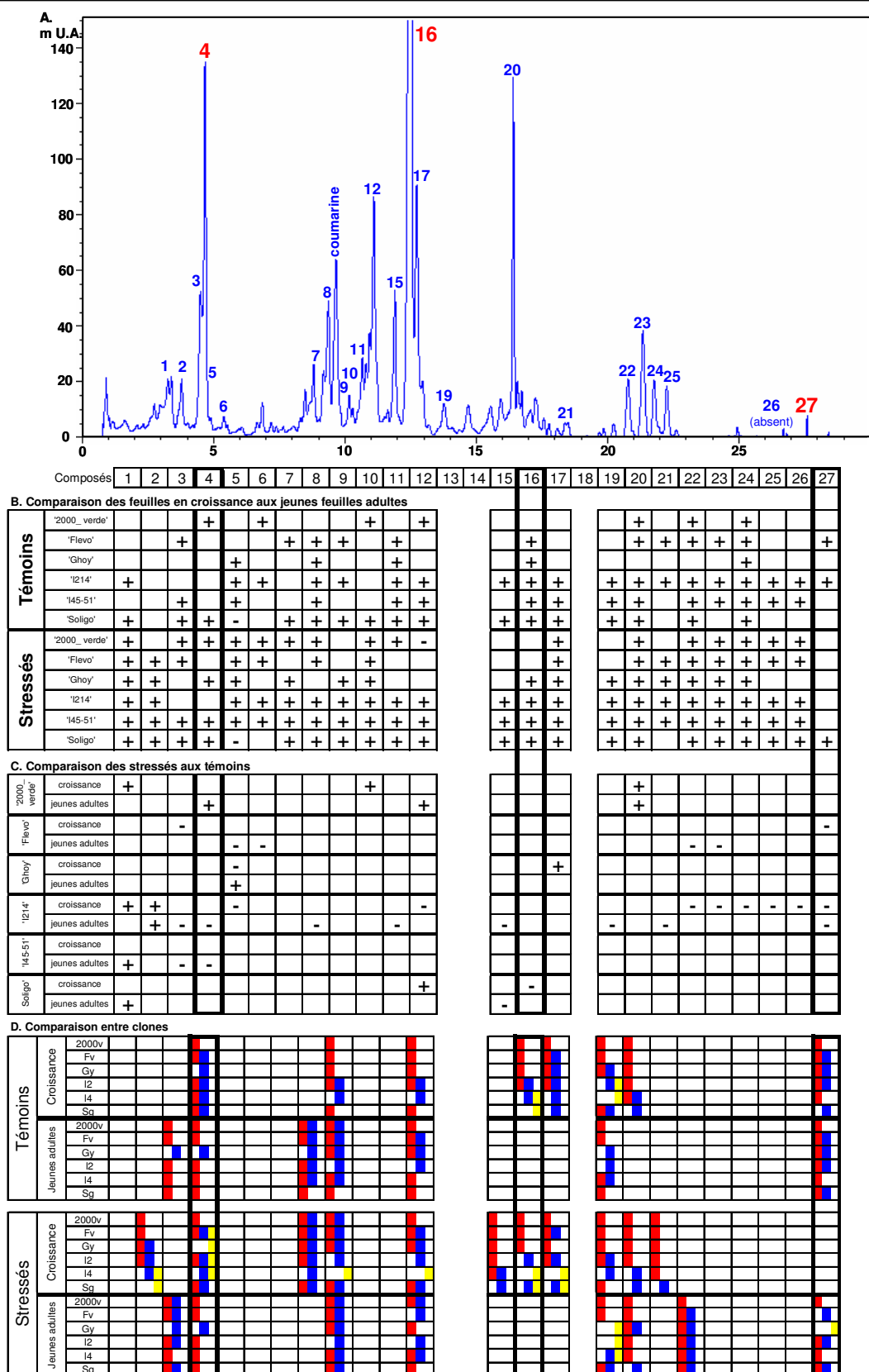


Figure 3.11. Les 24 pics quantifiés à partir des chromatogrammes HPLC – RP-18e (A) et les différences significatives ($P \leq 0,05$) entre âges de feuilles (B), entre traitements (C) et entre clones (D) pour chacun des pics. Les signes « + » indiquent des teneurs du composé plus élevées pour les feuilles en croissance que pour les jeunes adultes (B) et une augmentation des teneurs durant la sécheresse par rapport au témoin (C) ; inversement pour les signes « - » ; une absence de signe correspond à une absence de différence significative. Pour la comparaison clonale (D), les clones ayant une couleur en commun ne sont pas significativement différents entre eux. Les composés 13, 14 et 18, quantifiés dans le cadre de la comparaison des clones 'Dorskamp' / 'Luisa_Avanzo' (Chapitre 1), n'ont pas été analysés ici. n = 3 boutures.

3.3. Relations entre variables en conditions hydriques non limitantes

Une analyse en composantes principales (ACP) a été établie à partir des 3 boutures de chaque clone maintenues irriguées et collectées en fin d'expérience (Figure 3.12). Le plan principal F1 x F2 a été construit à partir des 14 variables suivantes : TLA, TLN, dTLA/dt, dTLN/dt, SLA_A, FI_A, S₀, FI_{ad}, DLE, Vmax, LAmax, Biomass, RMR et LMR (Figure 3.12, A). En comparaison avec l'ACP réalisée au Chapitre 2, il ne manquait ici que la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone ainsi que les teneurs en azote et en carbone par unité de masse. Dans l'expérience présente, le plan factoriel principal (F1 x F2) expliquait plus de 54 % de la variabilité clonale et l'axe F1 seul en traduisait environ 37 % (Figure 3.12).

L'axe F1 était défini par l'opposition entre deux groupes de variables : d'une part, SLA_A, TLN, FI_{ad} et dTLN/dt et, d'autre part, Biomass, LAmax et DLE (Figure 3.12, A). SLA_A était négativement corrélée à la biomasse totale et positivement aux vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles (dTLN/dt et dTLA/dt) (Tableau 3.IV). De fortes valeurs de ces deux dernières variables étaient associées à de faibles biomasses totales, à de faibles durées d'étalement des feuilles (DLE) et à des surfaces massiques maximales plus élevées (SLA_A). Le nombre total de feuilles (TLN) était corrélé positivement à la vitesse d'apparition des feuilles (dTLN/dt) et à FI_{ad}, variable indicatrice du nombre de feuilles simultanément en croissance. L'axe F1 opposait clairement les clones 'Flevo' et 'Ghoy' d'une part aux clones 'Soligo' et 'I45-51' d'autre part (Figure 3.12, B). Les premiers se caractérisaient par des valeurs de TLN, dTLN/dt, FI_{ad} et SLA_A plus élevées que les seconds. En revanche, 'Soligo' et 'I45-51' affichaient les plus fortes valeurs de Biomass, LAmax et DLE. La conductance stomatique totale (g_s) était positivement corrélée à SLA_A, aux vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles (dTLN/dt et dTLA/dt) et à la surface foliaire rapportée à la biomasse (LAR). En revanche, g_s était négativement corrélée à la biomasse totale, à la vitesse de croissance relative (RGR), à la durée d'étalement foliaire (DLE) et à la surface foliaire maximale (LAmax) (Tableau 3.IV). Les teneurs des composés phénoliques 4, 16 et 27 des jeunes feuilles adultes (Pic4JA, Pic16JA et Pic27JA) étaient négativement corrélées à RGR, à Biomass et à TLA. Par contre, pour les feuilles en croissance, la teneur du composé 16 était positivement corrélée à la biomasse totale et négativement à SLA_A, à TLN, à dTLN/dt et à LAR.

L'axe F2 de l'ACP était défini par l'opposition entre S₀, d'une part, et LMR et TLA, d'autre part (Figure 3.12, A). La surface foliaire totale (TLA) et l'allocation de

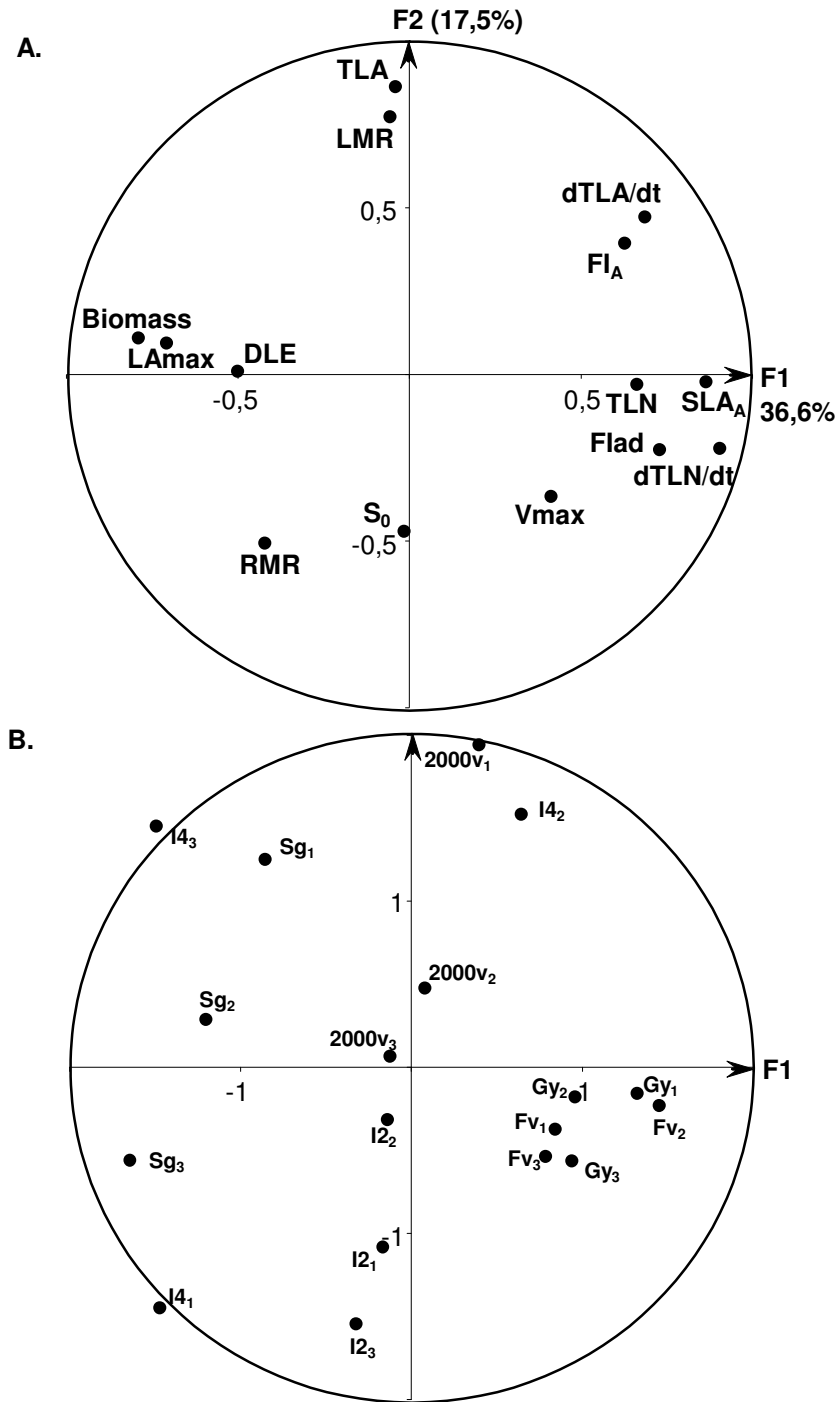


Figure 3.12. Distribution des 14 variables (A) et projection des 3 boutures de chacun des 6 clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' (B) dans le plan factoriel F1 x F2 de l'ACP établie pour les boutures témoin à la fin de l'expérience (collecte 4). F1 et F2 correspondent aux combinaisons des 14 variables et ont été construits afin de maximiser la part de variabilité qu'ils expliquent.

Tableau 3.IV. Corrélations linéaires (coefficient de Pearson) entre variables indicatrices de vigueur, de croissance foliaire, de structure foliaire, de croissance foliaire, de statut hydrique et des teneurs en oses solubles et en composés phénoliques des feuilles de plants témoin (normal) et de plants stressés (gras) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', '1214', '145-51' et 'Soligo'. Le niveau de significativité est indiqué par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les variables grisées ne concernent pas un des deux traitements (témoins / stressés). Pour les variables RGR et RGR_P, les corrélations ont été établies à partir de 6 valeurs. Pour les autres variables, les corrélations ont été établies à partir de 18 valeurs (3 répétitions par clone).

	Vigueur				Croissance foliaire				Structure foliaire		Statut hydrique			Ajustement osmotique			Composition phénolique																					
	TLN	TLA	LAR	LMR	RMR	Biomass	RGR	RGR _P	dTLN/dt	dTLA/dt	Vmax	Flad	DLE	FlA	S ₀	LAmax	SLA _A	G _s	RWC	Ψ _{wp}	SWC	OsesJA	OsesC	Pic4C	Pic16C	Pic27C	Pic4JA	Pic16JA	Pic27JA									
Vigueur																																						
TLN								0,66**		0,79***																												
TLA				0,75***				0,53*		0,80***																												
LAR																0,79***																						
LMR		0,78***																																				
RMR																																						
Biomass							0,85*						0,47*																									
RGR																																						
RGR _P																																						
Croissance foliaire																																						
dTLN/dt																																						
dTLA/dt																																						
Vmax																																						
Flad																																						
DLE																																						
FlA																																						
S ₀																																						
Structure foliaire																																						
LAmax																																						
SLA _A																																						
Statut hydrique																																						
G _s																																						
RWC																																						
Ψ _{wp}																																						
SWC																																						
Ajustement osmotique																																						
OsesJA																																						
OsesC																																						
Pic4C																																						
Pic16C																																						
Pic27C																																						
Pic4JA																																						
Pic16JA																																						
Pic27JA																																						

Tableau 3.V. Vitesses d'apparition (A) et d'étalement des feuilles (B) des boutures stressées des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' lors de l'initiation de la sécheresse, à la chute de conductance, au plus fort du stress et une semaine après le ré-arrosage. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures.

A. Vitesse d'apparition des feuilles (jour⁻¹)

Clone	Initiation du stress	Chute de conductance	Plus fort du stress	Ré-arrosage
'2000_verde'	0,67 \pm 0,17	0,67 \pm 0,17	0,00 \pm 0,00	0,58 \pm 0,08
'Flevo'	0,33 \pm 0,17	0,25 \pm 0,00	0,17 \pm 0,17	0,75 \pm 0,00
'Ghoy'	0,50 \pm 0,00	0,08 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,92 \pm 0,08
'I214'	0,67 \pm 0,33	0,67 \pm 0,33	0,17 \pm 0,17	0,58 \pm 0,08
'I45-51'	0,33 \pm 0,17	0,25 \pm 0,14	0,17 \pm 0,17	0,58 \pm 0,08
'Soligo'	0,50 \pm 0,00	0,33 \pm 0,17	0,08 \pm 0,08	0,58 \pm 0,08

B. Vitesse d'étalement des feuilles (cm² jour⁻¹)

'2000_verde'	83,68 \pm 22,08	30,61 \pm 2,06	14,95 \pm 0,79	30,45 \pm 4,21
'Flevo'	108,03 \pm 17,06	54,07 \pm 18,97	38,49 \pm 7,15	49,62 \pm 3,58
'Ghoy'	89,97 \pm 2,84	33,40 \pm 9,26	0,00 \pm 0,00	38,25 \pm 10,60
'I214'	68,56 \pm 17,94	41,34 \pm 17,62	33,48 \pm 18,83	44,79 \pm 2,22
'I45-51'	73,44 \pm 24,14	35,81 \pm 14,05	5,41 \pm 0,93	58,82 \pm 9,38
'Soligo'	59,15 \pm 9,46	14,88 \pm 2,64	11,86 \pm 2,43	41,25 \pm 3,43

biomasse au feuillage (LMR) étaient étroitement et positivement associées (Tableau 3.IV). Bien que l'ACP ne l'affiche pas clairement, une corrélation négative et significative était observée entre S_0 et FI_A . En revanche, aucune relation n'était observée entre S_0 ou FI_A et SLA_A (Tableau 3.IV). L'axe F2 opposait le clone 'I214' au clone '2000_verde' : le premier se distinguait du second par de plus faibles valeurs de TLA et de LMR et par une plus forte valeur de S_0 .

3.4. Impact de la sécheresse sur les paramètres de vigueur, de croissance et de structure des feuilles

En réponse à la sécheresse, les clones ont subi une chute de leur vitesse de croissance relative (RGR_P) d'une amplitude de 0 à 57 $mg\ g^{-1}_{MS}\ jour^{-1}$ (Tableau 3.III). La contrainte hydrique occasionna notamment une réduction des surfaces foliaires totale et individuelle (TLA et L_{Max}), de la biomasse totale et de l'allocation de biomasse au feuillage des boutures (LMR) (Tableau 3.III et Annexe 3.7). Les clones 'Soligo' et 'I45-51' ont subi les plus sévères chutes de RGR (respectivement 57,2 et 48,0 $mg\ g^{-1}_{MS}\ jour^{-1}$) (Tableau 3.VII). Il est également important de signaler que les clones 'Soligo' et 'Ghoy' ont perdu un nombre important de feuilles en réponse à la sécheresse (résultats non présentés). L'accumulation de biomasse n'était, en revanche, pas significativement réduite par la contrainte hydrique pour le clone 'I214'. La sécheresse entraîna également une nette diminution de la croissance foliaire des boutures ($dTLN/dt$, $dTLA/dt$, V_{max} et FI_{ad}) (Tableau 3.III et 3.V). Pour le clone 'Ghoy', en particulier, l'apparition et l'étalement des feuilles étaient totalement stoppés, au plus fort du stress (Tableau 3.V et Annexes 3.1, 3.2 et 3.4). Bien que cela ne soit pas significatif, la surface massique maximale (SLA_A) était réduite par la sécheresse. Les teneurs en oses solubles et en composés phénoliques n'étaient pas significativement affectées par la contrainte.

La chute de RGR durant la sécheresse (RGR_P) était uniquement corrélée négativement aux teneurs en oses solubles des feuilles en croissance ($OsesC$) (Tableau 3.IV). Comme en conditions non limitantes en eau, la biomasse totale était négativement associée à SLA_A . En revanche, la biomasse était positivement corrélée à la surface foliaire totale (TLA) et RGR à son étalement ($dTLA/dt$ et V_{max}). Les teneurs en oses solubles des feuilles en croissance ($OsesC$) et du composé phénolique 4 des deux étages de feuilles ($Pic4C$ et $Pic4JA$) étaient négativement corrélées aux variables de vigueur et de croissance

Tableau 3.VI. Corrélations linéaires (coefficient de Pearson) entre témoins et stressés pour les variables indicatrices de vigueur, de croissance foliaire, de croissance foliaire, de statut hydrique et des teneurs en oses solubles et en composés phénoliques des feuilles des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', '1214', '145-51' et 'Soligo'. Le niveau de significativité est indiqué par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (***) pour $P \leq 0,01$. Les variables grisées ne concernent pas un des deux traitements (témoins / stressés). Pour les variables RGR et RGR_P, les corrélations ont été établies à partir de 6 valeurs. Pour les autres variables, les corrélations ont été établies à partir de 18 valeurs (3 répétitions par clone).

	Témoins																															
	Vigueur						Croissance foliaire						Structure foliaire			Statut hydrique			Ajustement osmotique		Composition phénolique											
	TLN	TLA	LAR	LMR	RMR	Biomass	RGR	RGR _P	dTLN/dt	dTLA/dt	Vmax	Flad	DLE	Fl _A	S ₀	LAm _{ax}	SLA _A	g _s	RWC	Ψ _{wp}	SWC	OsesJA	OsesC	Pic4C	Pic16C	Pic27C	Pic4JA	Pic16JA	Pic27JA			
Vigueur	0,92 **								0,93 **																							
Biomass					0,93 **																											
RGR							0,90 *	0,85 *																								
RGR _P																																
Croissance foliaire									0,93 **			0,95 **																				
dTLN/dt																																
dTLA/dt																																
Vmax																																
Flad																																
DLE																																
Fl _A																																
S ₀																																
Structure foliaire																																
LAm _{ax}																																
SLA _A																																
Statut hydrique																																
g _s																																
RWC																																
Ψ _{wp}																																
SWC																																
Ajustement osmotique																																
OsesJA																																
OsesC																																
Pic4C																																
Pic16C																																
Pic27C																																
Pic4JA																																
Pic16JA																																
Pic27JA																																

foliaire : LMR, RMR, RGR, dTLA/dt et FIad pour OsesC, et TLA, LMR et FIad pour Pic4 (Tableau 3.IV).

3.5. Relations entre paramètres mesurés en conditions hydriques non limitantes et paramètres mesurés en conditions de sécheresse

Le ralentissement de la vitesse de croissance relative observé en conditions de sécheresse (RGR_p) était corrélé positivement à la biomasse totale et au RGR des boutures témoin, et négativement à la conductance stomatique (g_s) mesurée en conditions non limitantes en eau (Tableau 3.VI). La variable FI_A déterminée en conditions témoin était négativement corrélée au RGR, aux vitesses d'étalement foliaire totale (dTLA/dt) et individuelle (V_{max}), à l'index de la première feuille ayant arrêté de croître (FIad) et au potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) atteints au cours de la sécheresse. Au contraire, la variable S_0 estimée pour les plants témoin était positivement corrélée à V_{max} , à FIad et à Ψ_{wp} des boutures stressées. Les teneurs en composés phénoliques estimées en conditions hydriques non limitantes étaient corrélées aux paramètres foliaires : TLN pour Pic16C, TLA pour Pic 4C et Pic4JA, et V_{max} et dTLA/dt pour Pic27C (Tableau 3.VI).

4. Discussion

4.1. Relations entre productivité, croissance foliaire, structure des feuilles et transpiration en conditions non limitantes en eau

En conditions non limitantes en eau, la biomasse sèche totale des boutures (Biomass) était positivement corrélée à la vitesse de croissance relative (RGR), indiquant que la variable Biomass représente un indicateur fiable du niveau de productivité des clones lorsque les conditions environnementales sont stables (Tableau 3.IV). La biomasse totale était également corrélée négativement à la surface foliaire rapportée à la biomasse (LAR) et à la surface massique maximale (SLA_A), mettant à nouveau en évidence la faible importance de la part de biomasse allouée aux feuillage (LMR) dans l'équation décomposant classiquement RGR en l'interaction de SLA , de LMR et de NAR (vitesse d'assimilation nette de CO_2) (West *et al.* 1920, Lambers 1998, Chapitre 2). De plus, plusieurs études ont montré que, à faible éclaircissement, la productivité est essentiellement liée à la SLA , la NAR n'intervenant que faiblement dans la détermination de la RGR (Poorter et Van der Werf 1998, Shipley 2002).

Dans cette expérience effectuée à faible éclaircissement, une productivité importante des clones n'était pas associée à une grande surface foliaire totale (TLA) (Tableau 3.IV). Toutefois, la surface foliaire individuelle maximale le long de la tige (L_{Amax}) était corrélée positivement à la biomasse totale. Les variables L_{Amax} et Biomass s'opposaient aux vitesses d'apparition ($dTLN/dt$) et d'étalement des feuilles ($dTLA/dt$), au nombre total de feuilles (TLN) et au nombre de feuilles en croissance (FIad) (Figure 3.11, A). Dans les conditions de l'expérience, les clones les plus productifs (forte Biomass) semblent donc être ceux étalant lentement (faibles $dTLN/dt$, $dTLA/dt$, V_{max} et fort DLE) un nombre réduit de feuilles (faibles TLN et FIad) de grande taille (forte L_{Amax}). Pour diverses espèces d'hybrides de peuplier, Ceulemans *et al.* avaient également montré en 1988 que les cultivars les plus productifs présentaient les feuilles les plus grandes, que ces cultivars avaient généralement moins de feuilles en croissance que des clones moins productifs et que le lien entre la productivité et la vitesse d'apparition des feuilles n'était pas constant. Deux groupes de clones s'opposaient le long de l'axe F1 de l'ACP : d'une part, les clones 'Soligo' et 'I45-51', présentant une croissance foliaire modérée mais une productivité importante, et, d'autre part, les clones 'Flevo' et 'Ghoy' pour lesquels la croissance foliaire était plus rapide mais la productivité plus faible (Figure 3.11, B).

Comme dans l'expérience décrite au Chapitre 2, effectuée dans des conditions d'éclairement différentes, la variable SLA_A est corrélée à la biomasse des cultivars et semble donc être un indicateur stable de la productivité. En revanche, les liens entre productivité et croissance foliaire sont équivoques par rapport au chapitre précédent. Dans les conditions d'éclairement de l'expérience du Chapitre 2 (densité de flux de photons transmis dans le PAR de l'ordre de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la productivité des clones était étroitement corrélée à la surface foliaire totale mais indépendante des variables indicatrices de la croissance du feuillage (Tableau 2.7, page 156). Au contraire, dans l'expérience décrite dans ce chapitre (densité de flux de photons transmis dans le PAR de l'ordre de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la productivité n'est plus associée à la surface totale du feuillage et elle est négativement corrélée aux vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles (Tableau 3.IV). Il a été couramment observé sur arbres adultes ou pour des couverts forestiers une étroite et positive corrélation entre croissance foliaire et productivité, le temps nécessaire à la mise en place de la surface foliaire maximale étant considéré comme l'un des facteurs principaux limitant la productivité (Watson 1952, Loomis et Williams 1963, Larson et Isebrands 1971, Tadaki et Karizumi 1977, Gifford et Jenkins 1982). Les conditions lumineuses pour lesquelles ces observations ont été effectuées peuvent sans doute être considérées comme optimales puisque naturelles. Le lien entre croissance foliaire et productivité varierait donc en fonction de l'intensité lumineuse de croissance. Lorsque la lumière est limitante ou lorsque la plante est jeune, elle pourrait favoriser l'investissement de matière et d'énergie dans l'étalement de la surface d'interception de la lumière au détriment de l'accumulation de matière. Quand la lumière n'est plus limitante, l'accumulation de matière pourrait devenir proportionnelle à l'investissement fait dans la surface foliaire.

La conductance stomatique des feuilles était corrélée négativement à la durée d'expansion foliaire (DLE) et positivement aux vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles ($dTLN/dt$ et $dTLA/dt$). La mise en place rapide de la surface foliaire est associée à une transpiration importante par unité de surface : les clones présentant la croissance foliaire la plus importante semblent donc être les plus grands consommateurs d'eau. Ce résultat est en accord avec la corrélation positive observée au Chapitre 2, pour les trente et

un cultivars, entre les paramètres de croissance foliaire (TLN, dTLN/dt) et $\Delta^{13}\text{C}$, les clones ayant la croissance foliaire la plus rapide utilisant le moins efficacement l'eau.

La conductance stomatique était également corrélée négativement aux paramètres de vigueur tels que la vitesse de croissance relative (RGR) et la biomasse totale (Biomass) (Tableau 3.IV). Les clones les plus productifs seraient donc ceux ayant la plus faible transpiration. Dans l'expérience décrite au Chapitre 2, la productivité des clones était indépendante de leur efficacité d'utilisation de l'eau (WUE). À l'échelle foliaire, WUE instantanée est définie comme le rapport de l'assimilation de CO_2 (A) à la transpiration (E) (Guehl *et al.* 1994). Sous l'hypothèse d'une assimilation proche entre clones, WUE est donc inversement proportionnelle à la transpiration. Pour une large gamme d'espèces de peuplier et d'hybrides, il avait effectivement déjà été montré que les cultivars utilisant le plus efficacement l'eau avaient la plus faible conductance stomatique, grâce à un meilleur contrôle stomatique dû à des adaptations limitant les pertes en eau telles que des stomates plus petits et moins fréquents ou la présence de rebords cuticulaires ou de poils au dessus des pores des stomates (Ceulemans *et al.* 1978, Blake *et al.* 1984). Il semble donc exister une contradiction entre les deux expériences dans le sens de la corrélation entre la productivité et WUE. Cette contradiction pourrait être due au fait que des différences clonales d'assimilation de CO_2 participent également aux différences clonales de WUE mesurées au Chapitre 2.

La teneur du composé phénolique 16 des feuilles en croissance était négativement et étroitement liée aux paramètres indicateurs du nombre de feuilles et de leur vitesse d'apparition (TLN, dTLN/dt et FIad) ainsi qu'à la surface massique maximale (SLA_A) (Tableau 3.IV). En revanche, les teneurs des composés 4 et 27 des jeunes feuilles adultes étaient négativement corrélées aux paramètres indicateurs de la surface foliaire (TLA et LAmax). Pour ce même étage de feuilles, les teneurs des composés 16 et 27 étaient négativement associées aux paramètres de productivité (Biomass et RGR). Ces corrélations mettent en évidence l'intérêt potentiel des composés phénoliques comme indicateur métabolique de croissance foliaire et/ou de productivité.

4.2. Modulation par la sécheresse des relations entre productivité, croissance des feuilles, structure foliaire et transpiration

La contrainte hydrique a entraîné la fermeture des stomates des six cultivars. Néanmoins, la conductance stomatique des clones 'I214', '2000_verde' et 'Soligo' était réduite dès les potentiels hydriques foliaires de base (Ψ_{wp}) de l'ordre de -0,6 MPa, alors que la conductance des clones 'Ghoy', 'Flevo' et 'I45-51' ne chutait qu'à partir de Ψ_{wp} inférieurs à -1 MPa (Figure 3.5 et Tableau 3.VII). La capacité à maintenir le statut hydrique durant la sécheresse a déjà été considérée comme indicateur de tolérance à la sécheresse (Matin *et al.* 1989, Kimani *et al.* 1994). Il a d'ailleurs été montré que les clones de peuplier les plus tolérants à la sécheresse avaient un meilleur contrôle stomatique des pertes en eau (Harvey et van den Driessche 1997). En terme de chute de RGR durant la sécheresse (RGR_p), les clones 'I214' ($RGR_p = 0 \text{ mg g}^{-1}_{MS} \text{ jour}^{-1}$) et 'I45-51' ($RGR_p = 48 \text{ mg g}^{-1}_{MS} \text{ jour}^{-1}$) faisaient effectivement partie des extrêmes, cependant le clone 'Soligo', qui fermait précocement ses stomates, subissait une réduction importante de sa productivité pendant la contrainte hydrique ($RGR_p = 57 \text{ mg g}^{-1}_{MS} \text{ jour}^{-1}$) (Tableau 3.VII). Le contrôle stomatique des pertes en eau ne constitue donc sans doute pas un déterminant exclusif de niveau de tolérance à la sécheresse.

En conditions limitantes en eau, la biomasse totale était négativement corrélée à SLA_A (Tableau 3.IV). En revanche, les paramètres d'expansion foliaire ($dTLA/dt$, V_{max} et LPI_{ad}) et la surface foliaire totale (TLA) étaient positivement associés à la RGR. Les clones les plus productifs correspondent à ceux étalant rapidement une importante surface foliaire de surface massique faible. Durant la sécheresse, l'allocation de biomasse au feuillage (LMR) était réduite (Tableau 3.III). En raison des risques que représente une importante surface foliaire en conditions de sécheresse, les cultivars ne semblent plus favoriser la surface du feuillage au dépend de l'accumulation de biomasse. Une fois encore, le lien entre la productivité et la croissance foliaire s'avère donc très dépendant des conditions du milieu. La variable SLA_A semble ainsi être un indicateur de la productivité plus fiable que la croissance et la surface du feuillage.

Les cultivars subissant la plus importante perte de productivité durant la sécheresse (RGR_p) étaient les plus productifs en conditions non limitantes en eau (fortes RGR et Biomass) (Tableau 3.VI). Les clones les plus productifs sont donc les plus sensibles à la sécheresse. Ces clones, dont l'accumulation de biomasse s'est avérée sensible au manque

Tableau 3.VII. Vitesse de croissance relative (RGR), surface massique maximale (SLA_A) et conductance stomatique (g_s) pour les plants témoin ; ralentissement de la vitesse de croissance relative (RGR_P), surface massique maximale (SLA_A) et potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) provoquant la chute de conductance stomatique pour les plants stressés des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 valeurs.

	Témoins			Stressés		
	RGR	SLA _A	g _s	RGR _P	SLA _A	Ψ _{wp} (chute g _s)
'2000_verde'	71,15	316,0	288,9	34,89	274,5	-0,51
'Flevo'	54,74	335,9	410,5	19,34	305,3	-1,03
'Ghoy'	40,23	261,0	395,6	30,00	298,3	-1,33
'I214'	34,14	249,6	420,8	0,00	199,0	-0,50
'I45-51'	65,33	271,5	315,4	47,96	320,8	-1,03
'Soligo'	82,81	220,0	204,3	57,20	186,3	-0,75

d'eau (clones 'I45-51' et 'Soligo'), présentaient également les plus faibles valeurs de conductance stomatique lorsque l'eau n'était pas limitante et, subséquemment, les plus fortes valeurs de WUE. Contrairement aux nombreuses études déjà menées sur le lien entre la WUE et la tolérance à la sécheresse, il semblerait que, pour les peupliers euraméricains, les clones les plus productifs et utilisant le plus efficacement l'eau lorsqu'elle n'est pas limitante soient les plus sensibles à la contrainte hydrique (Blake et Suiter Filho 1988, Sun *et al.* 1996, Zhang *et al.* 1997, Nguyen-Queyrens *et al.* 1998, DaMatta *et al.* 2003).

Alors qu'en conditions témoin les teneurs en oses solubles n'étaient associées ni à la vigueur, ni à la croissance foliaire des boutures, en conditions de sécheresse ces teneurs étaient corrélées négativement à RGR, à $dTLN/dt$, à $dTLA/dt$ et à FIad (Tableau 3.IV). Cet apparent antagonisme entre croissance foliaire et ajustement osmotique en conditions de sécheresse avait déjà été noté pour les clones 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp' (Marron *et al.* 2002, Annexe 1.1 ; Chapitre 1). La réduction de croissance foliaire et d'accumulation de biomasse durant la sécheresse pourrait permettre à la plante de favoriser l'ajustement osmotique. De plus, les clones pour lesquels l'accumulation d'oses solubles était la plus marquée durant la contrainte, subissaient la plus sévère chute de RGR (RGR_p) (Tableau 3.IV).

En raison de la lourdeur des expériences d'arrêt d'arrosage/ré-arrosage et de la quantité importante de paramètres pris en compte, l'expérience décrite dans ce chapitre portait sur les six cultivars présentant les comportements les plus tranchés parmi les trente et un clones étudiés au Chapitre 2. Ce nombre présentait cependant le double inconvénient d'être trop élevé pour permettre des comparaisons clonales aussi fines que celles présentées au Chapitre 1 pour 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' et d'être trop faible pour permettre d'effectuer des corrélations entre variables aussi robustes que celles présentées au Chapitre 2 pour les trente et un cultivars. Cette limite de l'expérience est peut-être en partie responsable du fait que certains des liens entre variables observés au Chapitre 2, notamment les corrélations des variables LPI_A et S_0 avec les paramètres de croissance foliaire ($dTLN/dt$, LPI_{ad} , TLN), n'ont pas été retrouvés ici.

Conclusion et perspectives

La peupleraie française est essentiellement composée d'hybrides présentant des niveaux de productivité et de tolérance à la sécheresse extrêmement variés. Le développement actuel de la populiculture et son éloignement subséquent des zones alluviales ont fait naître le besoin de cultivars associant la tolérance à la sécheresse à la productivité. Les liens entre ces deux qualités et les facteurs intrinsèques les déterminants ne sont cependant que peu connus. Dans ce contexte, l'objectif de notre thèse se situait à deux niveaux. Sur le plan fondamental, il a consisté à comparer la réponse à la sécheresse de deux clones de peupliers euraméricains aux comportements tranchés en terme de croissance et vis-à-vis de la contrainte hydrique, et à dégager de cette comparaison des caractères foliaires potentiellement impliqués dans la détermination du niveau de tolérance à la sécheresse. Sur le plan appliqué et sur la base de ces observations, notre objectif était ensuite de juger si ces caractères foliaires pouvaient être utilisés comme indicateurs de productivité et de tolérance à la sécheresse à partir d'une large gamme de représentants de l'espèce *Populus x canadensis*.

Les clones de *P. x canadensis*, 'Luisa_Avanzo' et 'Dorskamp', se différencient par leur degré de sensibilité au manque d'eau et par leurs modalités de croissance. De leur comparaison, il apparaît que la réponse des cultivars à la sécheresse n'est pas spécifique de leur niveau de tolérance. Les mécanismes visant à réduire les pertes en eau et à protéger l'intégrité de la cellule sont en effet mis en œuvre durant la sécheresse de façon semblable quel que soit le niveau de tolérance à la sécheresse du clone : réduction de la conductance stomatique et de la croissance foliaire, ajustement osmotique, stimulation des systèmes de lutte contre les oxydations. À son terme, la contrainte hydrique occasionne cependant une réduction de surface foliaire variant en fonction du cultivar, le clone 'Dorskamp' présentant notamment la faculté de stimuler l'apparition et l'étalement de ses feuilles

lorsque les conditions hydriques sont redevenues favorables. De plus, il semble que l'amplitude de cette réduction de surface foliaire soit dépendante des caractéristiques constitutives de croissance (vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles, surface foliaire, nombre de feuilles ...) et de structure des feuilles (surface massique ...) des clones. Ces caractères foliaires propres aux clones même lorsque l'eau n'est pas limitante pourraient représenter des indicateurs intéressants de la productivité et du niveau de tolérance à la sécheresse des hybrides. Il apparaît de plus que, en raison de l'étroite dépendance de l'anatomie et de la physiologie de la feuille avec son stade de développement, il est primordial de tenir compte de l'âge des feuilles pour lesquelles les caractères sont estimés.

Les paramètres déduits de la relation entre la surface massique des feuilles (SLA) et leurs index de plastochrone (LPI) se sont révélés être des indicateurs précieux de la productivité des clones et de leur efficacité d'utilisation de l'eau. De plus, l'indépendance entre productivité et efficacité à utiliser l'eau lorsque les conditions lumineuses sont optimales laisse augurer la possibilité de sélectionner les cultivars pour ces deux critères à la fois. Il semble néanmoins qu'une productivité importante soit associée à une plus grande sensibilité à la sécheresse. Les paramètres descriptifs de la surface foliaire et de sa mise en place se sont, en revanche, avérés être des indicateurs peu fiables de la productivité. Les liens entre la croissance foliaire et l'accumulation de biomasse sont, en effet, très dépendants des conditions environnementales, la plante favorisant l'étalement de la surface au dépend de l'accumulation de biomasse lorsque la lumière est faible ou, au contraire, la limitant lorsqu'elle représente un risque pour la cohérence de la colonne de sève ascendante en conditions de sécheresse.

Les caractéristiques morphologiques et physiologiques de la feuille se sont avérées être de prometteurs indicateurs de la vigueur et de la sensibilité aux contraintes de la plante. Cependant, l'étroite dépendance des caractéristiques foliaires étudiées avec les conditions environnementales soulève la question de la possibilité d'extrapolation des résultats obtenus sur boutures ligneuses de deux mois élevées en serre à des arbres adultes croissant en conditions naturelles. Les bases génétiques des caractères foliaires potentiellement indicateurs de productivité et de tolérance à la sécheresse mis en évidence durant notre thèse restent également à déterminer. Ces deux perspectives de travail sont

déjà en cours d'étude dans le cadre de la thèse de Romain Monclus commencée en 2002 sous le triple patronage du LBLGC (Université d'Orléans) et des INRA de Nancy et d'Orléans. L'étude de la composition phénolique des feuilles est également en cours d'approfondissement grâce à des mesures par résonance magnétique nucléaire (RMN) effectuées par l'antenne de Chartres de l'équipe d'écophysiologie/biochimie du LBLGC. Dans le cadre de la collaboration du laboratoire avec l'INRA de Nancy, des analyses de la structure de la feuille à l'aide de la microscopie électronique à balayage (MEB) afin de déterminer les facteurs de variations de la SLA, ou des suivis de l'assimilation de CO₂ journalière des divers clones, pour approfondir l'étude de l'efficacité d'utilisation de l'eau des divers cultivars, sont, entre autres, également en projets.

Bibliographie

- Abrams, M.D., M.E. Kubiske et S.A. Mostoller.** 1994. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. *Ecology* 75:123-133.
- Alibert, G., R. Ranjeva et M.A. Boudet.** 1977. Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15:279-301.
- Allain, P.** 2000. Les médicaments. Ed. CdM Editions, Bouchemaine, France, 500 p.
- Alscher, R.G., J.L. Donahue et C.L. Cramer.** 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plantarum* 100:224-233.
- Altman, A.** 1999. Le peuplier, le stress et la transgénèse. *Biofutur* 188:36-39.
- Babbs, C.F., J.A. Pham et R.C. Coolbaugh.** 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.* 90:1267-1270.
- Balzinger, M. et C. Ginisty.** 2002. Compte rendu de la Commission Nationale du Peuplier. 11 juin. 13 p.
- Berry, J. et O. Björkman.** 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* 31:491-543.
- Biagioni, M., C. Nali, D. Heimler et G. Lorenzini.** 1997. PAL activity and differential ozone sensitivity in tobacco, bean and poplar. *J. Phytopathol.* 145:533-539.
- Bieleski, R.L. et R.J. Redgwell.** 1985. Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation products in developing apricot leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 12:657-668.
- Bilger, W., U. Schreiber et O.L. Lange.** 1987. Chlorophyll fluorescence as an indicator of heat induced limitation of photosynthesis in *Arbutus unedo* L. *In: Plant Response to Stress.* Eds. J.D. Tenhunen, F.M. Catarino et O.L. Lange. Springer, Berlin, Allemagne, pp. 391-399.
- Björkman, O.** 1987. Low temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis photoinhibition. *In: Topics in photosynthesis.* Eds. D.J. Kyle, C.B. Osmond et C.J. Arntzen. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, pp. 123-144.
- Blake, T.J., J.S. Sperry et T.J. Tschaplinski.** 1996. Water relations. *In: Biology of Populus and its implications for management and conservation.* Eds. R.F. Stettler, H.D.J. Bradshaw, P.E. Heilman et T.M. Hinckley. NRC-CNRC, Ottawa, Canada, pp. 401-422.
- Blake, T.J. et W. Suiter Filho.** 1988. Drought tolerance, growth partitioning and vigor in eucalypt seedlings and rooted cuttings. *Tree Physiol.* 4:325-335.
- Blake, T.J., T.J. Tschaplinski et A. Eastham.** 1984. Stomatal control of water use efficiency in poplar clones and hybrids. *Can. J. Bot.* 64:1344-1351.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel et M. Saran.** 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Method Enzymol.* 186:343-355.
- Bowman, W.D. et S.W. Roberts.** 1985. Seasonal changes in tissue elasticity in chaparral shrubs. *Physiol. Plantarum* 65:233-236.
- Braatne, I.H., T.M. Hinckley et R.F. Stettler.** 1992. Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F1 hybrids. *Tree Physiol.* 11:325-339.

- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brendel, O., D. Pot, C. Plomion, P. Rozenberg et J.M. Guehl.** 2002. Genetic parameters and QTL analysis of delta C-13 and ring width in maritime pine. *Plant Cell Environ.* 25:945-953.
- Breton, V.** 2000. Évolution de la populiculture – Période 1996-1999. Rapport national de la France. Commission Internationale du Peuplier – XXI^{ème} session – USA.
- Brignolas, F., C. Thierry, G. Guerrier et E. Boudouresque.** 2000. Compared water deficit response of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Ann. For. Sci.* 57:261-266.
- Brosse, J.** 2000. Larousse des Arbres et des Arbustes. Ed. Larousse, Paris, France, pp. 343-351.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem et R.L. Jones.** 2001. Biochemistry and molecular biology of plants. Ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, 1367 p.
- Burke, J.J., P.E. Gamble, J.L. Hatfield et J.E. Quisenberry.** 1985. Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. *Plant Physiol.* 79:415-419.
- Caraglio, Y., E. Elguero, I. Mialet et H. Rey.** 1990. Le peuplier : modélisation et simulation de son architecture (*Populus nigra* L. et cultivars, exemple des clones I45/51 et I214). Rapport de convention I.D.F. / Unité de modélisation des plantes du C.I.R.A.D./G.E.R.D.A.T.
- Casano, L.M., M. Martín et B. Sabater.** 1994. Sensitivity of superoxide dismutase transcript levels and activities to oxidative stress is lower in mature-senescent than in young barley leaves. *Plant Physiol.* 106:1033-1039.
- Casano, L.M., M. Martín, J.M. Zapata et B. Sabater.** 1999. Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. *Plant Sci.* 149:13-22.
- Čatský, J.** 1959. The role played by growth in the determination of water deficit in plants. *Biol. Plantarum* 1:277-286.
- Ceulemans, R.** 1990. Genetic variation in functional and structural productivity determinants in poplar. Ed. U.o. Antwerp. Thesis Publishers, Anvers, Belgique, 99 p.
- Ceulemans, R., I. Impens, R. Lemeur, R. Moermans et Z. Samsuddin.** 1978. Water movement in the soil-poplar-atmosphere system. I. Comparative study of stomatal morphology and anatomy, and the influence of stomatal density and dimensions on the leaf diffusion characteristics in different poplar clones. *Æcol. Plant.* 13:1-12.
- Ceulemans, R., I. Impens et V. Steenackers.** 1988. Genetic variation in aspects of leaf growth of *Populus* clones, using the leaf plastochron index. *Can. J. Forest Res.* 18:1069-1077.
- Ceulemans, R. et J.G. Isebrands.** 1996. Carbon acquisition and allocation. *In: Biology of Populus and its implications for management and conservation.* Eds. R.F. Stettler, H.D.J. Bradshaw, P.E. Heilman et T.M. Hinckley. NRC-CNRC, Ottawa, Canada, pp. 355-399.
- Chen, S., S. Wang, A. Altman et A. Hüttermann.** 1997. Genotypic variation in drought tolerance of poplar in relation to abscisic acid. *Tree Physiol.* 17:797-803.
- Choong, M.F., P.W. Lucas, J.S.Y. Ong, B. Pereira, H.T.W. Tan et I.M. Turner.** 1992. Leaf fracture toughness and sclerophylly: their correlations and ecological implications. *New Phytol.* 121:597-610.

- Clifford, S.C., S.K. Arndt, J.E. Corlett, S. Joshi, N. Sankhla, M. Popp et H.G. Jones.** 1998. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J. Exp. Bot.* 49:967-977.
- Coley, P.D., J.P. Bryant et F.S. Chapin.** 1985. Resource availability and plant herbivore defence. *Science* 230:895-899.
- Cooper, D.T. et D.F. Van Haverbeke.** 1990. *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh.: eastern cottonwood. *In: Silvics of North America: Volume 2, Hardwoods Ed. U. Forest Service. D.C., Agric. Handbook, Washington, USA, pp. 530-543.*
- Cornelissen, J.H.C., P. Castro-Díez et A.L. Carnelli.** 1998. Variation in relative growth rate among woody species. *In: Inherent variation in plant growth; Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 363-392.
- Cosgrove, D.J.** 1993. How do plant cell walls extend? *Plant Physiol.* 102:1-6.
- Costa, P., N. Bahrman, J.M. Frigerio, A. Kremer et C. Plomion.** 1998. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* 38:587-596.
- Cowan, I.R.** 1982. Regulation of water use in relation to carbon gain in higher plants. *Encyclopedia of plant physiology.* Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, 12B:489-613.
- Cowan, I.R.** 1986. Economics of carbon fixation in higher plants. *In: On the economy of plant form and fonction.* Ed. T.J. Givnish. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 133-170.
- Cruziat, P.** 1997. Les relations plante-eau, de la cellule à la plante entière. *In: L'eau dans l'espace rural.* Eds. C. Riou, R. Bonhomme, P. Chassin, A. Neveu et F. Papy. INRA – AUPELF – UREF, Paris, France, pp. 11-40.
- Cutler, J.M., D.W. Rains et R.S. Loomis.** 1977. The importance of cell size in the water relations of plants. *Physiol. Plantarum* 40:255-260.
- Dale, J.E.** 1988. The control of leaf expansion. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 39:267-295.
- DaMatta, F.M., A.R.M. Chaves, H.A. Pinheiro, C. Ducatti et M.E. Loureiro.** 2003. Drought tolerance of two field grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci.* 164:111-117.
- Davies, W.J. et J. Zhang.** 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 42:55-76.
- Dawar, S., T. Vani et G.S. Singhal.** 1998. Stimulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation by UV-B irradiation in thylakoid membranes of wheat. *Biol. Plantarum* 41:65-73.
- De Lillis, M. et A. Valletta.** 1985. Leaf anatomy of evergreen woody plants from Canary Islands and Mediterranean Basin. A comparison. *Ann. Bot. (Roma)* 43:209-225.
- DeBell, D.S.** 1990. *Populus trichocarpa* Torr. and Gray: black cottonwood. *In: Silvics of North America: Volume 2, Hardwoods Ed. U. Forest Service. D.C., Agric. Handbook, Washington, USA, pp. 570-576.*
- Demmig, B. et O. Björkman.** 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:171-184.
- Dickson, R.E.** 1986. Carbon fixation and distribution in young *Populus* trees. *In: Proc. Crown and canopy structure in relation to productivity.* Eds. T. Fujimori et D. Whitehead. Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki, Japon, pp. 409-426.

- Dixon, R.A. et N.L. Paiva.** 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Eckenwalder, J.E.** 1996. Systematics and evolution of *Populus*. *In: Biology of Populus and its implications for management and conservation* Eds. R.F. Stettler, H.D.J. Bradshaw, P.E. Heilman et T.M. Hinckley. NRC-CNRC, Ottawa, Canada, pp. 7-32.
- Ehdaie, B., D. Bernhart et J.G. Waines.** 1993. Genetic analysis of transpiration efficiency, carbon isotope discrimination, and growth characters in bread wheat. *In: Stable isotopes and plant carbon-water relations.* Eds. J.R. Ehleringer, A.E. Hall et G.D. Farquhar. Academic Press, New York, USA, pp. 419-434.
- Epron, D.** 1997. Effects of drought on photosynthesis and on the thermotolerance of photosystem II in seedlings of cedar (*Cedrus atlantica* and *C. libani*). *J. Exp. Bot.* 48:1835-1841.
- Erickson, R.O. et F.J. Michelini.** 1957. The plastochron index. *Am. J. Bot.* 44:297-305.
- Evans, G.C.** 1972. The quantitative analysis of plant growth. University of California Press, Berkeley, USA, 734 p.
- Evans, J.R. et H. Poorter.** 2001. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Environ.* 24:755-767.
- Farmer, R.E.** 1976. Relationships between genetic differences in yield of deciduous tree species and variation in canopy size, structure and duration. *In: Tree physiology and yield improvement.* Eds. M.G.R. Cannell et F.T. Last. Academic Press, New York, USA, pp. 119-137.
- Farquhar, G.D., J.R. Ehleringer et K.T. Hubick.** 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 40:503-537.
- Foyer, C.H. et J. Harbinson.** 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *In: Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants* Eds. C.H. Foyer and P.M. Mullineaux. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 1-42.
- Foyer, C., G. Noctor et J.F. Morot-Gaudry.** 1997. L'oxygène : bienfait ou danger pour les plantes ? *Biofutur* 169:27-29.
- Fu, J. et B. Huang.** 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 45:105-114.
- Garnier, E. et G. Laurent.** 1994. Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol.* 128:725-736.
- Gebre, G.M., M.R. Kuhns et J.R. Brandle.** 1994. Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiol.* 14:575-587.
- Gebre, G.M., T.J. Tschaplinski, G.A. Tuskan et D.E. Todd.** 1998. Clonal and seasonal differences in leaf osmotic potential and organic solutes of five hybrid poplar clones grown under field conditions. *Tree Physiol.* 18:645-652.
- Genty, B., J.M. Briantais et N.R. Baker.** 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990:87-92.
- Gifford, R.M. et C.L.D. Jenkins.** 1982. Prospects for applying knowledge of photosynthesis toward improving crop production. *In: Photosynthesis: vol. 2, development, carbon metabolism, and plant productivity.* Ed. Govindjee. Academic Press, New York, USA, pp. 419-457.

- Goryshina, T.K., L.N. Zabolina et E.G. Pruzhina.** 1979. Osobennosti assimilatsionnyh tkanei i plastidnogo apparata lista v raznyh chastyah krony u nekotoryh drevesnyh porod v lesostepnoi dubrave. (Characteristics of assimilatory tissues and plastid apparatus in leaves of various parts of crown in some tree species of the oakwood). Vestnik Leningradskogo Gosudarstvennogo Universiteta, ser. Biologiya 3:67-76.
- Greer, D.H., J.A. Berry et O. Björkman.** 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast protein synthesis during recovery. Planta 168:253-260.
- Groom, P.K. et B.B. Lamont.** 1997. Xerophytic implications of increased sclerophylly: interactions with water and light in *Hakea psilorrhyncha* seedlings. New Phytol. 136:231-237.
- Guehl, J.M., A. Nguyen-Queyrens, D. Loustau et A. Ferhi.** 1994. Genetic and environmental determinants of water-use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. In: EUROSILVA - Contribution to forest tree physiology. Eds. H.J. Sandermann et M. Bonnet-Masimbert. Dourdan, France, pp. 297-321.
- Gunn, S., J.F. Farrar, B.E. Collis et M. Nason.** 1999. Specific leaf area in barley: individual leaves versus whole plants. New Phytol. 143:45-51.
- Hagège, D., C. Kevers, P. Salabert et T. Gaspar.** 1992. Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated non-organogenic sugarbeet calluses. In Vitro Cell Dev.-Pl. 28:143-147.
- Halliwell, B. et J.M.C. Gutteridge.** 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Method Enzymol. 186:1-85.
- Hanson, H.C.** 1917. Leaf-structure as related to environment. Am. J. Bot. 4:533-560.
- Harbone, J.B.** 1991. The chemical basis of plant defense. In: Plant defenses against mammalian herbivory. Eds. R.T. Palo et C.T. Robbins. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 45-59.
- Hare, P.D., W.A. Cress et J. Van Staden.** 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ. 21:535-553.
- Harvey, H.P. et R. van den Driessche.** 1997. Nutrition, xylem cavitation and drought resistance in hybrid poplar. Tree Physiol. 17:647-654.
- Horton, H.R., L.A. Moran, R.S. Ochs, J.D. Rawn et K.G. Scrimgeour.** 1994. Principes de biochimie. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, Belgique, 720 p.
- Hsiao, T.C., E. Acevedo, E. Fereres et D.W. Henderson.** 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. Philos. T. Roy. Soc. B 273:479-500.
- Huante, P., E. Rincon et I. Acosta.** 1995. Nutrient availability and growth rate of 34 species from a tropical deciduous forest in Mexico. Funct. Ecol. 9:849-858.
- Huante, P. et E. Rincon.** 1998. Responses to light changes in tropical deciduous woody seedlings with contrasting growth rates. Oecologia 113:53-66.
- Hubick, K.T., G.D. Farquhar et R. Shorter.** 1986. Correlation between water use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) germplasm. Aust. J. Plant Physiol. 13:803-816.
- Ibrahim, L., M.F. Proe et A.D. Cameron.** 1997. Main effects of nitrogen supply and drought stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. Can. J. Forest Res. 27:1412-1419.

- Ikegawa, T., S. Mayama, H. Nakayashiki et H. Kato.** 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae* and its role in resistance of oat leaves to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant P.* 48:245-255.
- Irigoyen, J.J., D.W. Emerich et M. Sánchez-Díaz.** 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plantarum* 84:55-60.
- Jay-Allemand, C., P. Capelli, B. Bruant et D. Cornu.** 1988. Variabilité clonale in vitro de noyers hybrides (*Juglans nigra* x *Juglans regia*). Relations avec le contenu polyphénolique des pousses. *In: Agrimed, deuxième colloque noyer-noisetier, Bordeaux, France, pp. 79-87.*
- Jones, H.G.** 1985. Adaptive significance of leaf development and structural responses to environment and structural responses to environment. *In: Society for experimental biology seminar series, 27: control of leaf growth.* Eds. N.R. Baker, W.J. Davies et C.K. Ong. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Jones, H.G.** 1993. Drought tolerance and water-use efficiency. *In: Water deficit: plant responses from cell to community.* Eds. J.A.C. Smith et H. Griffiths, Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 193-201.
- Khalil, A.A.M. et J. Grace.** 1992. Acclimation to drought in *Acer pseudoplatanus* L. (Sycamore) seedlings. *J. Exp. Bot.* 43:1591-1602.
- Kimani, P.M., A. Benzioni et M. Ventura.** 1994. Genetic variation in pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) in response to successive cycles of water stress. *Plant Soil* 158:193-201.
- Körner, C., M. Neumayer, S. Pelaez Menendez-Riedl et A. Smeets-Scheel.** 1989. Functional morphology of mountain plants. *Flora* 182:353-383.
- Krause, D. et J. Kummerow.** 1977. Xeromorphic structure and soil moisture in the chaparral. *Acta Oecol.* 12:133-148.
- Krause, G.H. et E. Weis.** 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basis. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 42:313-349.
- Kurepa, J., D. Hérouart, M. Van Montagu et D. Inzé.** 1997. Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress and hormonal treatments. *Plant Cell Physiol.* 38:463-470.
- Lamaze, T., D. Tusch, X. Sarda, C. Grignon, D. Depigny-This et P. Monneveux.** 1996. Résistance des plantes à la sécheresse : mécanismes physiologiques. Actes des 5^{èmes} journées du groupe de travail relations insectes-plantes, Montpellier, France, pp. 9-17.
- Lambers, H.** 1998. Epilogue: Research on the control of plant growth – Where do we go next? *In: Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 567-581.
- Lambers, H. et H. Poorter.** 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *In: Advances in ecological research.* Eds. M. Bergon et A.H. Fitter. Academic Press, London, UK, pp. 187-261.
- Larson, A.R.** 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27:969-978.
- Larson, P.R. et J.G. Isebrands.** 1971. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood. *Can. J. Forest Res.* 1:1-11.
- Larson, P.R. et J.G. Isebrands.** 1972. The relation between leaf production and wood weight in first-year root sprouts of two *Populus* clones. *Can. J. Forest Res.* 2:98-104.

- Lascano, H.R., L.D. Gómez, L.M. Casano et V.S. Trippi.** 1998. Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant Physiol. Bioch.* 36:321-329.
- Lauteri, M., M.C. Scartazza, M.C. Guido et E. Brugnoli.** 1997. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Funct. Ecol.* 11:675-683.
- Laval-Martin, D. et P. Mazliak.** 1995. Nutrition et métabolisme. Ed. Hermann, Éditeurs des sciences et des arts, Paris, France, 539 p.
- Le Roux, X., S. Grand, E. Dreyer et F.-A. Daudet.** 1999. Parameterization and testing of a biochemically based photosynthesis model for walnut (*Juglans regia*) trees and seedlings. *Tree Physiol.* 19:481-492.
- Liu, Z. et D.I. Dickmann.** 1993. Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. II. Gas exchange and water relations. *Can. J. Bot.* 71:927-938.
- Liu, Z. et D.I. Dickmann.** 1996. Effects of water and nitrogen interaction on net photosynthesis, stomatal conductance, and water-use efficiency in two hybrid poplar clones. *Physiol. Plantarum* 97:507-512.
- Lloyd, J., J.P. Syvertsen, P.E. Kriedemann et G.D. Farquhar.** 1992. Low conductances for CO₂ diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant Cell Environ.* 15:873-889.
- Logan, B.A. et R.K. Monson.** 1999. Thermotolerance of leaf disks from four isoprene-emitting species is not enhanced by exposure to exogenous isoprene. *Plant Physiol.* 120:821-825.
- Loomis, R.S. et W.A. Williams.** 1963. Maximum crop productivity: an estimate. *Crop Sci.* 3:67-72.
- Loveys, B.R., I. Scheurwater, T.L. Pons, A.H. Fitter et O.K. Atkin.** 2002. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow-growing plant species. *Plant Cell Environ.* 25:975-987.
- Maisenbach, H.-P.** 1969. Selbst gemacht, Leicht gemacht, Gut gemacht (traduction française par Sornin-Lassche). Ed. Dessin et Tolra, Paris, France, 120 p.
- Marçais, B., F. Dupuis et M.L. Desprez-Loustau.** 1993. Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra*) to *Phytophthora cinnamomi*. *Eur. J. Forest Pathol.* 23:295-305.
- Marron, N., D. Delay, J.-M. Petit, E. Dreyer, G. Kahlem, F.M. Delmotte et F. Brignolas.** 2002. Physiological traits of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiol.* 22:849-858.
- Marron, N., E. Dreyer, E. Boudouresque, D. Delay, J.-M. Petit, F.M. Delmotte et F. Brignolas.** 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiol.* 23:in press.
- Martin, B. et Y.R. Thorstenson.** 1988. Stable carbon isotope composition (d¹³C), water use efficiency, and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennellii*, and the F₁ hybrid. *Plant Physiol.* 88:213-217.
- Martinez, C.A., M.E. Loureiro, M.A. Oliva et M. Maestri.** 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci.* 160:505-515.
- Mathews, C.K. et K.E. van Holde.** 1996. Biochemistry, second edition. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, USA, 1159 p.

- Matin, M.A., J.H. Brown et H. Ferguson.** 1989. Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agron. J.* 81:100-105.
- Maxwell, K. et G.N. Johnson.** 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51:659-668.
- McKenna, M.F. et B. Shipley.** 1999. Interacting determinants of interspecific relative growth: empirical patterns and a theoretical explanation. *Ecoscience* 6:286-296.
- McKersie, B.D.** 1991. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. *In: Active oxygen / oxidative stress and plant metabolism.* Eds. E.J. Pell et K.L. Steffen. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp. 107-118.
- McKey, D.** 1979. The distribution of secondary compounds within plants. *In: Herbivores – Their interactions with secondary plant metabolites.* Eds. G.A. Rosenthal et D.H. Janzen. Academic Press, New York, USA, pp. 56-133.
- Meijkamp, B., R. Aerts, J. van de Staaij, M. Tosserams, W.H.O. Ernst et J. Rozema.** 1999. Effects of UV-B on secondary metabolites in plants. *In: Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems.* Ed. J. Rozema. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 71-99.
- Metcalfe, J.C., W.J. Davies et J.S. Pereira.** 1990. Leaf growth of *Eucalyptus globulus* seedlings under water deficit. *Tree Physiol.* 6:221-227.
- Meyer, G.A. et M.E. Montgomery.** 1987. Relationships between leaf age and the food quality of cottonwood foliage for the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Oecologia* 72:527-532.
- Miller, H.E.** 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45:91.
- Mittler, R. et B.A. Zilinskas.** 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5:397-405.
- Monsigny, M., C. Petit et A.C. Roche.** 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* 175:525-530.
- Nash, D., M. Miyao et N. Murata.** 1985. Heat inactivation of oxygen evolution in Photosystem II particles and its acceleration by chloride depletion and exogenous manganese. *Biochim. Biophys. Acta* 807:127-133.
- Nautiyal, P.C., N.R. Rachaputi et Y.C. Joshi.** 2002. Moisture-deficit-induced changes in leaf-water content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific leaf area. *Field Crop Res.* 74:67-79.
- Nelson, C.J.** 1988. Genetic association between photosynthetic characteristics and yield: review of evidence. *Plant Physiol. Bioch.* 26:543-554.
- Nelson, N.D. et J.G. Isebrands.** 1983. Late-season photosynthesis and photosynthetate distribution in an intensively cultured *Populus nigra x laurifolia* clone. *Photosynthetica* 17:537-549.
- Nguyen, A. et A. Lamant.** 1989. Effect of water stress on potassium distribution in young seedlings of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ann. Sci. Forest.* 46:379-383.
- Nguyen-Queyrens, A., A. Ferhi, D. Loustau et J.M. Guehl.** 1998. Within-ring $\delta^{13}\text{C}$ spatial variability and interannual variations in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Can. J. Forest Res.* 28:766-773.
- Niinemets, Ü.** 1999. Components of leaf dry mass per area - thickness and density - alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytol.* 144:35-57.

- Niinemets, Ü.** 2001. Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology* 82:453-469.
- Niinemets, Ü. et O. Kull.** 1998. Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity. *Tree Physiol.* 18:467-479.
- Niinemets, Ü., O. Kull et J.D. Tenhunen.** 1998. An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiol.* 18:681-696.
- Nitsch, J.P. et C. Nitsch.** 1961. Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. bot. Fr.* 108:349-362.
- Nobel, P.S.** 1991. *Physicochemical and environmental plant physiology.* Academic Press, San Diego, USA, 635p.
- Ögren, E.** 1988. Photoinhibition of photosynthesis in willow leaves under field conditions. *Planta* 175:229-236.
- Paillassa, E.** 1998. Fiche technique clone de peuplier : Ghoy. *Forêt-entreprise.* 122:21-22.
- Paillassa, E.** 1998. Fiche technique clone de peuplier : I214, Dorskamp. *Forêt-entreprise.* 123:19-22.
- Paillassa, E.** 1999. Fiche technique clone de peuplier : I45 51. *Forêt-entreprise.* 125:46-47.
- Paillassa, E.** 1999. Fiche technique clone de peuplier : Flevo. *Forêt-entreprise.* 130:53-54.
- Paillassa, E.** 2001. Où trouver les cultivars de peuplier pour les plantations 2001-2002 ? *Forêt-entreprise.* 141:5-9.
- Parkhurst, D.F.** 1994. Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytol.* 126:449-479.
- Passioura, J.B. et S.C. Fry.** 1992. Turgor and cell expansion : Beyond the Lockhart equation. *Aust. J. Plant Physiol.* 19:565-576.
- Pelah, D., W. Wang, A. Altman, O. Shoseyov et D. Bartels.** 1997. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol. Plantarum* 99:153-159.
- Perl-Treves, R. et E. Galun.** 1991. The tomato Cu, Zn-superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Mol. Biol.* 17:745-760.
- Pieters, G.A.** 1974. The growth of sun and shade leaves of *Populus euramericana* 'Robusta' in relation to age, light intensity and temperature. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool de Wageningen, Pays-Bas, Thèse,* 107 p.
- Pinon, J. et A. Valadon.** 1997. Comportement des cultivars de peupliers commercialisables dans l'union européenne vis-à-vis de quelques parasites majeurs. *Ann. Sci. Forest.* 54:19-38.
- Poorter, H. et R. De Jong.** 1999. A comparaison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol.* 143:163-176.
- Poorter, H. et E. Garnier.** 1999. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate. *In: Handbook of functional plant ecology.* Eds. F. Pugnaire et X. Valladares. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 81-120.

- Poorter, H. et A. Van der Werf.** 1998. Is inherent variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species. *In: Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 309-336.
- Poorter, L.** 1999. Growth responses of fifteen rain forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Funct. Ecol.* 13:396-410.
- Quick, W.P.** 1998. Transgenic plants as a tool to analyse the mechanistic basis for variation in plant growth. *In: Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 199-219.
- Rawson, H.M., P.A. Gardner et M.J. Long.** 1987. Sources of variation in specific leaf area in wheat grown at high temperature. *Aust. J. Plant Physiol.* 14:287-298.
- Ray, I.M., M.S. Townsend, C.M. Muncy et J.A. Henning.** 1999. Heritabilities of water-use efficiency traits and correlations with agronomic traits in water-stressed alfalfa. *Crop Sci.* 39:494-498.
- Reich, B.R.** 1983. Effects of low concentrations of O₃ on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves. *Plant Physiol.* 73:291-296.
- Reich, P.B.** 1998. Variation among plant species in leaf turnover rates and associated traits: implications for growth at all life stages. *In: Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 467-487.
- Reich, P.B., D.S. Ellsworth et M.B. Walters.** 1998. Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Funct. Ecol.* 12:948-958.
- Reich, P.B., D.S. Ellsworth, M.B. Walters, J.M. Vose, C. Gresham, J.C. Volin et W.D. Bowman.** 1999. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* 80:1955-1969.
- Reich, P.B., M.B. Walters et D.S. Ellsworth.** 1992. Leaf life-span in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecol. Monogr.* 62:365-392.
- Ribéreau-Gayon, P.** 1968. Les composés phénoliques des végétaux Ed. Dunod, Paris, France.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley et J.B. Pridham.** 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* 22:375-383.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller et G. Paganga.** 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2:152-159.
- Ridge, C.R., T.M. Hinckley, R.F. Stettler et E. Van Volkenburgh.** 1986. Leaf growth characteristics of fast growing poplar hybrids *Populus trichocarpa* x *P. deltoides*. *Tree Physiol.* 1:209-216.
- Robison, D.J. et K.F. Raffa.** 1998. Productivity, drought tolerance and pest status of hybrid *Populus*: tree improvement and silvicultural implications. *Biomass Bioenerg.* 14:1-20.
- Roden, J., E. van Valkenburge et T.M. Hinckley.** 1990. Cellular basis for limitation of poplar leaf growth by water deficit. *Tree Physiol.* 6:211-220.
- Ryser, P.** 1996. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: a comparison of five ecologically contrasting grasses. *Funct. Ecol.* 10:717-723.

- Ryser, P. et S. Wahl.** 2001. Interspecific variation in RGR and the underlying traits among 24 grass species grown in full daylight. *Plant Biol.* 3:426-436.
- Saugier, B.** 1983. Plant growth and its limitations in crop and natural communities. *In: Disturbance and ecosystems, Components of response, Ecological Studies* 44. Eds. H.A. Mooney et M. Godron. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, pp. 159-174.
- Saverimuttu, T. et M. Westoby.** 1996. Components of variation in seedling potential relative growth rate: phylogenetically independent contrasts. *Oecologia* 105:281-285.
- Scalbert, A.** 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *In: Plant polyphenols, synthesis, properties, significance.* Eds. R.W. Hemingway et P.E. Laks. Plenum Publ. Corp., New York, USA, pp. 259-280.
- Schulz, S.** 1984. Anatomisch-morphologische Untersuchungen an Blättern immergrüner Arten der mediterranen Hartlaubformation. Universität Würzburg.
- Schumaker, M.A., J.H. Bassman, R. Robberecht et G.K. Rademaker.** 1997. Growth, leaf anatomy, and physiology of *Populus* clones in response to solar ultraviolet-B radiation. *Tree Physiol.* 17:617-626.
- Searles, P.S., S.D. Flint et M.M. Caldwell.** 2001. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. *Oecologia* 127:1-10.
- Sharma, V. et N. Vaid.** 1997. Age-related changes in indolic and phenolic compounds in leaves from enforced *Salix* shoot bud. *Indian J. Plant Physiol.* 2:207-210.
- Shipley, B.** 2002. Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Funct. Ecol.* 16:682-689.
- Sibout, R. et G. Guerrier.** 1998. Solute incompatibility with glutamine synthetase in water-stressed *Populus nigra*. *Environ. Exp. Bot.* 40:173-178.
- Sicher, R.C., D.F. Kramer et W.G. Harris.** 1984. Diurnal carbohydrate metabolism of barley primary leaves. *Plant Physiol.* 76:165-169.
- Smirnoff, N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27-58.
- Socias, F.X., A. Pol, F. Aguilo, J. Vadell et H. Medrano.** 1997. Effects of rapidly and gradually water stress on plant response in subterranean clover leaves. *J. Plant Physiol.* 150:212-219.
- Soulères, G.** 1992. Les milieux de la populiculture Ed. IDF, Paris, France, 310 p.
- Stitt, M. et D. Schulze.** 1994. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant Cell Environ.* 17:465-487.
- Sun, Z.J., N.J. Livingston, R.D. Guy et G.J. Ethier.** 1996. Stable carbon isotopes as indicators of increased water use efficiency and productivity in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedlings. *Plant Cell Environ.* 19:887-894.
- Sundby, C.A., P. Melis, P. Mäenpää et B. Andersson.** 1986. Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 851:475-483.
- Syvertsen, J.P., J. Lloyd, C. McConchie, P.E. Kriedemann et G.D. Farquhar.** 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environ.* 18:149-157.
- Tadaki, Y. et N. Karizumi.** 1977. Forest biomass. *In: Primary productivity of Japanese forests. Productivity of terrestrial communities.* JIBP Synthesis Shidei, T. et T. Kira 16:39-64.

- Tamagnone, L., A. Merida, N. Stacey, K. Plaskitt, A. Parr, C.F. Chang, D. Lynn, J.M. Dow, K. Roberts et C. Martin.** 1998. Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 10:1801-1816.
- Taub, D.R.** 2002. Analysis of interspecific variation in plant growth responses to nitrogen. *Can. J. Bot.* 80:34-41.
- Terashima, I. et K. Hirosaka.** 1995. Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 18:1111-1128.
- Terrasson, D.** 1988. Populiculture: conditions d'utilisation de deux cultivars euraméricains "Luisa Avanzo" et "Cima" Ed. I. CEMAGREF. 6 p.
- Thivolle-Cazat, A.** 2002. Disponibilité en bois de peuplier en France de 2002 à 2020. Rapport AFOCEL, Commission Nationale du Peuplier, Paris, France, 11 juin.
- Thompson, L.K., R. Blaylock, J.M. Sturtevant et G.W. Brudvig.** 1989. Molecular basis of heat denaturation of photosystem II. *Biochemistry* 28:6686-6695.
- Thumma, B.R., B.P. Naidu, A. Chandra, D.F. Cameron, L.M. Bahnisch et C. Liu.** 2001. Identification of causal relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. *J. Exp. Bot.* 52:203-214.
- Torel, J., J. Cillard et P. Cillard.** 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25:383-385.
- Trabaud, L. et M. Méthy.** 1992. Effets de températures sub-latérales sur l'appareil photosynthétique du chêne vert (*Quercus ilex* L). *Ann. Sci. Forest.* 49:637-649.
- Treutter, D.** 1989. Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr. A* 467:185-193.
- Treutter, D., C. Santos-Buelga, M. Gutmann et H. Kolodziej.** 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr. A* 667:290-297.
- Tschaplinski, T.J., G.A. Tuskan, G.M. Gebre et D.E. Todd.** 1998. Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiol.* 18:653-658.
- Tschaplinski, T.J., G.A. Tuskan et C.A. Gunderson.** 1994. Water-stress tolerance of black and eastern cottonwood clones and four hybrid progeny. I. Growth, water relations and gas exchange. *Can. J. Forest Res.* 24:364-371.
- Turgeon, R. et J.A. Webb.** 1975. Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo*: carbon economy. *Planta* 123:53-62.
- Van Splunder, I., L.A.C.J. Voesenek, H. Coops, X.J.A. De Vries et C.W.P.M. Blom.** 1996. Morphological responses of seedlings of four species of *Salicaceae* to drought. *Can. J. Bot.* 74:1988-1995.
- Veneklaas, E.J. et L. Poorter.** 1998. Growth and carbon partitioning of tropical tree seedlings in contrasting light environments. *In: Inherent variation in plant growth; Physiological mechanisms and ecological consequences.* Eds. H. Lambers, H. Poorter et M.M.I. Van Vuuren. Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas, pp. 337-361.

- Veneklaas, E.J., M.P.R.M. Santos Silva et F. den Ouden.** 2002. Determinants of growth rate in *Ficus benjamina* L. compared to related faster-growing woody and herbaceous species. *Sci. Hortic.-Amsterdam* 93:75-84.
- Viard, M.** 1999. Un demi-siècle de populiculture en France (1^{ère} partie). *Forêt Privée*. 245.
- Viard, M.** 1999. Un demi-siècle de populiculture en France (2^{ème} partie). *Forêt Privée*. 246.
- Viard, M. et O. Fugalli.** 1997. History of the international poplar commission (IPC) – 1947 – 1997. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italie, 17 octobre.
- Virgona, J.M. et G.D. Farquhar.** 1996. Genotypic variation in relative growth rate and carbon isotope discrimination in sunflower is related to photosynthetic capacity. *Aust. J. Plant Physiol.* 23:227-236.
- Vitória, A.P., P.J. Lea et R.A. Azevedo.** 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57:701-710.
- Vitousek, P.M., C.B. Field et P.A. Matson.** 1990. Variation in foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: a case of internal resistance? *Oecologia* 84:362-370.
- von Caemmerer, S.** 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. *In: Techniques in plant sciences*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australie, 165 p.
- von Caemmerer, S. et G.D. Farquhar.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153:376-387.
- Warren, J.M., J.H. Bassman, D.S. Mattinson et S. Eigenbrode.** 2003. Ultraviolet-B radiation alters phenolic salicylate and flavonoid composition of *Populus trichocarpa* leaves. *Tree Physiol.* 23:527-535.
- Watson, D.J.** 1952. The physiological basis of variation in yield. *Adv. Agron.* 4:101-145.
- West, C., G.E. Briggs et F. Kidd.** 1920. Methods and significant relations in the quantitative analysis of plant growth. *New Phytol.* 19:200-207.
- Wilson, K.B., D.D. Baldocchi et P.J. Hanson.** 2000. Quantifying stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation resulting from leaf aging and drought in mature deciduous tree species. *Tree Physiol.* 20:787-797.
- Witkowski, E.T.F. et B.B. Lamont.** 1991. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* 88:486-493.
- Wright, G.C., K.T. Hubick et G.D. Farquhar.** 1988. Discrimination in carbon isotopes of leaves correlates with water-use efficiency of field grown peanut cultivars. *Aust. J. Plant Physiol.* 15:815-825.
- Wright, G.C., K.T. Hubick, G.D. Farquhar et R.C. Nageswara Rao.** 1993. Genetic and environmental variation in transpiration efficiency and its correlation with carbon isotope discrimination and specific leaf area in peanut. *In: Stable isotopes and plant carbon – water relations*. Eds. J.R. Ehleringer, A.E. Hall et G.D. Farquhar. Academic Press, New York, USA, pp. 247-267.
- Wright, G.C., R.C. Nageswara Rao et G.D. Farquhar.** 1994. Water-use efficiency and carbon isotope in peanuts under water deficit conditions. *Crop Sci.* 34:92-97.
- Wullschleger, S.D.** 1993. Biochemical limitations to carbon assimilation in C_3 plants - a retrospective analysis of the A/C_i curves from 109 species. *J. Exp. Bot.* 44:907-920.
- Yamasaki, H., Y. Sakihama et N. Ikehara.** 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H_2O_2 . *Plant Physiol.* 115:1405-1412.

- Ye, Z., R. Rodriguez, A. Tran, H. Hoang, D. de los Santos, S. Brown et R.L. Vellanoweth.** 2000. The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 158:115-127.
- Zacharisen, M.H., M.A. Brick, A.G. Fisher, J.B. Ogg et J.R. Ehleringer.** 1999. Relationship between productivity and carbon isotope discrimination among dry bean lines and F2 progeny. *Euphytica* 105:239-250.
- Zelawski, W. et R.B. Walker.** 1976. Photosynthesis, respiration, and dry matter production. *In: Modern methods of forest genetics.* Ed. J.P. Miksche. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 89-119.
- Zhang, J.W., Z. Feng, B.M. Cregg et C.M. Schumann.** 1997. Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiol.* 17:461-466.
- Zsuffa, L.** 1975. A summary review of interspecific breeding in the genus *Populus* L. *In: Proceedings of the 14th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association, Part II, Fredericton, Canada, pp. 107-123.*

Annexe 1.1

Traits physiologiques de deux clones de *Populus x euramericana*, Luisa Avanzo et Dorskamp, durant un cycle sécheresse / ré-arrosage

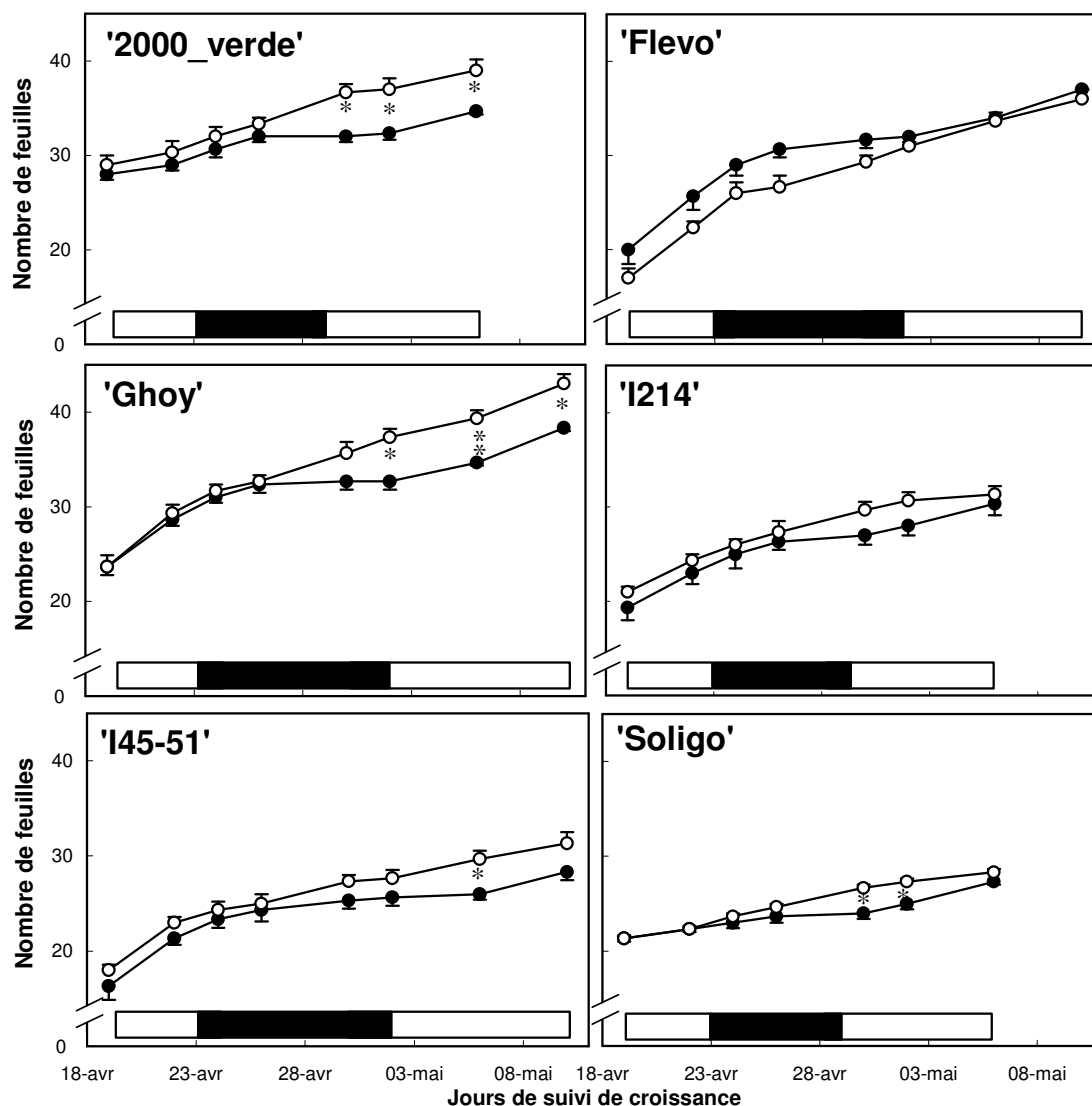
Nicolas Marron, Didier Delay, Jean-Michel Petit, Erwin Dreyer, Guy Kahlem, Francis M. Delmotte and Franck Brignolas

Tree Physiology, 22:849-858

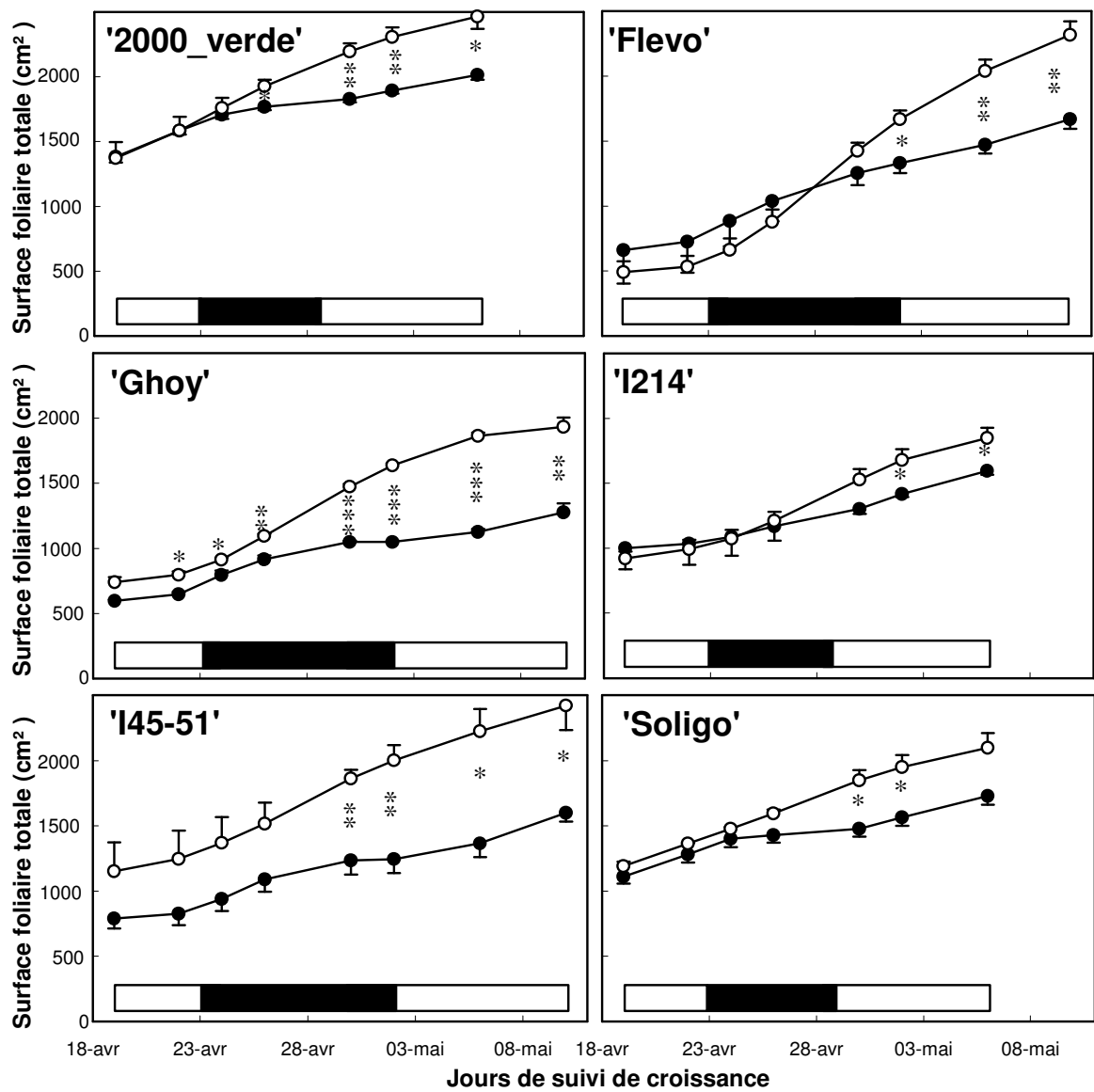
Résumé

Les réponses à la sécheresse puis au ré-arrosage des boutures élevées en serre de deux clones de *Populus x euramericana* (Dode) Guinier, Luisa Avanzo et Dorskamp, ont été comparées. La surface foliaire totale, les vitesses d'apparition et d'étalement des feuilles et la conductance stomatique ont été évaluées périodiquement pendant les 29 jours de sécheresse puis les 16 jours suivants le ré-arrosage. La teneur en eau du sol et le potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{wp}) ont été mesurés les jours 29 et 45. Aux mêmes dates, la teneur relative en eau des feuilles (RWC), la surface massique (SLA), les teneurs en azote, en chlorophylles, en oses solubles, en phénols totaux et en flavanols ainsi que le pouvoir antioxydant ont été déterminés pour les feuilles prélevées de la base vers l'apex des boutures.

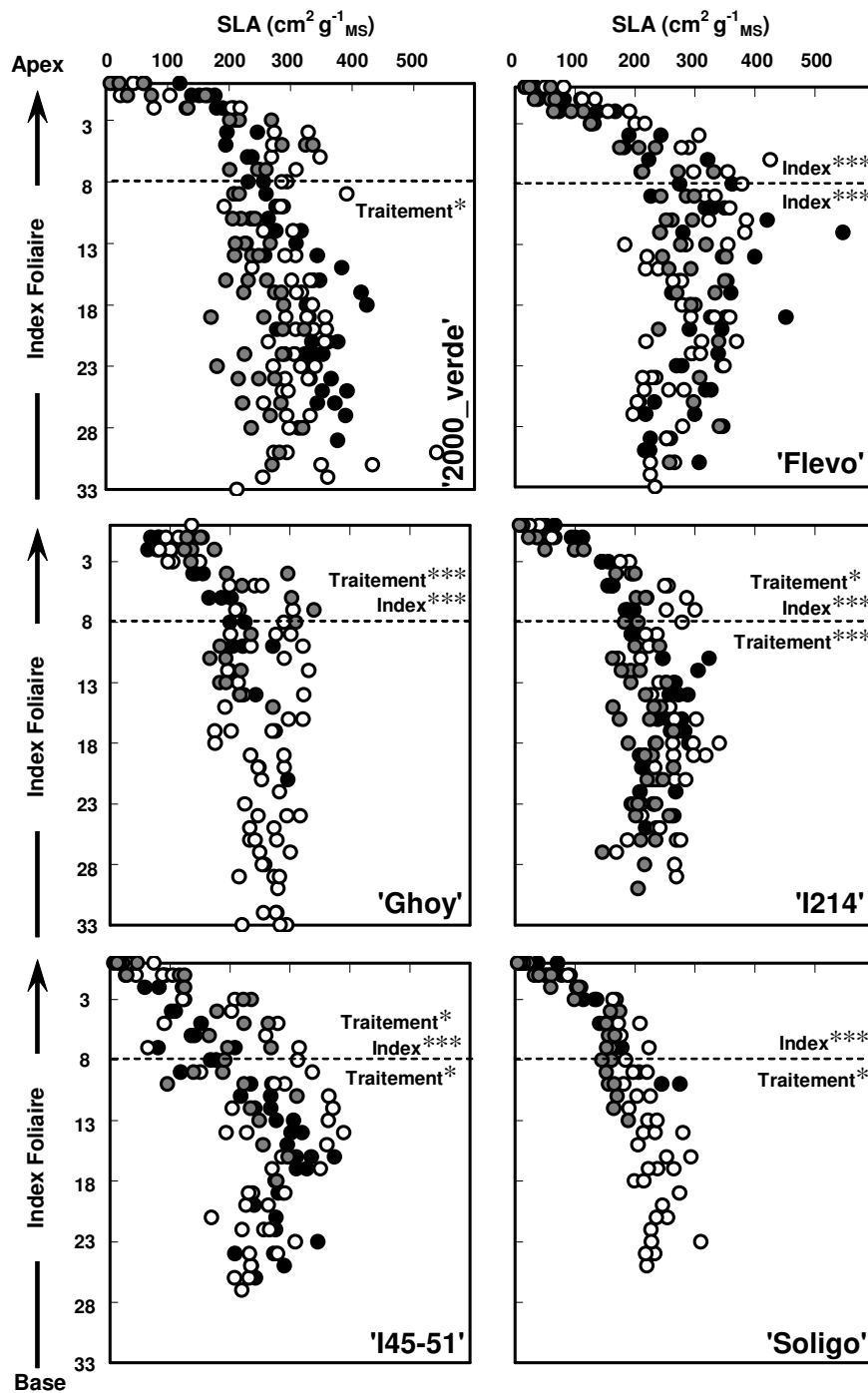
Les feuilles des boutures de Luisa Avanzo croissaient plus rapidement que celles de Dorskamp et avaient des SLA supérieures mais présentaient de plus faibles concentrations en azote, en chlorophylles et en oses solubles et aussi un pouvoir antioxydant par unité de surface moins important. Vingt neuf jours après l'initiation de la sécheresse, les deux clones avaient fermé leurs stomates, réduit leur croissance foliaire et subi une chute de Ψ_{wp} et de RWC. Cependant, les clones réagissaient différemment au déficit hydrique. Comparé à Dorskamp, Luisa Avanzo fermait ses stomates plus tôt et maintenait un Ψ_{wp} plus élevé, mais présentait des RWC et des teneurs en oses plus faibles. Le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques diminuait en réponse à la sécheresse uniquement dans le cas de Luisa Avanzo. La physiologie des feuilles de Luisa Avanzo et sa modulation par le stress hydrique dépendaient de l'âge de ces feuilles.



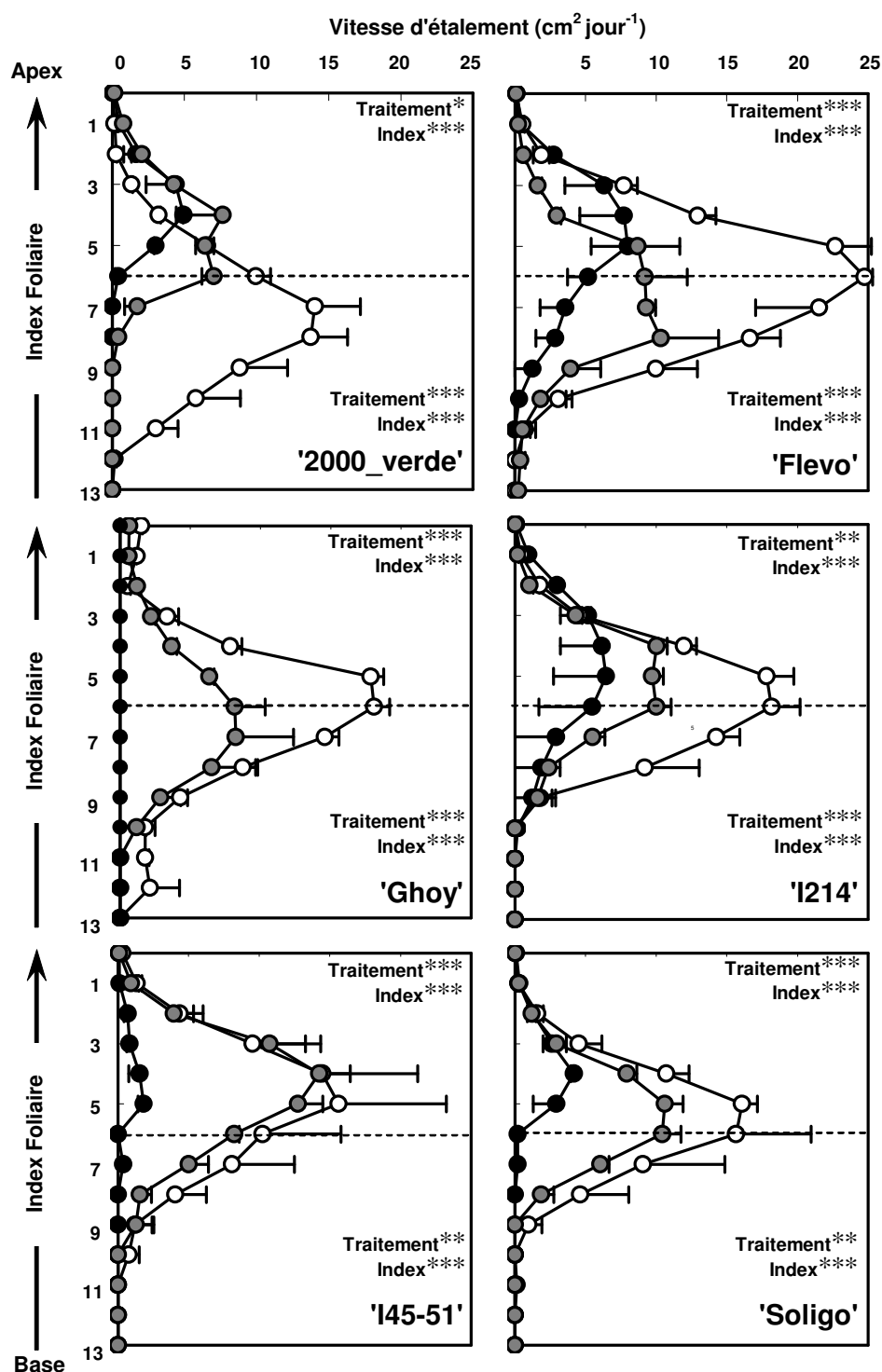
Annexe 3.1. Évolution du nombre de feuilles en fonction du temps : boutures témoin (blanc) et stressées (noir) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 boutures. Les périodes d'alimentation optimale en eau et d'arrêt d'arrosage sont respectivement représentées par les barres blanches et noires. Les différences significatives entre traitements sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$ et (**) pour $P \leq 0,01$.



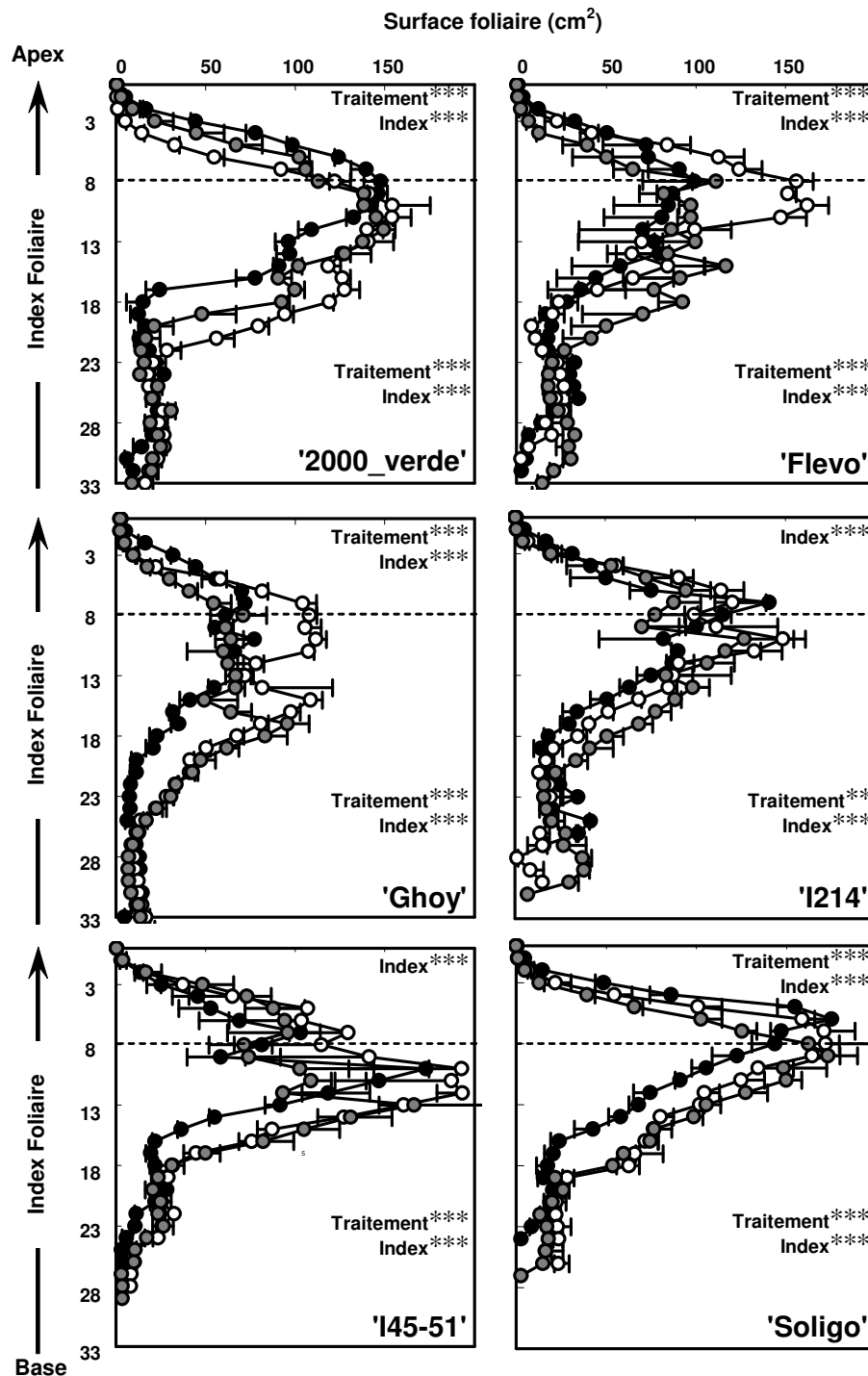
Annexe 3.2. Évolution de la surface foliaire totale en fonction du temps : boutures témoin (blanc) et stressées (noir) des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Chaque point correspond à la moyenne (\pm erreur standard) de 3 boutures. Les périodes d'alimentation optimale en eau et d'arrêt d'arrosage sont respectivement représentées par les barres blanches et noires. Les différences significatives entre traitements sont indiquées par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$.



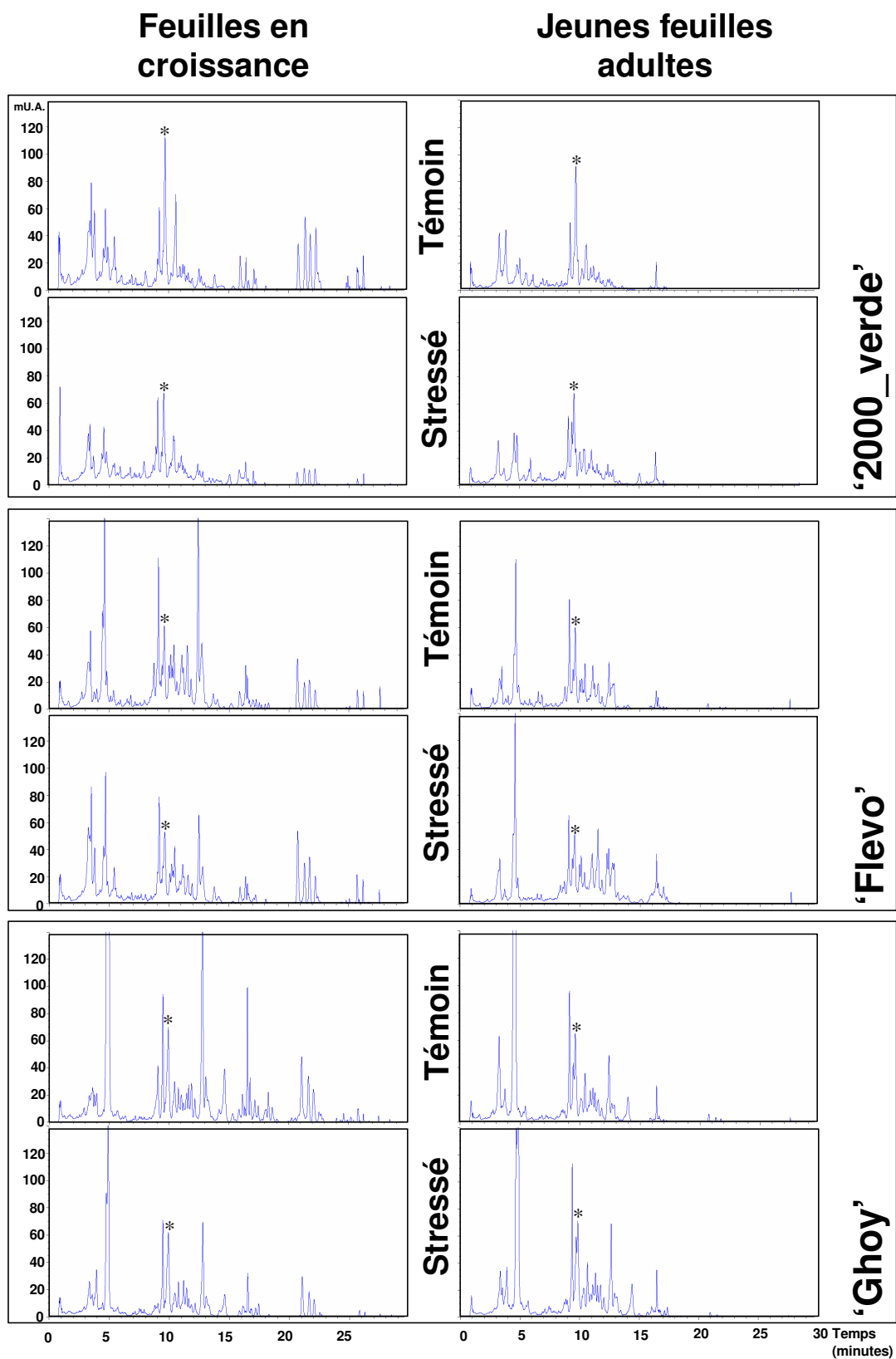
Annexe 3.3. Surface massique (SLA) des feuilles de boutures témoin (blanc), stressées (noir), au plus fort du stress (3 jours après la chute de conductance), et ré-arrosées (gris), lors de la réouverture des stomates consécutive au ré-arrosage, des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' en fonction de l'index foliaire. Pour chaque clone et chaque traitement, 3 boutures ont été utilisées. Pour chaque clone, la significativité des effets « index » et « traitement » est indiquée par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les tests ont été effectués en dissociant les index inférieurs à 8 des index supérieurs à 8.



Annexe 3.4. Vitesse d'étalement des feuilles de boutures témoin (blanc), stressées (noir), et ré-arrosées (gris), lors de la réouverture des stomates consécutive au ré-arrosage, des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' en fonction de leurs index foliaires. Les points correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de trois valeurs. Pour chaque clone, la significativité des effets « index » et « traitement » est indiquée par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les tests ont été effectués en dissociant les index inférieurs à 6 des index supérieurs à 6.



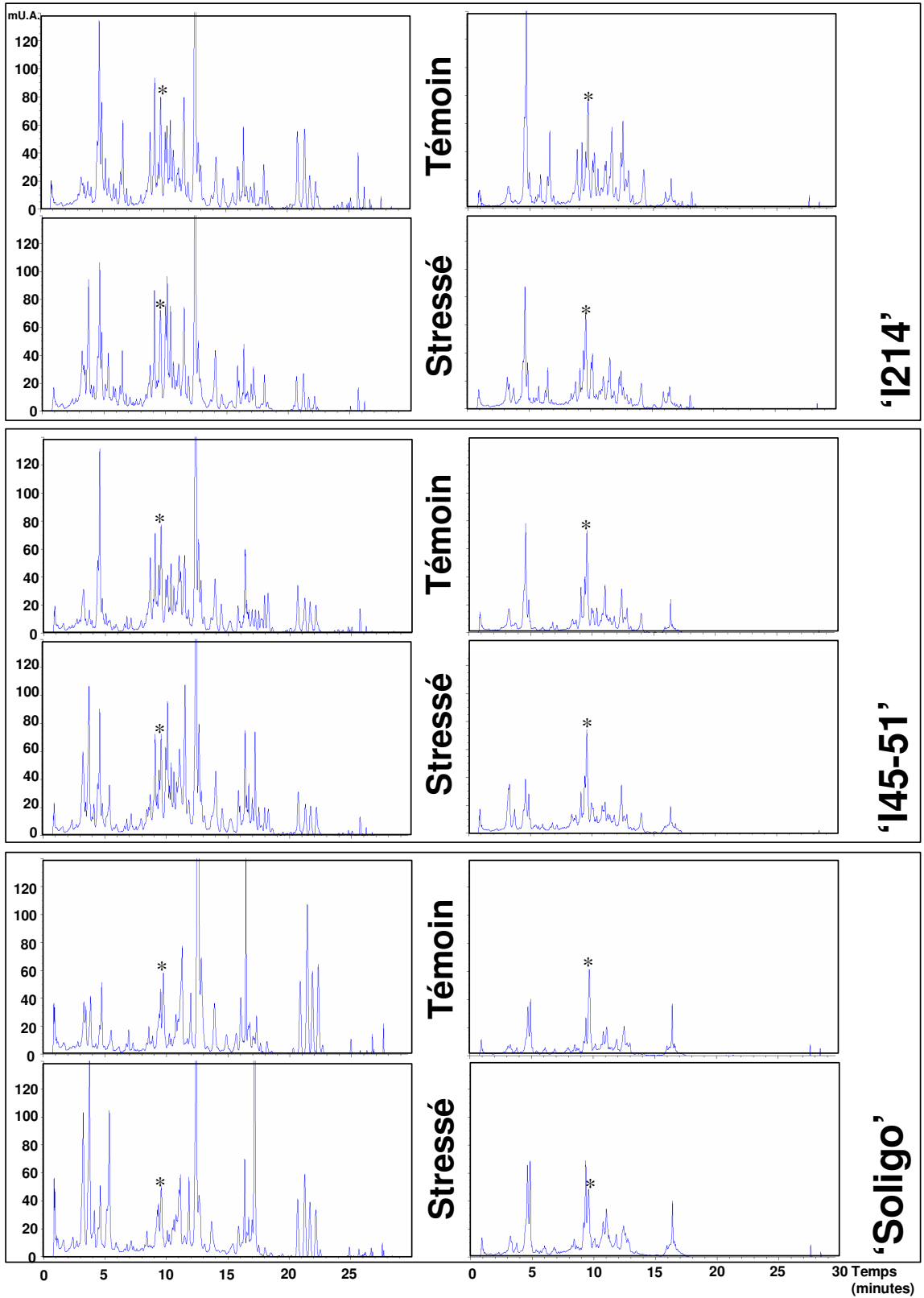
Annexe 3.5. Surface des feuilles de boutures témoin (blanc), stressées (noir), et ré-arrosées (gris), lors de la réouverture des stomates consécutive au ré-arrosage, des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo' en fonction de leurs index foliaires. Les points correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de trois valeurs. Pour chaque clone, la significativité des effets « index » et « traitement » est indiquée par des astérisques : (*) pour $P \leq 0,05$, (**) pour $P \leq 0,01$ et (***) pour $P \leq 0,001$. Les tests ont été effectués en dissociant les index inférieurs à 8 des index supérieurs à 8.



Annexe 3.6. Profils d'élution (HPLC – RP-18e), suivis par absorption à 280 nm, d'extraits de feuilles en croissance et de jeunes feuilles adultes issues de boutures témoin et stressées des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo'. Le pic du standard interne (coumarine) est indiqué par un astérisque (*).

**Feuilles en
croissance**

**Jeunes feuilles
adultes**



Annexe 3.7. Biomasse totale et coefficients d'allocation de biomasse à la tige ligneuse, à la tige verte, aux racines et au feuillage des boutures témoin et stressées des clones '2000_verde', 'Flevo', 'Ghoy', 'I214', 'I45-51' et 'Soligo', en fin d'expérience. Les valeurs correspondent aux moyennes (\pm erreur standard) de 3 mesures.

Clone	Traitement	Biomasse totale	Coefficients d'allocation			
			Bouture	Tige	Racines	Feuillage
'2000_verde'	Témoin	27,8 \pm 2,0	0,31 \pm 0,03	0,19 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,44 \pm 0,04
	Stressé	21,2 \pm 1,4	0,36 \pm 0,02	0,19 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,39 \pm 0,02
'Flevo'	Témoin	24,1 \pm 0,4	0,46 \pm 0,04	0,13 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02
	Stressé	20,0 \pm 1,7	0,56 \pm 0,03	0,13 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02
'Ghoy'	Témoin	22,8 \pm 2,8	0,35 \pm 0,03	0,19 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01
	Stressé	15,5 \pm 2,3	0,63 \pm 0,04	0,16 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,16 \pm 0,05
'I214'	Témoin	23,5 \pm 0,9	0,33 \pm 0,03	0,17 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,38 \pm 0,04
	Stressé	24,2 \pm 2,6	0,41 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,32 \pm 0,01
'I45-51'	Témoin	32,1 \pm 2,9	0,38 \pm 0,02	0,13 \pm 0,00	0,10 \pm 0,01	0,40 \pm 0,02
	Stressé	15,9 \pm 2,0	0,53 \pm 0,05	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,28 \pm 0,04
'Soligo'	Témoin	37,9 \pm 2,7	0,44 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,38 \pm 0,02
	Stressé	24,4 \pm 0,5	0,53 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,30 \pm 0,03

Écophysiologie des peupliers euraméricains en réponse à la sécheresse

Le peuplier est une essence qui présente d'importants besoins en eau. La peupleraie française est composée majoritairement d'hybrides qui révèlent néanmoins des niveaux variés de tolérance à la sécheresse. Le développement actuel de la populiculture et son éloignement subséquent des zones alluviales ont fait naître le besoin de cultivars associant la tolérance à la sécheresse à la productivité. Les liens entre ces deux qualités et les facteurs intrinsèques qui les déterminent sont cependant très peu connus. L'objectif de notre thèse est, dans un premier temps, de comparer la réponse à la sécheresse de deux clones de peuplier présentant des niveaux contrastés de tolérance au manque d'eau, et ceci afin de mettre en évidence les mécanismes physiologiques mis en jeu pour lutter contre la contrainte hydrique, et de dégager, dans un second temps, des déterminants de productivité, d'efficacité d'utilisation de l'eau et de tolérance à la sécheresse à partir d'un plus large panel de cultivars.

La comparaison des feuilles des clones 'Dorskamp' et 'Luisa_Avanzo' en termes de capacités photosynthétiques, de thermotolérance, de croissance, de structure, d'ajustement osmotique, de systèmes de lutte contre les oxydations et de composition phénolique en conditions non limitantes en eau et en conditions de sécheresse a permis de mettre en évidence des différences marquées entre les deux cultivars qui ne se situent pas dans leur réponse à la sécheresse. Les feuilles des deux clones sont constitutivement différentes en terme de structure et de croissance. De plus, en réponse au ré-arrosage, le clone 'Dorskamp' présente une plus grande plasticité que le clone 'Luisa_Avanzo'. L'élargissement du modèle à 31 cultivars a fait apparaître que les clones les plus productifs présentent la plus grande surface foliaire, les plus faibles surfaces massiques et les teneurs en azote foliaires les plus faibles mais sont également les plus sensibles à la sécheresse. Enfin, aucun lien direct entre productivité et efficacité d'utilisation de l'eau, d'une part, et entre productivité et croissance foliaire, d'autre part, n'a été observé.

Mots-clés : ajustement osmotique, capacités photosynthétiques, composition phénolique, croissance des feuilles, déterminants foliaires, discrimination isotopique du carbone, efficacité d'utilisation de l'eau, enzymes antioxydantes, fluorescence de la chlorophylle, index de plastochrone foliaire, Paraquat, peuplier, *Populus x canadensis*, productivité, stade de développement des feuilles, surface massique, thermotolérance, tolérance à la sécheresse.

PhD thesis from the University of Orléans (France),
Physiology, Organism Biology, Populations, Interactions
Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures LBLGC - UPRES EA 1207
Université d'Orléans UFR – Faculté des Sciences BP 6759
45 067 ORLÉANS cedex 2

Ecophysiological traits of euramerican poplars in response to drought

Artificial poplar stands are traditionally planted in lowland areas, but an increasing interest in their use cause an extension of poplar culture to upland sites. Although poplars are among the most susceptible woody plants to drought, significant clonal variability in drought tolerance has been recorded. However, the links between productivity and drought tolerance are unknown. The purpose of my thesis was on one hand to compare the response to drought of two clones with distinct levels of drought tolerance in order to highlight physiological mechanisms at their disposal to survive drought, and on the other hand, to find leaf determinants of productivity, water use efficiency and drought tolerance with a large sample of euramerican hybrid poplars.

Leaf comparison of clones 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo' regarding photosynthetic capacities, thermotolerance, growth, structure, osmotic adjustment, enzymatic antioxidant properties and phenolic composition in well-watered and drought conditions showed that differences between both clones in response to drought are weak. Leaves of both clones are constitutively different in growth and structure. Moreover, in response to re-watering, clone 'Dorskamp' exhibits a more important plasticity than clone 'Luisa_Avanzo'. By enlarging the model up to 31 clones, we show that the most productive clones exhibit the largest leaf area and the weakest specific leaf area and leaf nitrogen content, but are the most susceptible to drought. Finally, no direct link between productivity and water use efficiency on one hand, and between productivity and leaf growth on the other hand has been observed.

Key-words: carbon isotope discrimination, chlorophyll fluorescence, drought tolerance, enzymatic antioxidants, foliar traits, leaf development stage, leaf growth, leaf plastochrone index, osmotic adjustment, Paraquat, phenolic composition, photosynthetic capacities, poplar, *Populus x canadensis*, productivity, specific leaf area, thermotolerance, water use efficiency.